

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 545 612**

51 Int. Cl.:

C12N 9/30 (2006.01)

C12P 21/04 (2006.01)

C12N 15/00 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.06.2005 E 10157000 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.06.2015 EP 2221366**

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

30 Prioridad:

29.06.2004 US 585336 P

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

14.09.2015

73 Titular/es:

**NOVOZYMES INC. (100.0%)
1445 DREW AVENUE
DAVIS, CA 95616, US**

72 Inventor/es:

**OTANI, SUZANNE;
GE, HAIYAN;
HARRIS, PAUL;
YAYER, DEBBIE y
BLINKOVSKY, ALEXANDER**

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 545 612 T3

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

DESCRIPCIÓN

Polipéptidos que tienen actividad de alfa-glucosidasa y polinucleótidos que los codifican.

5 Antecedentes de la invención

Campo de la invención

10 [0001] La presente invención se refiere a polipéptidos aislados que tienen actividad de alfa-glucosidasa y polinucleótidos aislados que codifican los polipéptidos. La invención también se refiere a constructos de ácidos nucleicos, vectores y células huésped que comprenden los polinucleótidos así como métodos para producir y utilizar los polipéptidos.

Descripción de la técnica relacionada

15 [0002] Diferentes enzimas están implicadas en la degradación de almidón. Las enzimas incluyen alfa-amilasa, beta-amilasa, amiloglucosidasa, pululanasa, isoamilasa, alfa-glucosidasa y ciclodextrina glucosiltransferasa.

20 [0003] Las alfa-glucosidasas (EC 3.2.1.20) hidrolizan residuos terminales no reductores alfa-1,4-enlazados de glucosa en varios sustratos, liberando glucosa. Degradan rápidamente los disacáridos y oligosacáridos mientras que, de hacerlo, atacan lentamente a los polisacáridos. La maltosa, los derivados de maltosa, sacarosa, aril-alfa-glucósidos y alquil-alfa-glucósidos pueden hacer de sustratos.

25 [0004] La purificación y propiedades de una alfa-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus* ha sido descrita por Rudick y Elbein, 1974, Archives of Biochemistry and Biophysics 161: 281-290.

30 [0005] Se ha informado de que otros hongos filamentosos producen alfa-glucosidasas, tales como *Aspergillus flavus* (Olutiola, 1981, Mycologia 73: 1130), *Aspergillus nidulans* (Kato et al., 2002, Appl. Environ. Microbiol. 68: 1250-1256), *Aspergillus niger* (Rudick et al., 1979, Archives of Biochemistry and Biophysics 193: 509), *Aspergillus oryzae* (Leibowitz and Mechliniski, 1926, Hoppe- Seyler's Zeitschrift fur Physiologische Chemie 154: 64), *Mucor javanicus* (Yamasaki et al., 1978, Berichte des Ohara Instituts para Landwirtschaftliche Biologie 17: 123), *Mucor racemosus* (Yamasaki et al., 1977, Agricultural and Biological Chemistry 41: 1553), *Mucor rouxii* (Flores-Carreón and Ruiz- Herrera, 1972, Biochemica et Biophysica Acta 258: 496), *Penicillium pupurogenum* (Yamasaki et al., 1976, Agricultural and Biological Chemistry 40: 669) y *Penicillium oxalicum* (Yamasaki et al., 1977, Agricultural and Biological Chemistry 41: 1451).

35 [0006] Las alfa-glucosidasas se pueden usar en combinación con otras enzimas que degradan el almidón, por ejemplo, alfa-amilasa, para conseguir la hidrólisis completa del almidón en aplicaciones industriales donde es deseable la conversión en azúcares fermentables. En consecuencia, hay una necesidad en la técnica de alfa-glucosidasas alternativas con propiedades mejoradas tales como pH óptimo, temperatura óptima y termoestabilidad.

40 [0007] Es un objetivo de la presente invención el proporcionar polipéptidos que tienen actividad de alfa-glucosidasa y polinucleótidos que codifican los polipéptidos.

Resumen de la invención

45

[0008] La presente invención se refiere a un polipéptido aislado que tiene actividad de alfa-glucosidasa, donde el polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90% de identidad con los aminoácidos 20 a 988 de la SEC ID nº 6.

50 [0009] La presente invención también se refiere a polinucleótidos aislados que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de la invención.

[0010] La presente invención también se refiere a constructos de ácidos nucleicos, vectores de expresión recombinantes y células huésped recombinantes que comprenden los polinucleótidos.

55

[0011] La presente invención también se refiere a métodos para producir polipéptidos de la invención que tienen actividad de alfa-glucosidasa que comprenden (a) cultivar una célula huésped recombinante que comprende un constructo de ácidos nucleicos que comprende un polinucleótido que codifica el polipéptido bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido; y (b) recuperar del polipéptido.

60

Breve descripción de las figuras

[0012]

65 La Figura 1 muestra la secuencia de ADN genómico y la secuencia de aminoácidos deducida de una alfa-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus* (Agl1) (SEC ID nº 1 y 2, respectivamente).

La Figura 2 muestra la secuencia de ADN genómico y la secuencia de aminoácidos deducida de una alfa-glucosidasa

- de *Aspergillus fumigatus* (Agl2) (SEC ID nº 3 y 4, respectivamente).
 La Figura 3 muestra la secuencia de ADN genómico y la secuencia de aminoácidos deducida de una alfa-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus* (Agl3) (SEC ID nº 5 y 6, respectivamente).
 La Figura 4 muestra un mapa de restricción de pAlLo1.
 5 La Figura 5 muestra un mapa de restricción de pBM121b.
 La Figura 6 muestra un mapa de restricción de pBM120a.
 La Figura 7 muestra un mapa de restricción de pSMO216.
 La Figura 8 muestra un mapa de restricción de pHyGe011.
 La Figura 9 muestra un mapa de restricción de pJSF9b.
 10 La Figura 10 muestra la dependencia del pH que tiene la actividad de la alfa-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus* Agl1 purificada en tampón acetato 50 mM/tampón fosfato 50 mM a 37°C.
 La Figura 11 muestra la termoestabilidad de la alfa-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus* Agl1 purificada tras la incubación en acetato sódico pH 5,0 y 0,05 M durante 5 minutos a diferentes temperaturas.
 La Figura 12 muestra la dependencia de la temperatura que tiene la actividad de la alfa-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus* Agl1 purificada en acetato sódico pH 5,0 y 50 mM.
 15 La Figura 13 muestra la dependencia del pH que tiene la actividad de la alfa-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus* Agl3 purificada en tampón acetato 50 mM/tampón fosfato 50 mM a 37°C.
 La Figura 14 muestra la termoestabilidad de la alfa-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus* Agl3 purificada tras la incubación en acetato sódico pH 5,0 y 50 mM durante 5 minutos a diferentes temperaturas.
 20 La Figura 15 muestra la dependencia de la temperatura que tiene la actividad de la alfa-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus* Agl3 purificada en acetato sódico pH 5,0 y 50 mM.

Definiciones

- 25 [0013] Actividad de alfa-glucosidasa: el término "actividad de alfa-glucosidasa" se define en este documento como una actividad de alfa-D-glucósido glucohidrolasa (E.C. 3.2.1.20) que cataliza la exohidrólisis de los residuos terminales no reductores 1,4-enlazados de alfa-D-glucosa con la liberación de alfa-D-glucosa.
 Los sustratos naturales de la actividad enzimática incluyen, por ejemplo, maltosa, maltotriosa, maltotetraosa, maltopentaosa, almidón (soluble), amilosa, amilopectina, isomaltosa, kojibiosa, sacarosa, nigerosa, turanosa, melicitosa y glucógeno. Para los fines de la presente invención, la actividad de alfa-glucosidasa se determina con maltosa como sustrato en tampón de acetato sódico 0,1 M y pH 4,3 a 25°C. Una unidad de actividad de alfa-glucosidasa se define como 1,0 µmol de glucosa producida por minuto a 25°C y pH 4,3 de maltosa como sustrato en tampón de acetato sódico.
 30
- 35 [0014] Los polipéptidos de la presente invención tienen al menos un 20%, preferiblemente al menos un 40%, más preferiblemente al menos un 50%, más preferiblemente al menos un 60%, más preferiblemente al menos un 70%, más preferiblemente al menos un 80%, incluso más preferiblemente al menos un 90%, de la forma más preferible al menos un 95% e incluso de forma más preferible al menos un 100% de la actividad de alfa-glucosidasa del polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada como los aminoácidos 15 a 881 de la SEC ID nº 2, los aminoácidos 40 30 a 967 de la SEC ID nº 4 o los aminoácidos 20 a 988 de la SEC ID nº 6.
- [0015] Polipéptido aislado: el término "polipéptido aislado" tal y como se usa en este documento 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, de la forma más preferible al menos un 90% puro e incluso de forma más preferible al menos un 95% puro, tal y como se determina mediante SDS-PAGE.
 45
- [0016] Polipéptido sustancialmente puro: el término "polipéptido sustancialmente puro" denota en este documento un preparado de polipéptidos que contiene como mucho un 10%, preferiblemente como mucho un 8%, más preferiblemente como mucho un 6%, más preferiblemente como mucho un 5%, más preferiblemente como mucho un 4%, más preferiblemente como mucho un 3%, incluso más preferiblemente como mucho un 2%, de la forma más preferible como mucho un 1% e incluso de forma más preferible como mucho un 0,5% en peso de otro material polipeptídico con el cual está asociado originalmente o por recombinación. Se prefiere, por tanto, que el polipéptido sustancialmente 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%, puro incluso más preferiblemente al menos un 99%, de la forma más preferible al menos un 99,5% puro e incluso de forma más preferible un 100% puro en peso del material polipeptídico total presente en el preparado.
 50
- [0017] Los polipéptidos de la presente invención están preferiblemente en una forma sustancialmente pura. En particular, se prefiere que los polipéptidos estén en "forma esencialmente pura", es decir, que el preparado de polipéptidos esté esencialmente libre de otro material polipeptídico con el cual esté asociado originalmente o por recombinación. Esto puede ser realizado, por ejemplo, preparando el polipéptido mediante métodos recombinantes bien conocidos o por métodos de purificación tradicional.
 60
- [0018] En este documento, el término "polipéptido sustancialmente puro" es sinónimo de los términos "polipéptido aislado" y "polipéptido en forma aislada".
 65

[0019] Identidad: la relación entre dos secuencias de aminoácidos o entre dos secuencias de nucleótidos es descrita por el parámetro "identidad".

5 [0020] Para fines de la presente invención, el grado de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se determina por el método Clustal (Higgins, 1989, CABIOS 5: 151-153) usando el software LASERGENE™ MEGALIGN™ (DNASTAR, Inc., Madison, WI) con una tabla de identidad y los siguientes parámetros de alineamiento múltiple: penalización de gap de 10 y penalización de longitud de gap de 10. Los parámetros de alineamiento por parejas son Ktuple=1, penalización de gap=3, ventanas=5 y diagonales=5.

10 [0021] Para fines de la presente invención, el grado de identidad entre dos secuencias de nucleótidos se determina mediante el método Wilbur-Lipman (Wilbur and Lipman, 1983, Proceedings of the National Academy of Science USA 80: 726-730) utilizando el Software de LASERGENE™ MEGALIGN™ (DNASTAR, Inc., Madison, WI) con una tabla de identidad y los siguientes parámetros de alineamiento múltiple: penalización de gap de 10 y penalización de longitud de gap de 10. Los parámetros de alineamiento por parejas son Ktuple=3, penalización de gap=3 y ventanas=20.

15 [0022] Fragmento de polipéptido: el término "fragmento de polipéptido" se define en este documento como un polipéptido que tiene uno o más aminoácidos eliminados del amino- y/o carboxilo-terminal de una secuencia de aminoácidos o una homóloga de la misma, donde el fragmento tiene actividad de alfa-glucosidasa. En un aspecto preferido, un fragmento contiene al menos 770 residuos de aminoácidos, más preferiblemente al menos 800 residuos de aminoácidos y de la forma más preferible al menos 830 residuos de aminoácidos de la SEC ID nº 2 o una homóloga de la misma. En otro aspecto preferido, un fragmento contiene al menos 820 residuos de aminoácidos, más preferiblemente al menos 860 residuos de aminoácidos y de la forma más preferible al menos 900 residuos de aminoácidos de la SEC ID nº 4 o una homóloga de la misma. En otro aspecto preferido, un fragmento contiene al menos 820 residuos de aminoácidos, más preferiblemente al menos 860 residuos de aminoácidos y de la forma más preferible al menos 900 residuos de aminoácidos de la SEC ID nº 6 o una homóloga de la misma.

20 [0023] Variante alélica: el término "variante alélica" denota en este documento cualesquiera dos o más formas alternativas de un gen que ocupan el mismo locus cromosómico. La variación alélica surge naturalmente a través de mutación y puede dar lugar al polimorfismo dentro de poblaciones. Las mutaciones genéticas pueden ser silenciosas (sin cambios en el polipéptido codificado) o pueden codificar polipéptidos con secuencias de aminoácidos alteradas. Una variante alélica de un polipéptido es un polipéptido codificado por una variante alélica de un gen.

25 [0024] Polinucleótido aislado: el término "polinucleótido aislado" tal y como se usa en este documento 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 forma más preferible al menos un 95% puro, tal y como se determina mediante electroforesis de agarosa.

30 [0025] Polinucleótido sustancialmente puro: el término "polinucleótido sustancialmente puro" tal y como se usa en este documento se refiere a un preparado de polinucleótidos libre de otros nucleótidos extraños o no deseados y en una forma adecuada para el uso dentro de sistemas de producción de proteínas genéticamente modificadas. De este modo, un polinucleótido sustancialmente puro contiene como mucho un 10%, preferiblemente como mucho un 8%, más preferiblemente como mucho un 6%, más preferiblemente como mucho un 5%, más preferiblemente como mucho un 4%, más preferiblemente como mucho un 3%, incluso más preferiblemente como mucho un 2%, de la forma más preferible como mucho un 1% e incluso de forma más preferible como mucho 0,5% en peso de otro material de polinucleótidos con el cual está asociado originalmente o por recombinación. Un polinucleótido sustancialmente puro puede, no obstante, incluir las regiones no traducidas 5' y 3' de origen natural, tales como promotores y terminadores. Se prefiere que el polinucleótido sustancialmente 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 forma más preferible al menos un 99,5% puro en peso. Los polinucleótidos de la presente invención están preferiblemente en una forma sustancialmente pura. En particular, se prefiere que los polinucleótidos que aquí se describen estén en "forma esencialmente pura", es decir, que el preparado de polinucleótidos esté esencialmente libre de otro material de polinucleótidos con el cual está asociado originalmente o por recombinación. En este documento, el término "polinucleótido sustancialmente puro" es sinónimo de los términos "aislado" y "polinucleótido en forma aislada". Los polinucleótidos pueden ser de origen genómico, ADNc, ARN, semisintético, sintético o cualquier combinación de los mismos.

35 [0026] Subsecuencia: el término "subsecuencia" se define aquí como una secuencia de nucleótidos con uno o más nucleótidos eliminados del terminal 5' y/o 3' de un polinucleótido o un homólogo del mismo, donde la subsecuencia codifica un fragmento de polipéptido que tiene actividad de alfa-glucosidasa. En un aspecto preferido, una subsecuencia contiene al menos 2310 nucleótidos, más preferiblemente al menos 2400 nucleótidos y de la forma más preferible al menos 2490 nucleótidos de la SEC ID nº 1 o una homóloga de la misma. En otro aspecto preferido, una subsecuencia contiene al menos 2460 nucleótidos, más preferiblemente al menos 2580 nucleótidos y de la forma más preferible al menos 2700 nucleótidos de la SEC ID nº 3 o una homóloga de la misma. En otro aspecto preferido, una subsecuencia contiene al menos 2460 nucleótidos, más preferiblemente al menos 2580 nucleótidos y de la forma más preferible al

menos 2700 nucleótidos de la SEC ID nº 5 o una homóloga de la misma.

[0027] ADNc: el término "ADNc" se define en este documento como una molécula de ADN que se puede preparar mediante transcripción inversa de una molécula de ARNm madura empalmada, obtenida de una célula eucariota. El ADNc carece de secuencias intrónica que están normalmente presentes en el ADN genómico correspondiente. El transcrito inicial principal de ARN es un precursor de ARNm que se procesa a través de una serie de pasos antes de aparecer como ARNm empalmado maduro. Estos pasos incluyen la eliminación de secuencias intrónicas por un proceso llamado empalme. El ADNc derivado de ARNm carece, por tanto, de cualquier secuencia intrónica.

[0028] Constructo de ácidos nucleicos: el término "constructo de ácidos nucleicos" tal y como se utiliza en este documento se refiere a una molécula de ácidos nucleicos, tanto uni- como bicatenaria, que es aislada de un gen de origen natural o que se modifica para contener segmentos de ácidos nucleicos de manera que de otro modo no existirían en la naturaleza. El término constructo de ácidos nucleicos es sinónimo del término "casete de expresión" cuando el constructo de ácidos nucleicos contiene las secuencias de control requeridas para la expresión de una secuencia codificante de la presente invención.

[0029] Secuencia de control: el término "secuencias de control" se define en este documento para incluir todos los componentes, que son necesarios o beneficiosos 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 a cada una de las otras. Tales secuencias de control incluyen, pero no se limitan a, un líder, una secuencia de poliadenilación, una secuencia de propéptido, un promotor, una secuencia de péptido señal y un terminador de transcripción. Como mínimo, las secuencias de control incluyen un promotor y señales de parada transcripcional y traduccional. Se pueden proporcionar enlazadores a las secuencias de control con el objetivo de introducir sitios de restricción específicos que faciliten la unión de las secuencias de control con la región codificante de la secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido.

[0030] Operativamente enlazado: el término "operativamente enlazado" denota en este documento una configuración en la que una secuencia de control se coloca en una posición apropiada relativa a la secuencia de codificación de la secuencia de polinucleótidos de manera que la secuencia de control dirige la expresión de la secuencia codificante de un polipéptido.

[0031] Secuencia codificante: cuando se usa en este documento el término "secuencia codificante" significa una secuencia de nucleótidos que especifica directamente la secuencia de aminoácidos de su producto proteínico. Los límites de la secuencia codificante están generalmente determinados por un marco de lectura abierto, que empieza normalmente con el codón de inicio ATG o codones de inicio alternativos tales como GTG y TTG, y termina con un codón de terminación tal como TAA, TAG y TGA. La secuencia codificante puede ser un ADN, ADNc o una secuencia de nucleótidos recombinante.

[0032] Expresión: el término "expresión" incluye cualquier paso implicado en la producción del polipéptido incluyendo, pero no limitándose a, transcripción, modificación postranscripcional, traducción, modificación postraduccional y secreción.

[0033] Vector de expresión: el término "vector de expresión" se define en este documento 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 se ocupan de su expresión.

[0034] Célula huésped: el término "célula huésped", tal y como se utiliza en este documento, incluye cualquier tipo de célula que sea susceptible de transformación, transfección, transducción y similares con un constructo de ácidos nucleicos o vector de expresión que comprende un polinucleótido de la presente invención.

[0035] Modificación: el término "modificación" significa en este documento cualquier modificación química del polipéptido que consiste en los aminoácidos 15 a 881 de la SEC ID nº 2, los aminoácidos 30 a 967 de la SEC ID nº 4 o los aminoácidos 20 a 988 de la SEC ID nº 6, o una secuencia homóloga de la misma, así como manipulación genética del ADN que codifica ese polipéptido. La modificación puede ser sustituciones, deleciones y/o inserciones de uno o varios aminoácidos así como reemplazos de una o varias cadenas laterales de aminoácidos.

[0036] Variante Artificial: cuando se usa en este documento, el término "variante artificial" significa un polipéptido que tiene actividad de alfa-glucosidasa producido por un organismo expresando una secuencia de nucleótidos modificada de la SEC ID nº 1, la SEC ID nº 3 o la SEC ID nº 5. La secuencia de nucleótidos modificada se obtiene a través de intervención humana modificando la secuencia de nucleótidos descrita en la SEC ID nº 1, la SEC ID nº 3 o la SEC ID nº 5.

Descripción detallada de la invención

Polipéptidos que tienen actividad de alfa-glucosidasa

5 [0037] En un primer aspecto, la presente invención se refiere a polipéptidos aislados que tienen actividad de alfa-glucosidasa, donde los polipéptidos tienen una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90% de identidad con los aminoácidos 20 a 988 de la SEC ID nº 6. En realizaciones de la invención los polipéptidos tienen al menos un 95% y de la forma más preferible al menos un 97% de identidad con los aminoácidos 20 a 988 de la SEC ID nº 6 (de ahora en adelante "polipéptidos homólogos). En un aspecto preferido, los polipéptidos homólogos tienen una secuencia de aminoácidos que difiere en diez aminoácidos, preferiblemente en cinco aminoácidos, más preferiblemente en cuatro aminoácidos, incluso más preferiblemente en tres aminoácidos, de la forma más preferible en dos aminoácidos e incluso de la forma más preferible en un aminoácido de los aminoácidos 20 a 988 de la SEC ID nº 6.

10 [0038] Un polipéptido de la presente invención preferiblemente comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID nº 6, o una variante alélica de la misma; o un fragmento de la misma que tiene actividad de alfa-glucosidasa.
 En un aspecto preferido, un polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID nº 6. En otro aspecto preferido, un polipéptido comprende los aminoácidos 20 a 988 de la SEC ID nº 6, o una variante alélica de la misma; o un fragmento de la misma que tiene actividad de alfa-glucosidasa. En otro aspecto preferido, un polipéptido comprende los aminoácidos 20 a 988 de la SEC ID nº 6. En otro aspecto preferido, un polipéptido consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID nº 6 o una variante alélica de la misma; o un fragmento de la misma que tiene actividad de alfa-glucosidasa. En otro aspecto preferido, un polipéptido consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID nº 6. En otro aspecto preferido, un polipéptido consiste en los aminoácidos 20 a 988 de la SEC ID nº 6 o una variante alélica de la misma; o un fragmento de la misma que tiene actividad de alfa-glucosidasa. En otro aspecto preferido, un polipéptido consiste en los aminoácidos 20 a 988 de la SEC ID nº 6.

[0039] En otro aspecto, la invención se refiere a un polipéptido que es codificado por el polinucleótido contenido en plásmido pJSF9b que está contenido en *E. coli* NRRL B-30856.

25 [0040] Los polipéptidos aislados de la invención que tienen actividad de alfa-glucosidasa tienen las siguientes propiedades fisicoquímicas: un pH óptimo en el rango de aproximadamente 3,5 a aproximadamente 4,5, preferiblemente aproximadamente 3,8 a aproximadamente 4,5, más preferiblemente aproximadamente 4,0 a aproximadamente 4,5, de la forma más preferible aproximadamente 4,0 a aproximadamente 4,3 e incluso de la forma más preferible aproximadamente de pH 4,1 en tampón acetato 50 mM tampón fosfato 50 mM a 37°C, una temperatura óptima en el rango de aproximadamente 60°C a aproximadamente 63°C en acetato sódico 50 mM y pH 5,0, y termoestabilidad hasta de aproximadamente 67°C a aproximadamente 70°C (aproximadamente el 80% de la actividad residual) en acetato sódico 50 mM y pH 5,0 durante 5 minutos. En un aspecto preferido, el polipéptido aislado que tiene actividad de alfa-glucosidasa tiene termoestabilidad hasta aproximadamente 67°C (aproximadamente el 80% de la actividad residual) en acetato sódico 50 mM y pH 5,0 durante 5 minutos. En otro aspecto preferido, el polipéptido aislado con actividad de alfa-glucosidasa tiene termoestabilidad hasta aproximadamente 70°C (aproximadamente el 80% de la actividad residual) en acetato sódico 50 mM y pH 5,0 durante 5 minutos

Fuentes de polipéptidos con actividad de alfa-glucosidasa

40 [0041] Un polipéptido de la presente invención puede ser obtenido de microorganismos de cualquier género. Para fines de la presente invención, el término "obtenido de" tal y como se utiliza en este documento en conexión con una fuente dada significará que el polipéptido codificado por una secuencia de nucleótidos es producido por la fuente o por una célula en la cual la secuencia de nucleótidos de la fuente ha sido insertada. En un aspecto preferido, el polipéptido obtenido de una fuente dada es secretado extracelularmente.

45 [0042] Un polipéptido de la presente invención puede ser un polipéptido bacteriano. Por ejemplo, el polipéptido puede ser un polipéptido bacteriano gram positivo tal como un polipéptido de *Bacillus*, por ejemplo, un polipéptido de *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus brevis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus lautus*, *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis* o *Bacillus thuringiensis*; o un polipéptido de *Streptomyces*, por ejemplo, un polipéptido de *Streptomyces lividans* o *Streptomyces murinus*; o un polipéptido bacteriano Gram negativo, por ejemplo, un polipéptido de *E. coli* o *Pseudomonas* sp.

55 [0043] Un polipéptido de la presente invención también puede ser un polipéptido fúngico y más preferiblemente un polipéptido de levadura tal como un polipéptido de *Candida*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* o *Yarrowia*; o más preferiblemente un polipéptido fúngico filamentoso tal como un polipéptido de *Acremonium*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Cryptococcus*, *Filibasidium*, *Fusarium*, *Humicola*, *Magnaporthe*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neocallimastix*, *Neurospora*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Piromyces*, *Schizofilum*, *Talaromyces*, *Thermoascus*, *Thielavia*, *Tolipocladium* o *Trichoderma*.

60 [0044] En un aspecto preferido, el polipéptido es un polipéptido de *Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces diastaticus*, *Saccharomyces douglasii*, *Saccharomyces kluyveri*, *Saccharomyces norbensis* o *Saccharomyces oviformis* con actividad de alfa-glucosidasa.

65 [0045] En otro aspecto preferido, el polipéptido es un polipéptido de *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Fusarium bactridioides*, *Fusarium cerealis*, *Fusarium crookwellense*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium*

5 *graminearum*, *Fusarium graminum*, *Fusarium heterosporum*, *Fusarium negundi*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium reticulatum*, *Fusarium roseum*, *Fusarium sambucinum*, *Fusarium sarcochroum*, *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium sulphureum*, *Fusarium torulosum*, *Fusarium trichothecioides*, *Fusarium venenatum*, *Humicola insolens*, *Humicola lanuginosa*, *Mucor miehei*, *Myceliophthora thermophila*, *Neurospora crassa* o *Penicillium purpurogenum*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei* o *Trichoderma viride* con actividad de alfa-glucosidasa.

10 [0046] En un aspecto más preferido, el polipéptido es un polipéptido de *Aspergillus fumigatus*, por ejemplo, el polipéptido maduro de la SEC ID nº 6.

[0047] Se entiende que para las especies anteriormente mencionadas, la invención abarca los estados perfectos e imperfectos y otros equivalentes taxonómicos, por ejemplo, anamorfos, independientemente del nombre de especie por el que son conocidos. Los expertos en la técnica reconocerán fácilmente la identidad de los equivalentes apropiados.

15 [0048] Las cepas de estas especies son fácilmente accesible al público en una variedad de colecciones de cultivo, tales como la American Type Culture Collection (ATCC), la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), la Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS) y la Agricultural Research Service Patent Culture Collection, Northern Regional Research Center (NRRL). [0049] Además, tales polipéptidos pueden ser identificados y obtenidos de otras fuentes incluyendo microorganismos aislados de la naturaleza (por ejemplo, suciedad, abonos, agua, etc.) utilizando las sondas mencionadas anteriormente. Las técnicas para aislar microorganismos de hábitats son conocidas en la técnica. El polinucleótido puede luego ser obtenido seleccionando de una forma similar de una biblioteca genómica o de ADNc de otro microorganismo. Una vez que una secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido ha sido detectada con la(s) sonda(s), el polinucleótido puede ser aislado o clonado utilizando técnicas que son bien conocidas por los expertos en la técnica (ver, por ejemplo, Sambrook et al., 1989, supra).

25 [0050] Los polipéptidos de la presente invención también incluyen polipéptidos fusionados o polipéptidos divisibles de fusión donde otro polipéptido se fusiona al N-terminal o al C-terminal del polipéptido o fragmento del mismo. Un polipéptido fusionado se produce fusionando una secuencia de nucleótidos (o una parte de la misma) que codifica otro polipéptido a una secuencia de nucleótidos (o una parte de la misma) de la presente invención. Las técnicas para producir polipéptidos fusionados se conocen en la técnica, e incluyen ligar las secuencias codificantes que codifican los polipéptidos de modo que éstas están dentro del marco y que la expresión del polipéptido fusionado esté bajo el control del(de los) mismo(s) promotor(es) y terminador.

30 Polinucleótidos

35 [0051] La presente invención también se refiere a polinucleótidos aislados que tienen una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de la presente invención.

40 [0052] La secuencia de nucleótidos puede ser la descrita en la SEC ID nº 5. En otro aspecto más preferido, la secuencia de nucleótidos es la secuencia contenida en el plásmido pJSF9b que está contenido en *E. coli* NRRL B-30856. En otro aspecto preferido, la secuencia de nucleótidos es la región codificante de polipéptido maduro de la SEC ID nº 5. En otro aspecto más preferido, la secuencia de nucleótidos es la región codificante de polipéptido maduro contenida en el plásmido pJSF9b que está contenido en *E. coli* NRRL B-30856. La presente invención también abarca secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID nº 6 o el polipéptido maduro de la misma, la cual difiere de la SEC ID nº 5 en virtud de la degeneración del código genético. La presente invención también se refiere a subsecuencias de la SEC ID nº 5 que codifican fragmentos de la SEC ID nº 6 que tienen actividad de alfa-glucosidasa.

50 [0053] Las técnicas usadas para aislar o clonar un polinucleótido que codifica un polipéptido son conocidas en la técnica e incluyen aislamiento a partir de ADN genómico, preparación a partir de ADNc o una combinación de ambos. La clonación de los polinucleótidos de la presente invención de tal ADN genómico puede ser efectuada, por ejemplo, usando la bien conocida reacción en cadena de polimerasa (PCR) o la selección de anticuerpos de bibliotecas de expresión para detectar fragmentos de ADN clonado con características estructurales compartidas. Ver, por ejemplo, Innis et al., 1990, PCR: A guide to Methods and Application, Academic Press, Nueva York. Se pueden utilizar otros procedimientos de amplificación de ácidos nucleicos tales como reacción en cadena de ligasa (LCR), transcripción activada ligada (LAT) y amplificación basada en secuencias de nucleótidos (NASBA). Los polinucleótidos pueden ser clonados de una célula de *Aspergillus* u otro organismo relacionado y así, por ejemplo, puede ser una variante alélica o de especie de la región de codificación del polipéptido de la secuencia de nucleótidos.

60 [0054] La modificación de una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de la presente invención puede ser necesaria para la síntesis de polipéptidos sustancialmente similares al polipéptido. El término "sustancialmente similares" al polipéptido se refiere a formas de origen no natural del polipéptido. Estos polipéptidos pueden diferir en alguna manera diseñada del polipéptido aislado de su fuente nativa, por ejemplo, variantes artificiales que difieren en actividad específica, termoestabilidad, pH óptimo o similares. La secuencia variante se puede construir basándose en la secuencia de nucleótidos presentada como la región de codificación del polipéptido de la SEC ID nº 5, por ejemplo, una subsecuencia de la misma, y/o introduciendo sustituciones de nucleótidos que no dan lugar a otra secuencia de

aminoácidos del polipéptido codificadas por la secuencia de nucleótidos, pero que corresponden al uso del codón del organismo huésped destinado a la producción de la enzima, o introduciendo sustituciones de nucleótidos que pueden dar lugar a una secuencia de aminoácidos diferente. Ver, por ejemplo, Ford et al., 1991, Protein Expression and Purification 2: 95-107 para una descripción general de la sustitución de nucleótidos.

[0055] Será aparente a los expertos en la técnica que tales sustituciones pueden ser hechas fuera de las regiones críticas para la función de la molécula y aun así dar lugar a un polipéptido activo. Los residuos de aminoácidos esenciales para la actividad del polipéptido codificado por un polinucleótido aislado de la invención, y por lo tanto preferiblemente no sujetos a sustitución, se pueden identificar según procedimientos conocidos en la técnica, tales como mutagénesis dirigida o mutagénesis por escaneado de alanina (ver, por ejemplo, Cunningham and Wells, 1989, Science 244: 1081-1085). En esta última técnica, las mutaciones se introducen en cada residuo positivamente cargado en la molécula, y se examina la actividad de alfa-glucosidasa de las moléculas mutantes resultantes para identificar residuos de aminoácidos que son críticos para la actividad de la molécula. Los sitios de interacción enzima-sustrato también pueden ser determinados mediante análisis de la estructura tridimensional tal y como se determina mediante técnicas tales como análisis de resonancia magnética nuclear, cristalografía o marcaje por fotoafinidad (ver, por ejemplo, de Vos et al., 1992, Science 255: 306-312; Smith et al., 1992, Journal of Molecular Biology 224: 899-904; Wlodaver et al., 1992, FEBS Letters 309: 59-64).

Constructos de ácidos nucleicos

[0056] La presente invención también se refiere a constructos de ácidos nucleicos que incluyen un polinucleótido aislado de la presente invención operativamente enlazado a una o varias secuencias de control que dirigen la expresión de la secuencia codificante en una célula huésped adecuada bajo condiciones compatibles con las secuencias de control.

[0057] Un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido de la presente invención se puede manipular en una variedad de maneras para procurar 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.

[0058] La secuencia de control puede ser una secuencia promotora apropiada, una secuencia de nucleótidos que es reconocida por una célula huésped para la expresión de un polinucleótido que codifica un polipéptido de la presente invención. La secuencia promotora contiene secuencias de control transcripcionales que median en la expresión del polipéptido. El promotor puede ser cualquier secuencia de nucleótidos que muestra actividad transcripcional en la célula huésped de elección incluyendo promotores mutantes, truncados e híbridos, y se pueden obtener de genes que codifican polipéptidos extracelulares o intracelulares tanto homólogos como heterólogos a la célula huésped.

[0059] 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 del operón lac de *E. coli*, el gen de agarasa de *Streptomyces coelicolor* (dagA), el gen de levansucrasa de *Bacillus subtilis* (sacB), el gen de alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* (amyL), el gen de amilasa maltogénica de *Bacillus stearothermophilus* (amyM), el gen de alfa-amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens* (amyQ), el gen de penicilinas de *Bacillus licheniformis* (penP), los genes xylA y xylB de *Bacillus subtilis* y el gen de beta-lactamasa procariótica (Villa-Kamaroff et al., 1978, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 75: 3727-3731), así como 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.

[0060] Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de los constructos de ácidos nucleicos de la presente invención en una célula huésped fúngica filamentosa son los promotores obtenidos de los genes para TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, alfa-amilasa 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 *Aspergillus oryzae*, triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus oryzae*, acetamidasa de *Aspergillus nidulans*, amiloglucosidasa de *Fusarium venenatum* (WO 00/56900), *Fusarium venenatum Daria* (WO 00/56900), *Fusarium venenatum Quinn* (WO 00/56900), proteasa de tipo tripsina de *Fusarium oxysporum* (WO 96/00787), beta-glucosidasa de *Trichoderma reesei*, celobiohidrolasa I 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 *Trichoderma reesei*, así como el promotor NA2-tpi (un híbrido de los promotores de los genes para alfa-amilasa neutra de *Aspergillus niger* y triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus oryzae*); y promotores mutantes, truncados e híbridos de los mismos.

[0061] En un huésped de levadura, los 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 huésped de levadura son descritos por Romanos et al., 1992, Yeast 8:

423-488.

5 [0062] La secuencia de control también puede ser una secuencia terminadora de transcripción adecuada, una secuencia reconocida por una célula huésped para terminar la transcripción. La secuencia terminadora está operativamente enlazada al terminal 3' de la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido. Cualquier terminador que es funcional en la célula huésped de elección se puede utilizar en la presente invención.

10 [0063] Los terminadores preferidos para células huésped fúngicas filamentosas son obtenidas 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 de tipo tripsina de *Fusarium oxysporum*.

15 [0064] Los terminadores preferidos para células huésped de levadura son obtenidos de los genes para enolasa de *Saccharomyces cerevisiae*, citocromo C (CYC1) de *Saccharomyces cerevisiae* y gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Otros terminadores útiles para células huésped de levadura son descritos por Romanos et al., 1992, supra.

20 [0065] 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 terminal 5' de la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido. Cualquier secuencia líder que sea funcional en la célula huésped de elección se puede utilizar en la presente invención.

[0066] Los líderes preferidos para células huésped fúngicas filamentosas son obtenidos de los genes para TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae* y triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus nidulans*.

25 [0067] Los líderes adecuados para células huésped de levadura son obtenidos de los genes para enolasa de *Saccharomyces cerevisiae* (ENO-1), 3-fosfoglicerato quinasa de *Saccharomyces cerevisiae*, alfa-factor de *Saccharomyces cerevisiae* y alcohol deshidrogenasa/gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de *Saccharomyces cerevisiae* (ADH2/GAP).

30 [0068] La secuencia de control también puede ser una secuencia de poliadenilación, una secuencia operativamente enlazada al terminal 3' de la secuencia de nucleótidos y que, cuando se ha transcrito, es reconocida por la célula huésped como una señal para añadir residuos de poliadenosina al ARNm transcrito. Cualquier secuencia de poliadenilación que es funcional en la célula huésped de elección se puede utilizar en la presente invención.

35 [0069] Las secuencias de poliadenilación preferidas para células huésped fúngicas filamentosas son obtenidas de los genes para TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, glucoamilasa de *Aspergillus niger*, antranilato sintasa de *Aspergillus nidulans*, proteasa de tipo tripsina de *Fusarium oxysporum* y alfa-glucosidasa de *Aspergillus niger*.

40 [0070] Secuencias de poliadenilación útiles para células huésped de levadura son descritas por Guo y Sherman, 1995, Molecular Cellular Biology 15: 5983-5990.

45 [0071] La secuencia de control también puede ser una región codificante de péptido señal que codifica una secuencia de aminoácidos enlazada al amino-terminal de un polipéptido y que dirige el polipéptido codificado hacia la vía secretora de la célula. El terminal 5' de la secuencia codificante de la secuencia de nucleótidos puede contener intrínsecamente una región codificante de péptido señal naturalmente enlazada en el marco de lectura de traducción con el segmento de la región de codificación que codifica el polipéptido segregado. Alternativamente, el terminal 5' de la secuencia codificante puede contener una región codificante del péptido señal que es extranjero a la secuencia codificante. La región codificante del péptido señal extranjera puede ser requerida donde la secuencia codificante no contiene naturalmente una región codificante de péptido señal. Alternativamente, la región codificante de péptido señal extranjera puede simplemente reemplazar la región codificante del péptido señal natural para mejorar la secreción del polipéptido. No obstante, cualquier región codificante de péptido señal que dirige el polipéptido expresado hacia la vía secretora de una célula huésped de elección se puede utilizar en la presente invención.

55 [0072] Regiones codificantes del péptido señal eficaces para células huésped bacterianas son las regiones codificantes del péptido señal obtenidas de los genes para *Bacillus amilasa* maltogénica de NCIB 11837, alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus*, subtilisina de *Bacillus licheniformis*, lactamasa beta de *Bacillus licheniformis*, proteasas neutras de *Bacillus stearothermophilus* (nprT, nprS, nprM), y *Bacillus subtilis* prsA. Otros péptidos señal son descritos por Simonen y Palva, 1993, revisiones microbiológicas 57: 109-137.

60 [0073] Regiones codificantes del péptido señal eficaces para células huésped fúngicas filamentosas son las regiones codificantes de 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* y lipasa de *Humicola lanuginosa*.

65 [0074] La región codificante del péptido señal son los nucleótidos 1 a 42 de la SEC ID n° 1 que codifican los aminoácidos 1 a 14 de la SEC ID n° 2.

- [0075] La región codificante del péptido señal son los nucleótidos 1 a 145 de la SEC ID nº 3 que codifican los aminoácidos 1 a 29 de la SEC ID nº 4.
- 5 [0076] La región codificante del péptido señal son los nucleótidos 1 a 57 de la SEC ID nº 5 que codifican los aminoácidos 1 a 19 de la SEC ID nº 6.
- [0077] Los péptidos señal útiles para células huésped de levadura son obtenidos de los genes para alfa-factor de *Saccharomyces cerevisiae* e invertasa de *Saccharomyces cerevisiae*.
- 10 Otras regiones codificantes de péptido señal útiles son descritas por Romanos et al., 1992, supra.
- [0078] La secuencia de control también puede ser una región codificante del propéptido que codifica una secuencia de aminoácidos situada en el amino-terminal de un polipéptido. El polipéptido resultante es conocido como proenzima o propolipéptido (o zimógeno en algunos casos). Un propolipéptido está generalmente inactivo y se puede convertir en un polipéptido activo maduro por escisión catalítica o autocatalítica del propéptido del propolipéptido. La región codificante del propéptido se puede obtener de los genes para proteasa alcalina de *Bacillus subtilis* (aprE), proteasa neutra de *Bacillus subtilis* (nprT), alfa-factor de *Saccharomyces cerevisiae*, proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei* y lacasa de *Myceliophthora thermophila* (WO 95/33836).
- 15 [0079] Donde tanto las regiones del péptido señal como del propéptido están presentes en el amino-terminal de un polipéptido, la región de propéptido está situada junto al amino-terminal de un polipéptido y la región de péptido señal está situada junto al amino-terminal de la región de propéptido.
- [0080] También puede ser deseable 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 aquellos que hacen que la expresión del gen se encienda o se apague en respuesta a una sustancia química o estímulo físico, incluyendo la presencia de un compuesto regulador. Los sistemas reguladores en sistemas procarióticos incluyen los sistemas operadores lac, tac y trp. En levadura se puede utilizar el sistema ADH2 o el sistema GAL1. En hongos filamentosos, el promotor de TAKA alfa-amilasa, el promotor de glucoamilasa de *Aspergillus niger* y el promotor de glucoamilasa de *Aspergillus oryzae* se pueden utilizar como secuencias reguladoras. Otros ejemplos de secuencias reguladoras son aquellos que permiten amplificación génica. En sistemas eucarióticos, estos incluyen el gen de dihidrofolato reductasa que es amplificado en presencia de metotrexato, y los genes de metalotioneína que son amplificados con metales pesados. En estos casos, la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido estaría operativamente enlazada con la secuencia reguladora. Vectores de expresión
- 25 [0081] La presente invención también se refiere a vectores de expresión recombinantes que comprenden un polinucleótido de la presente invención, un promotor y señales de parada transcripcional y traduccional. Los varios ácidos nucleicos y secuencias de control anteriormente descritos se pueden juntar para producir un vector de expresión recombinante que puede incluir uno o varios sitios de restricción convenientes para permitir la inserción o sustitución de la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido en tales sitios. Alternativamente, una secuencia de nucleótidos de la presente invención se puede expresar insertando la secuencia de nucleótidos o un constructo de ácidos nucleicos que comprenda 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 enlazada con las secuencias de control apropiadas para la expresión.
- 30 [0082] El vector de expresión recombinante puede ser cualquier vector (por ejemplo, un plásmido o virus) que puede ser convenientemente sometido a procedimientos de ADN recombinante y puede provocar la expresión de la secuencia de nucleótidos. La elección del vector dependerá típicamente de la compatibilidad del vector con la célula huésped en la que el vector debe ser introducido. Los vectores pueden ser plásmidos lineales o circulares cerrados.
- 35 [0083] El vector puede ser un vector de replicación autónoma, es decir, un vector que existe como una entidad extracromosómica, cuya replicación es independiente de la replicación cromosómica, por ejemplo, un plásmido, un elemento extracromosómico, un minicromosoma o un cromosoma artificial. El vector puede contener cualquier medio para asegurar la autorreplicación. Alternativamente, el vector puede ser uno que, cuando se introduce en la célula huésped, se integra en el genoma y se replica con el(los) cromosoma(s) en el(los) que ha sido integrado. Además, se puede utilizar un único vector o plásmido o dos o más vectores o plásmidos que juntos contienen el ADN total que va ser introducido en el genoma de la célula huésped, o un transposón.
- 40 [0084] Los vectores de la presente invención preferiblemente contienen uno o varios marcadores seleccionables que permiten la fácil selección de células transformadas. Un marcador seleccionable es un gen cuyo producto proporciona resistencia biocida o vírica, resistencia a metales pesados, prototrofia para auxótrofos y, similares.
- 45 [0085] Ejemplos de marcadores seleccionables bacterianos son los genes dal de *Bacillus subtilis* o *Bacillus licheniformis*, o marcadores que confieren resistencia antibiótica tales como resistencia a la ampicilina, la canamicina, el cloranfenicol o la tetraciclina. Marcadores adecuados para células huésped de levadura son ADE2, HIS3, LEU2, LYS2, MET3, TRP1, y URA3. Los marcadores seleccionables para usar en una célula huésped fúngica filamentosa incluyen,
- 50
55
60
65

pero no se limitan a, *amdS* (acetamidasa), *argB* (ornitina carbamoiltransferasa), *bar* (fosfonitricina acetiltransferasa), *hph* (higromicina fosfotransferasa), *niaD* (nitrato-reductasa), *pyrG* (orotidina-5'-fosfato-descarboxilasa), *sC* (adeniltransferasa de sulfato) y *trpC* (antranilato sintasa), así como equivalentes de las mismas. Se prefieren para usar en una célula de *Aspergillus* los genes *amdS* y *pyrG* de *Aspergillus nidulans* o *Aspergillus oryzae* y el gen *bar* de *Streptomyces hygroscopicus*.

[0086] Los vectores de la presente invención preferiblemente contienen un elemento o elementos que permiten la integración del vector en el genoma de la célula huésped o la replicación autónoma del vector en la célula de manera independiente del genoma.

[0087] Para la integración en el genoma de la célula huésped, el vector puede apoyarse en 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. Alternativamente, el vector puede contener secuencias de nucleótidos 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 en una ubicación precisa, los elementos integracionales deberían contener preferiblemente un número suficiente de ácidos nucleicos, tal como de 100 a 10.000 pares de bases, preferiblemente de 400 a 10.000 pares de bases y de la forma más preferible de 800 a 10.000 pares de bases, que tengan un grado alto de identidad con la secuencia diana correspondiente para mejorar la probabilidad de recombinación homóloga. Los elementos integracionales pueden ser cualquier secuencia que sea homóloga a la secuencia diana en el genoma de la célula huésped. Además, los elementos integracionales pueden ser secuencias de nucleótidos codificantes o no codificantes. Por otro lado, el vector se puede integrar en el genoma de la célula huésped mediante recombinación no homóloga.

[0088] Para la replicación autónoma, el vector puede comprender adicionalmente un origen de replicación que habilita al vector a replicarse de manera autónoma en la célula huésped en cuestión. El origen de replicación puede ser cualquier replicador plásmido que media en la replicación autónoma que funciona en una célula. Los términos "origen de replicación" o "replicador plásmido" se definen en este documento como una secuencia de nucleótidos que habilitan a un plásmido o vector para replicarse in vivo.

[0089] Ejemplos de orígenes bacterianos de replicación son los orígenes de replicación de los plásmidos pBR322, pUC19, pACYC177 y pACYC184 que permiten la replicación en *E. coli*, y pUB110, pE194, pTA1060 y pAM β 1 que permiten la replicación en *Bacillus*.

[0090] Ejemplos de orígenes de replicación para usar en una célula huésped de levadura son el origen de replicación de 2 micras, ARS1, ARS4, la combinación de ARS1 y CEN3, y la combinación de ARS4 y CEN6.

[0091] Ejemplos de orígenes de replicación útiles en una célula fúngica filamentosa son AMA1 y ANS1 (Gems et al., 1991, Gene 98: 61-67; Cullen et al., 1987, Nucleic Acids 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 lograr según los métodos descritos en WO 00/24883.

[0092] Se puede insertar más de una copia de un polinucleótido de la presente invención en la célula huésped para aumentar la producción del producto génico. Un aumento en el número de copias del polinucleótido se puede obtener integrando al menos una copia adicional de la secuencia en el genoma de la célula huésped o incluyendo un gen marcador seleccionable amplificable con el polinucleótido donde se pueden seleccionar células que contienen copias amplificadas del gen marcador seleccionable, y de este modo copias adicionales del polinucleótido, cultivando las células en presencia del agente seleccionable apropiado.

[0093] Los procedimientos usados para unir los elementos anteriormente descritos para construir los vectores de expresión recombinantes de la presente invención son bien conocidos por los expertos en la técnica (ver, por ejemplo, Sambrook et al., 1989, supra).

Células huésped

[0094] La presente invención también se refiere a células huésped recombinantes, que comprenden un polinucleótido de la presente invención, que se usan beneficiosamente en la producción recombinante de los polipéptidos. Un vector que comprende un polinucleótido de la presente invención se introduce en una célula huésped de modo que el vector se mantiene como un integrante cromosómico o como un vector extracromosómico autorreplicante como se ha descrito anteriormente. El término "célula huésped" abarca cualquier descendiente de una célula madre que no es idéntico a la célula madre debido a mutaciones que ocurren durante la replicación. La elección de una célula huésped dependerá en gran medida del gen que codifica el polipéptido y su fuente.

[0095] La célula huésped puede ser un microorganismo unicelular, por ejemplo, un procarionta, o un microorganismo no unicelular, por ejemplo, un eucariota.

[0096] Microorganismos unicelulares útiles son células bacterianas tales como bacterias gram positivas que incluyen,

- pero no se limitan a, una célula de *Bacillus*, por ejemplo, *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus brevis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus clausii*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus lautus*, *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus thuringiensis*; o una célula de *Streptomyces*, por ejemplo, *Streptomyces lividans* y *Streptomyces murinus*, o bacterias gram negativas tales como *E. coli* y *Pseudomonas* sp. En un aspecto preferido, la célula huésped bacteriana es una célula de *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus stearothermophilus* o *Bacillus subtilis*. En otro aspecto preferido, la célula de *Bacillus* es un *Bacillus* alcalófilo.
- [0097] La introducción de un vector en una célula huésped bacteriana puede, por ejemplo, ser efectuado mediante transformación de protoplastos (ver, por ejemplo, Chang and Cohen, 1979, Molecular General Genetics 168: 111-115), uso de células competentes (ver, por ejemplo, Young and Spizizen, 1961, Journal of Bacteriology 81: 823-829, o Dubnau and Davidoff-Abelson, 1971, Journal of Molecular Biology 56: 209-221), electroporación (ver, por ejemplo, Shigekawa and Dower, 1988 Biotechniques 6: 742-751) o conjugación (ver, por ejemplo, Koehler and Thorne, 1987, Journal of Bacteriology 169: 5771- 5278).
- [0098] La célula huésped también puede ser un eucariota, tal como una célula de mamífero, de insecto, de planta o fúngica.
- [0099] En un aspecto preferido, la célula huésped es una célula fúngica. "Hongos" como se utiliza en este caso incluye los fila Ascomycota, Basidiomycota, Chytridiomycota y zygomycota (tal y como es definido por Hawkswort et al., In, Ainswort and Bisby's Dictionary of the Fungi, 8ª edición, 1995, CAB International, University Press, Cambridge, Reino Unido) así como los Oomycota (tal y como se cita en Hawkswort et al., 1995, supra, página 171) y todos hongos mitospóricos (Hawkswort et al., 1995, supra).
- [0100] En un aspecto más preferido, la célula huésped fúngica es una célula de levadura. "Levadura" tal y como se utiliza en este caso incluye levadura ascoesporógena (Endomycetales), levadura basidiesporogénea y levadura de los Fungi Imperfecti (Blastomicetos). Debido a que la clasificación de levaduras puede cambiar en el futuro, para fines de esta invención, la levadura se definirá como se describe en Biology and Activities of Yeast (Skinner, F.A., Passmore, S.M., and Davenport, R.R., eds, Soc. App. Bacteriol. Symposium Series No. 9, 1980).
- [0101] En un aspecto incluso más preferido, la célula huésped de levadura es una célula de *Candida*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* o *Yarrowia*.
- [0102] 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*.
- [0103] En otro aspecto más preferido, la célula huésped fúngica es una célula fúngica filamentosa. "Fúngica filamentosa" incluye todas las formas filamentosas de la subdivisión Eumycota y Oomycota (tal y como es definido por Hawkswort et al., 1995, supra). Los hongos filamentosos están generalmente caracterizados por una pared micelial compuesta por quitina, celulosa, glucano, quitosano, manano y otros polisacáridos complejos. El crecimiento vegetativo es mediante alargamiento hifal y el catabolismo de carbono es estrictamente aeróbico. En cambio, el crecimiento vegetativo por levaduras tales como *Saccharomyces cerevisiae* es mediante injerto de un talo unicelular y el catabolismo de carbono puede ser fermentativo.
- [0104] En un aspecto incluso más preferido, la célula huésped fúngica filamentosa es 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*, *Tolipocladium*, *Trametes*, o *Trichoderma*.
- [0105] En un aspecto más preferido, la célula huésped fúngica filamentosa 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 fúngica filamentosa 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 fúngica filamentosa 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*.

[0106] Las células fúngicas se pueden transformar por un proceso que implica la formación de protoplastos, la transformación de los protoplastos y la regeneración de la pared celular de una manera conocida per se. Los procedimientos adecuados para la transformación de células huésped de *Aspergillus* y *Trichoderma* son descritos en EP 238 023 y Yelton et al., 1984, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 81: 1470-1474. Los métodos Adecuados para transformar especies de *Fusarium* son descritas por Malardier et al., 1989, Gene 78: 147-156, y WO 96/00787. La levadura se puede transformar utilizando 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, volumen 194, págs 182-187, Academic Press, Inc., Nueva 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

[0107] La presente invención también se refiere a métodos para producir un polipéptido de la presente invención, que comprenden (a) cultivar una célula, que en su forma tipo salvaje es capaz de producir el polipéptido, bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido; y (b) recuperar el polipéptido. Preferiblemente, la célula es del género *Aspergillus*, y más preferiblemente *Aspergillus fumigatus*.

[0108] La presente invención también se refiere a métodos para producir un polipéptido de la presente invención, que comprenden (a) cultivar una célula huésped bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido; y (b) recuperar el polipéptido.

[0109] 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 bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, la célula se puede cultivar mediante cultivo en matraz de agitación, y fermentación a pequeña escala o a gran escala (incluyendo fermentación continua, por lote, lote alimentado o de estado sólido) en laboratorio o fermentadores industriales realizadas en un medio adecuado y bajo condiciones que permitan al polipéptido ser expresado y/o aislado. El cultivo tiene lugar 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 en proveedores comerciales o se pueden preparar según composiciones publicadas (por ejemplo, en los catálogos de la American Type Culture Collection). Si el polipéptido se segrega en el medio nutritivo, el polipéptido puede ser recuperado directamente del medio. Si el polipéptido no es segregado, puede ser recuperado de lisados celulares.

[0110] Los polipéptidos se pueden detectar 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, un ensayo enzimático se puede utilizar para determinar la actividad del polipéptido tal y como se describe en este documento.

[0111] El polipéptido resultante se puede recuperar usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, el polipéptido se puede recuperar del medio nutritivo por procedimientos convencionales que incluyen, pero que no se limitan a, centrifugado, filtración, extracción, secado por pulverización, evaporación o precipitación.

[0112] Los polipéptidos de la presente invención pueden ser purificados por una variedad de procedimientos conocida en la técnica que incluyen, pero que no se limitan a, cromatografía (por ejemplo, intercambio iónico, afinidad, hidrofóbica, cromatografía de exclusión de tamaño), procedimientos electroforéticos (por ejemplo, isoelectroenfoque preparativo), solubilidad diferencial (por ejemplo, precipitación de sulfato amónico), SDS-PAGE o extracción (ver, por ejemplo, Protein Purification, J.-C. Janson and Lars Riden, editores, VCH Publishers, Nueva York, 1989).

Composiciones

[0113] Se describen también en este documento composiciones que comprenden un polipéptido de la presente invención.

Las composiciones pueden ser enriquecidas con dicho polipéptido. El término "enriquecido" indica que la actividad de alfa-glucosidasa de la composición ha sido aumentada, por ejemplo, con un factor de enriquecimiento de 1,1.

[0114] La composición puede comprender un polipéptido de la presente invención como componente enzimático principal, por ejemplo, una composición monocomponente. Alternativamente, la composición puede comprender múltiples actividades enzimáticas, tales como aminopeptidasa, amilasa, carbohidrasa, carboxipeptidasa, catalasa, celulasa, quitinasa, cutinasa, ciclodextrina glucosiltransferasa, desoxirribonucleasa, esterasa, alfa-galactosidasa, beta-galactosidasa, glucoamilasa, alfa-glucosidasa, beta-glucosidasa, haloperoxidasa, invertasa, lacasa, lipasa, manosidasa, oxidasa, enzima pectinolítica, peptidoglutaminasa, peroxidasa, fitasa, polifenoloxidasa, enzima proteolítica, ribonucleasa, transglutaminasa o xilanas. 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 heterosporum*, *Fusarium negundi*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium reticulatum*, *Fusarium roseum*, *Fusarium sambucinum*, *Fusarium sarcochroum*, *Fusarium sulphureum*,

Fusarium toruloseum, *Fusarium trichothecioides* o *Fusarium venenatum*; *Humicola*, preferiblemente *Humicola insolens* o *Humicola lanuginosa*; o *Trichoderma*, preferiblemente *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei*, o *Trichoderma viride*.

5 [0115] Las composiciones de polipéptido pueden ser preparadas conforme a métodos conocidos en la técnica y pueden ser en forma de composición líquida o seca. Por ejemplo, la composición de polipéptido puede estar en forma de un granulado o un microgranulado. El polipéptido que va a ser incluido en la composición se puede estabilizar conforme a métodos conocidos en la técnica.

10 [0116] Se dan más adelante ejemplos de usos preferidos de las composiciones del polipéptido de la invención. La dosificación de la composición de polipéptido de la invención y otras condiciones bajo las cuales la composición se usa pueden ser determinadas basándose en métodos conocidos en la técnica.

Usos

15 [0117] En este documento se describen también métodos para usar los polipéptidos con actividad de alfa-glucosidasa.

[0118] Los polipéptidos de la presente invención se pueden usar en la producción de alcohol a partir de granos de cereal según DE 2944483.

20 [0119] Los polipéptidos de la presente invención también se pueden usar para producir bebidas fermentadas de malta, por ejemplo, cerveza (baja en calorías), según WO 2002/55652 (solicitud de patente estadounidense 20040101591 publicada). Bebidas fermentadas de malta con sabor reforzado e intensidad que llena la boca se pueden producir añadiendo un polipéptido con actividad de alfa-glucosidasa antes del tratamiento térmico en un proceso de producción de mosto en el curso de la fabricación de bebidas fermentadas de malta. Se pueden fabricar cervezas bajas en calorías en las cuales un polipéptido con actividad de alfa-glucosidasa se añade en el proceso de fermentación en la elaboración de cerveza. Se puede reducir la producción de ácido acético añadiendo un polipéptido con actividad de alfa-glucosidasa en el proceso de fermentación en la elaboración de cerveza por alta gravedad.

30 [0120] En la fabricación de cervezas, el almidón derivado de ingredientes que incluyen malta es hidrolizado por hidrolasas (por ejemplo, alfa-amilasa, beta-amilasa) y azúcares fermentables tales como glucosa, maltosa y maltotriosa, que una levadura de cerveza puede metabolizar, se producen oligosacáridos más grandes que maltotetraosa y dextrina. Los azúcares fermentables son luego metabolizados por la levadura de cerveza (u otra levadura) y convertidos en distintos componentes de la cerveza tales como el alcohol. Los oligosacáridos más grandes que maltotetraosa y dextrina pueden permanecer en la cerveza sin estar metabolizados y pueden participar en el sabor envolvente y la intensidad en la boca de las bebidas.

35 [0121] Se describen métodos para producir una bebida fermentada de malta, donde un polipéptido con actividad de alfa-glucosidasa de la presente invención se añade antes del tratamiento térmico del mosto en un proceso de producción de mosto para la fabricación de una bebida fermentada de malta. La cantidad del polipéptido con actividad de alfa-glucosidasa usado es 50-400 ppm por cantidad de malta. El polipéptido con actividad de alfa-glucosidasa se añade simultáneamente con la malta molida. El polipéptido con actividad de alfa-glucosidasa se añade a la masa antes del tratamiento térmico en el proceso de producción de mosto. El polipéptido con actividad de alfa-glucosidasa se añade en el proceso de malteado. Solo la malta se usa como ingrediente. La malta y sus complementos se usan como ingredientes de azúcar.

40 [0122] El método se refiere a la producción de una cerveza, donde un polipéptido con actividad de alfa-glucosidasa de la presente invención se añade al proceso de fermentación en la elaboración de la cerveza. La cerveza es una cerveza baja en calorías o cerveza light. La adición del polipéptido con actividad de alfa-glucosidasa reduce la producción de ácido acético. La concentración de extracto original de mosto está por encima del 10 y no mayor que el 30 % en peso. La cantidad de polipéptido con actividad de alfa-glucosidasa usado es 50-400 ppm por cantidad de malta.

Péptido señal

55 [0123] Se describen constructos de ácidos nucleicos que comprenden un gen que codifica una proteína operativamente enlazado a una secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos 1 a 57 de la SEC ID nº 5 que codifica un péptido señal que consiste en los aminoácidos 1 a 19 de la SEC ID nº 6, donde el gen es extranjero a la secuencia de nucleótidos.

60 [0124] Se describen también vectores de expresión y células huésped recombinantes que comprenden tales constructos de ácidos nucleicos.

[0125] La presente invención es además descrita por los siguientes ejemplos que no deberían interpretarse como limitación del alcance de la invención.

65 Ejemplos

Materiales

5 [0126] Los productos químicos usados como tampones y sustratos fueron productos comerciales de al menos calidad reactiva.

Cepas

10 [0127] La cepa BECh2 de *Aspergillus oryzae* (Δalp , *Aamy*, CPA-, KA, $\Delta na1$) fue usada para la expresión de las alfa-glucosidasas de *Aspergillus fumigatus*.
PaHa34 de *Aspergillus fumigatus* fue usada como fuente de alfa-glucosidasas.

Medios

15 [0128] El medio de dextrosa de patata estaba compuesta de 24 gramos de caldo de dextrosa de patata por litro.

[0129] Las placas de COVE estaban compuestas de 342,3 g de sacarosa, 20 ml de solución salina de COVE, 10 ml de acetamida 1 M, 10 ml de CsClZ 1,5 M y 25 g de agar noble por litro.

20 [0130] La solución salina de COVE estaba compuesta de 26 g de KCl, 26 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 76 g de KH_2PO_4 y 50 ml de solución de metales traza de COVE por litro.

25 [0131] La solución de metales traza de COVE estaba compuesta de 0,04 g de $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$, 0,4 g de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 1,2 g de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,7 g de $MnSO_4 \cdot H_2O$, 0,8 g de $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ y 10 g de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ por litro.

[0132] El medio MY25 estaba compuesto de 25 g de maltodextrina, 2 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 10 g de KH_2PO_4 , 2 g de ácido cítrico, 2 g de K_2SO_4 , 2 g de urea, 10 g de extracto de levadura y 1,5 ml solución de metales traza AMG, ajustados a pH 6 por litro.

30 [0133] La solución de metales traza AMG estaba compuesta de 14,3 g de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 2,5 g de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 0,5 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 g de ácido cítrico por litro.

[0134] El medio LB estaba compuesto de 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura y 5 g de NaCl por litro.

35 [0135] El medio 2X YT estaba compuesto de 16 g de triptona, 10 g de extracto de levadura y 5 g de NaCl. Las placas de 2X YT estaban compuestas de 16 g de triptona, 10 g de extracto de levadura, 5 g de NaCl y 15 g de agar noble por litro.

[0136] El medio SOC estaba compuesto de 20 g de triptona, 5 g de extracto de levadura, 2 ml de NaCl 5M y 2,5 ml de KCl 1M por litro.

40 [0137] El tampón TAE estaba compuesto por Tris base 40 mM, acetato sódico 20 mM y de EDTA disódico 1 mM y pH 7,2.

Ejemplo 1: identificación de genes de alfa-glucosidasa en la secuencia genómica de *Aspergillus fumigatus*

45 [0138] Un búsqueda tfasty (Pearson, W.R., 1999, en Bioinformatics Methods and Protocols, S. Misener y S. A. Krawetz, ed., págs. 185-219) de la secuencia parcial del genoma de *Aspergillus fumigatus* (The Institute for Genomic Research, Rockville, MD) se efectuó usando como query una secuencia de proteínas de alfa-glucosidasa de *Aspergillus nidulans* (Nº de acceso Q9UV08).

50 Varios genes fueron identificados como homólogos putativos basados en la similitud a la secuencia de la query al nivel de los aminoácidos.

Se identificaron tres regiones genómicas de aproximadamente 3000 pares de bases con 34,9, 51,4 y 77,5% de identidad con la secuencia de la query al nivel de los aminoácidos.

Ejemplo 2: Extracción de ADN genómico de *Aspergillus fumigatus*

60 [0139] El *Aspergillus fumigatus* fue crecido en 250 ml de medio de dextrosa de patata en un matraz de agitación disipado a 37°C y 240 r.p.m. Los micelios fueron cosechados por filtración, lavados dos veces en TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM) y congelados en nitrógeno líquido. Los micelios congelados fueron molidos mediante mortero, a un polvo fino, que fue resuspendido en tampón pH 8,0 que contiene Tris 10 mM, EDTA 100 mM, Tritón X-100 del 1%, guanidina-HCl 0,5 M y NaCl 200 mM. La ribonucleasa pancreática sin ADNs fue añadida con una concentración de 20 mg/litro y el lisado fue incubado a 37°C durante 30 minutos. Los restos celulares fueron retirados por centrifugado, y el ADN fue aislado usando Qiagen Maxi 500 columnas (QIAGEN Inc., Valencia, CA). Las columnas fueron equilibradas en 10 ml de QBT, lavadas con 30 ml de QC y eluidas con 15 ml de QF (todos tampones eran de QIAGEN Inc., Valencia, CA). El ADN fue precipitado en isopropanol, lavado en etanol del 70% y recuperado mediante centrifugado. El ADN fue resuspendido en tampón TE.

Ejemplo 3: construcción del vector de expresión pAILo1

5 [0140] El vector de expresión pAILo1 fue construido modificando pBANE6 (US Patent nº 6,461,837), que comprende un híbrido de los promotores de los genes para alfa-amilasa neutra de *Aspergillus niger* y triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus oryzae* (promotor NA2-tpi), la secuencia terminadora de amiloglucosidasa de *Aspergillus niger* (terminador AMG) y el gen de acetamidasa de *Aspergillus nidulans* (amdS). Todos los pasos de la mutagénesis fueron verificados mediante secuenciación usando la química de terminador Big-Dye™ como se describe.

10 La modificación de pBANE6 fue realizada primero eliminando tres sitios de restricción de Nco I en las posiciones de los pares de bases 2051, 2722 y 3397 del marcador de selección amdS mediante mutagénesis dirigida. Todos los cambios fueron diseñados para ser "silenciosos" dejando la secuencia de proteína real del producto génico de amdS sin cambios. La eliminación de estos tres sitios fue realizada simultáneamente con un equipo de mutagénesis dirigida in vitro de GeneEditor™ (Promega, Madison, WI) según las instrucciones del fabricante usando los siguientes cebadores (el nucleótido subrayado representa la base cambiada):

15 AMDS3NcoMut (2050): 5'-GTGCCCATGATACGCCTCCGG-3' (SEC ID nº 7)
 AMDS2NcoMut (2721): 5'-GAGTCGATTTCCAAGGCTCCTGACC-3' (SEC ID nº 8)
 AMDS1NcoMut (3396): 5'-GGAGCCATGAAGTGGACCAACGG-3' (SEC ID nº 9)

20 [0141] Un plásmido que comprende los tres cambios previstos de secuencia fue luego sometido a mutagénesis dirigida, usando un kit de mutagénesis dirigida de QuickChange™ (Stratagene, La Jolla, CA), para eliminar el sitio de restricción Nco I al final del terminador AMG en la posición 1643.

Los siguientes cebadores (el nucleótido subrayado representa la base cambiada) fueron usados para la mutagénesis:

25 El cebador superior para mutagenizar la secuencia terminadora AMG:

5'-CACCGTAAAGCCATGCTCTTTCTTCGTGTAGAAGACCAGACAG-3' (SEC ID nº 10)

El cebador inferior para mutagenizar la secuencia terminadora AMG:

30 5'-CTGGTCTTCTACACGAAGGAAAGAGCATGGCTTTCACGGTGTCTG-3' (SEC ID nº 11)

[0142] El último paso en la modificación de pBANE6 fue la adición de un sitio de restricción Nco I nuevo al principio del poliligador usando un kit de mutagénesis dirigida de QuickChange™ y los siguientes cebadores (los nucleótidos subrayados representan las bases cambiadas) para producir pAILo1 (Figura 4).

35 El cebador superior para mutagenizar el promotor NA2-tpi:

5'-CTATATACACAACCTGGATTTACCATGGGCCCGCGGCCGAGATC-3' (SEC ID nº 12)

40 Cebador inferior para mutagenizar el promotor NA2-tpi:

5'-GATCTGCGGCCGCGGGCCCATGGTAAATCCAGTTGTGTATATAG-3' (SEC ID nº 13)

Ejemplo 4: construcción del vector de expresión pBM120a

45 [0143] El plásmido pBM120a fue construido para obtener un plásmido con el doble promotor NA2 (NA2- NA2-tpi) para conducir la expresión génica en las especies de *Aspergillus*, y con el gen de resistencia de ampicilina para la selección en *E.coli*.

50 [0144] Los cebadores fueron diseñados para amplificar por PCR el promotor doble NA2 de pJaL721 (WO 03/008575). Los sitios enzimáticos de restricción Sal I y Nco I (subrayados) fueron añadidos para clonar el promotor doble en el plásmido de expresión de *Aspergillus* pAILo1.

55 5'-GTCGACATGGTGTGTTTTGATCATTTTA-3' (SEC ID nº 14)
 5'-CCATGGCCAGTTGTGTATATAGAGGA-3' (SEC ID nº 15)

60 [0145] El fragmento de interés fue amplificado por PCR usando el Expand High Fidelity PCR System (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). La reacción de amplificación de PCR contenía un 1 µl de 0,09 µg de pJaL721 por µl, 1 µl de cada uno de los cebadores (50 pmol/µl), 5 µl de tampón de PCR 10X con MgCl₂ 15 mM, 1 µl de mezcla de dNTP (10 mM cada uno), 37,25 µl de agua y 0,75 µl (3,5U/µl) de mezcla de ADN polimerasa. Un termociclador Mastercycler de Eppendorf (Hamburgo, Alemania) se usó para amplificar el fragmento con los siguientes ajustes: 1 ciclo a 94°C durante 2 minutos; 10 ciclos cada uno a 94°C durante 15 segundos, 55°C durante 30 segundos, 72°C durante 1,25 minutos; 15 ciclos cada uno a 94°C durante 15 segundos, 55°C durante 30 segundos, 72°C durante 1,25 minutos más una prolongación de 5 segundos en cada ciclo sucesivo; 1 ciclo a 72°C durante 7 minutos; y mantenido a 10°C. Diez microlitros de esta reacción de PCR fueron mezclados con 1 µl de tinte de carga de ADN 10X (glicerol del 25%, Tris 10 mM y pH 7,0, EDTA 10 mM, bromofenol azul del 0,025%, xileno cianol del 0,025%) y corren en un gel de

5 agarosa del 1,0% (p/v) usando Tris base 40 mM, acetato de sodio 20 mM y tampón EDTA disódico (TAE) 1 mM. El par de bases 1128 producto de PCR de fue observado con luz UV en un sistema de visualización de gel Nucleotech (Nucleotech, San Mateo, CA). El producto de PCR fue directamente ligado en pPC2.1-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA) según las instrucciones del fabricante. Un volumen de 1 µl de producto PCR limpio, 3 µl de agua destilada doble y 1 µl del vector de clonación TOPO fueron mezclados con una pipeta e incubados en la parte superior del banco durante 5 minutos.

10 [0146] Después de la incubación, 2 µl de la mezcla fueron usados para transformar células OneShot competentes de *E. coli* (Invitrogen, Carlsbad, CA). Un volumen de 2 µl de la mezcla de ligado fue añadido a las células de *E. coli* e incubado en el hielo durante 5 minutos. Posteriormente, las células fueron tratadas con calor durante 30 segundos a 42°C y luego colocadas en hielo durante 2 minutos. Un volumen de 250 µl de medio SOC se añadió a estas células y la mezcla fue incubada durante 1 hora a 37°C y 250 r.p.m. Después de la incubación las colonias fueron esparcidas en placas 2X YT suplementadas con 100 µg de ampicilina por ml e incubadas a 37°C durante toda la noche para la selección del plásmido. Ocho colonias que crecieron en las placas fueron escogidas con un palillo esterilizado y crecidas durante toda la noche a 37°C y 250 r.p.m. en un tubo Falcon de 15 ml que contiene 3 ml de medio LB suplementado con 100 µg de ampicilina por ml. Los plásmidos fueron aislados utilizando un BioRobot 9600 (QIAGEN Inc., Valencia, CA).

20 [0147] Volúmenes de cuatro µl de las minipreps del plásmido resultante fueron digeridos con Eco RI. Las reacciones de digestión fueron analizadas por cromatografía en gel de agarosa y análisis UV tal y como se ha descrito anteriormente para la reacción por PCR. Los plásmidos aislados que contenían un inserto fueron secuenciados usando 1 µl de plantilla de plásmido, 1,6 ng de cebador M13 (directo o inverso) (MWG Biotech; High Point; NC) y agua a 6 µl. La secuenciación del ADN fue realizada con un secuenciador XL modelo 377 de Applied Biosystems usando química de colorante-terminador. El plásmido resultante fue denominado pBM121b (figura 5).

25 [0148] Un 5 volumen de µl de pBM121b fue digerido con Sal I y Nco I. Las reacciones de digestión fueron analizadas por electroforesis en gel de agarosa como se ha descrito anteriormente, y ligadas al vector pAILol, que había sido previamente dividido con Sal I y Nco I. El plásmido de expresión resultante fue denominado pBM120a (figura 6).

30 Ejemplo 5: Clonación de un gen de alfa-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus* agl1

[0149] Dos cebadores de oligonucleótidos sintéticos mostrados a continuación fueron diseñados para amplificar por PCR un gen de *Aspergillus fumigatus* denominado agl1 que codifica un gen de alfa-glucosidasa del ADN genómico preparado en el ejemplo 2.

35 Cebador directo: 5'-TACACAACCTGGCCATGTTGAGATCGCTGC-3' (SEC ID nº 16)

Cebador inverso: 5'-GTCACCTCTAGTAACTAAGCTGAGGTCAATCTCGG-3' (SEC ID nº 17)

Las letras en negrita representan la secuencia codificante. La secuencia restante fue añadida para sitios de clonación.

40 [0150] El fragmento de interés fue amplificado por PCR usando el Expand High Fidelity PCR System. Cincuenta picomoles de cada uno de los cebadores anteriores que contenían 200 ng de ADN genómico de *Aspergillus fumigatus* fueron usados en una reacción de PCR. La mezcla de la reacción de amplificación de PCR también contenía tampón PCR 1X con MgCl₂ 1,5 mM, 1 µl de mezcla de dNTP (10 mM cada uno) y 0,75 µl (3,5 U/µl) de mezcla de ADN polimerasa (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) en un volumen final de 50 µl. Un termociclador Mastercycler de Eppendorf fue usado para amplificar el fragmento con los siguientes ajustes: 1 ciclo a 94°C durante 2 minutos; 10 ciclos cada uno a 94°C durante 15 segundos, 58,1°C durante 30 segundos, 72°C durante 2 minutos y 5 segundos; 15 ciclos cada uno a 94°C durante 15 segundos, 58,1°C durante 30 segundos y 72°C durante 2 minutos y 5 segundos más una prolongación de 5 segundos en cada ciclo sucesivo; 1 ciclo a 72°C durante 7 minutos; y mantenido a 10°C.

50 [0151] Los productos de la reacción fueron aislados en gel de agarosa del 1,0% usando tampón TAE y una banda de aproximadamente 3,0 kb de producto fue cortada del gel y purificada utilizando un kit de extracción de gel QIAquick (QIAGEN Inc., Valencia, CA) según las instrucciones del fabricante.

55 [0152] El fragmento fue luego clonado en pBM120a utilizando un kit de clonación InFusion (BD Biosciences, Palo Alto, CA). El vector fue digerido con Nco I y Pac I. Tanto el vector digerido como el fragmento de PCR fueron purificados por electroforesis en gel y extracción de gel QIAquick tal y como se ha descrito anteriormente. El fragmento de gen y vector digerido fueron ligados en una reacción que daba como resultado el plásmido de expresión pSMO216mu en el cual la transcripción del gen de alfa-glucosidasa estaba bajo el control del promotor NA2-tpi en tándem. La reacción de ligado (20 µl) fue compuesta por tampón de InFusion 1X (BD Biosciences, Palo Alto, CA), BSA 1X (BD Biosciences, Palo Alto, CA), 1 µl de enzima de infusión (diluida 1:10) (BD Biosciences, Palo Alto, CA), 40 ng de pBM120a digerido con Pac I y Nco I y 25 ng del producto de PCR purificado por alfa-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus*. La reacción fue incubada a temperatura ambiente durante 30 minutos. Dos µl de la reacción fueron usados para transformar células OneShot competentes de *E. coli* (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA). Un transformante de *E. coli* que contiene pSMO216mu fue detectado por digestión de restricción y el ADN del plásmido se preparó utilizando un BioRobot 9600.

60 Ejemplo 6: caracterización de la secuencia genómica de *Aspergillus fumigatus* que codifica un gen de una alfa-glucosidasa agl1

5 [0153] La secuenciación del ADN del gen de alfa-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus* agl1 de pSMO216mu fue realizada con un secuenciador de ADN automatizado Perkin-Elmer modelo 377 XL de Applied Biosystems (Perkin-Elmer/Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA) usando química de colorante-terminador (Giesecke et al., 1992, Journal of Virology Methods 38: 47-60) y la estrategia de paseo del cebador. Los datos de la secuencia de nucleótidos fueron

10 [0154] El análisis de secuencias de pSMO216mu reveló un cambio de 1 par de bases respecto de la secuencia predicha. La traducción de la secuencia de ADN a proteínas resultó en 1 cambio de aminoácido en la posición 367. La mutagénesis dirigida fue usada para cambiar el aminoácido de nuevo a la secuencia predicha.

Ejemplo 7: mutagénesis dirigida del gen de alfa-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus* agl1

15 [0155] Para cambiar la mutación del aminoácido en la posición 367, se diseñaron los cebadores de oligonucleótidos sintéticos mostrados a continuación para amplificar por PCR el gen de alfa-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus* agl1 usando un equipo de mutagénesis dirigida de QuikChange (Stratagene, La Jolla, CA)
 5'-GCATGGAGCAGGGCATCTTCCTGCAGACTC-3' (SEC ID nº 18)
 5'-GAGTCTGCAGGAAGATGCCCTGCTCCATGC-3' (SEC ID nº 19)

20 [0156] Cien nanogramos de cada uno de los cebadores anteriores fueron usados en una reacción PCR que contenía 10 ng de pSMO216mu, tampón de reacción de QuikChange 1X (Stratagene, La Jolla, CA), 3 µl de QuikSolution (Stratagene, La Jolla, CA), 1 µl de mezcla de dATP, dTTP dGTP y dCTP 10 mM y 1 µl de 2,5 U/µl enzima Ultra Pfu (Stratagene, La Jolla, CA), en un volumen final de 50 µl. Un termociclador Mastercycler de Eppendorf fue usado con los siguientes ajustes: un ciclo a 95°C durante 1 minuto; 30 ciclos cada uno a 95°C durante 1 minuto, 55°C durante 1 minuto y 65°C durante 14 minutos. El bloqueo de calor luego pasó a un ciclo de remojo a 10°C. Un microlitro de Dpn I fue directamente añadido a la reacción de amplificación e incubado a 37°C durante 1 hora. Un volumen de 2 µl de la reacción de digestión de Dpn I fue usado para transformar células ultracompetentes de *E. coli* XL10-Gold (Stratagene, La Jolla, CA). Un transformante de *E. coli* que contiene el plásmido pSMO216 fue detectado por digestión de restricción y el ADN del plásmido fue preparado utilizando un BioRobot 9600. El análisis de secuencias verificó los cambios de pares de bases dando como resultado el plásmido pSMO216 (Figura 7).

35 [0157] Las células ultracompetentes de *E. coli* XL10-Gold que contienen pSMO216 fueron depositadas con la colección de Agricultural Research Service Patent Culture Collection, Northern Regional Research Center, 1815 University Street, Peoria, Illinois, 61604, como NRRL B-30751, con fecha de depósito del 17 de junio de 2004.

40 [0158] Modelos génicos para las secuencias fueron construidas basándose en el resultado de tfasty y el alineamiento con genes homólogos de *Aspergillus oryzae*. La secuencia de nucleótidos (SEC ID nº 1) y la secuencia de aminoácidos deducida (SEC ID nº 2) se muestran en la figura 1. El fragmento genómico codifica un polipéptido de 881 aminoácidos, interrumpido por 6 intrones de 49 pares de bases (nucleótidos 211 a 260), 52 pares de bases (nucleótidos 820 a 872), 54 pares de bases (nucleótidos 1063 a 1117), 51 pares de bases (nucleótidos 1135 a 1186), 49 pares de bases (nucleótidos 1592 a 1643) y 51 pares de bases (nucleótidos 1702 a 1753). El contenido G+C% del gen agl1 es 57,4%. Usando el programa de software SignalP (Nielsen et al., 1997, Protein Engineering 10: 1-6), se predijo un péptido señal de 14 residuos. La proteína madura predicha contiene 867 aminoácidos con una masa molecular de 98,8 kDa.

45 [0159] Un alineamiento comparativo de secuencias de alfa-glucosidasa fue determinado utilizando el método Clustal W (Higgins, 1989, CABIOS 5: 151-153) utilizando el Software de LASERGENE™ MEGALIGN™ (DNASTAR, Inc., Madison, WI) con una tabla de identidad y los siguientes parámetros de alineamiento múltiple: penalización de gap de 10 y penalización de longitud de gap de 10. Los parámetros de alineamiento por parejas eran Ktuple=1, penalización de gap=3, ventanas=5 y diagonales=5. El alineamiento mostró que la secuencia de aminoácidos deducida de la alfa-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus* (Agl1) comparte un 67% de identidad con la secuencia de aminoácidos deducida de la alfa-glucosidasa de *Aspergillus nidulans* (EMBL AB057788).

Ejemplo 8: expresión del gen de alfa-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus* agl1 en *Aspergillus oryzae* BECh2

55 [0160] Se prepararon protoplastos de *Aspergillus oryzae* BECh2 según el método de Christensen et al., 1988, Bio/Technology 6: 1419-1422. Se usaron un total de 5 µg de pSMO216 para transformar *Aspergillus oryzae* BECh2.

60 [0161] La transformación de *Aspergillus oryzae* BECh2 con pSMO216 produjo 20 transformantes. Los 20 transformantes fueron transferidos a placas de COVE individuales. Se recogieron esporas de los 20 transformantes en 4 ml de 0,01% Tween 20 y 200 µl de la suspensión de esporas fueron inoculados separadamente en 25 ml de medio MY25 en matraces de agitación de plástico de 125 ml e incubados a 34°C y 250 r.p.m. Tres y cinco días después de la inoculación, los sobrenadantes de cultivo fueron ensayados para actividad de alfa-glucosidasa como se describe más adelante.

65 [0162] Los sobrenadantes de cultivo de 100 µl fueron diluidos en tampón de acetato sódico 0,1 M y pH 4,3. Un estándar de AMG obtenido de Novozymes A/S, Bagsværd, Dinamarca, fue diluido usando pasos dobles partiendo con una

concentración de 0,033 AGU/ml y finalizando con una concentración 0,0042 AGU/ml en tampón de acetato sódico 0,1 M y pH 4,3. Cien microlitros de una solución de maltosa de 20 mg/ml fueron añadidos a cada pocillo y luego incubados a 25°C durante 180 minutos. Tras completar el paso de incubación, se añadieron 200 µl de una solución de NaOH 0,06 N a cada pocillo para extinguir la reacción. Un total de 30 µl de la reacción extinguida fueron transferidos de cada pocillo y colocados en una nueva placa de 96 pocillos seguido de la adición de 200 µl de reactivo de glucosa líquido (oxidasa) (Pointe Scientific, Inc, Lincoln Park, Michigan, EE.UU) a cada pocillo e incubados a temperatura ambiente durante 18 minutos. Tras completar la incubación, se midió la absorbancia a 505 nm de la placa de 96 pocillos usando un Spectra Max 349 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Las concentraciones de las muestras fueron determinadas por extrapolación de la curva estándar generada. El contenido de glucosa presente en el medio fue normalizado midiendo independientemente la glucosa en el caldo de muestra mediante Reactivo de Glucosa Líquida sin añadir maltosa. La absorbancia fue sustraída del valor de los reactivos donde se añadió el sustrato de maltosa.

[0163] Los resultados de los ensayos demostraron que cerca de la mitad de los transformantes expresaron actividad de alfa-glucosidasa. Un transformante designado SMO17 de *Aspergillus oryzae* fue cultivado como se ha descrito anteriormente en medio MY25 para suministrar enzima para purificación y caracterización.

Ejemplo 9: clonación de un gen de alfa-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus* agl2

[0164] Dos cebadores de oligonucleótidos sintéticos mostrados a continuación fueron diseñados para amplificar por PCR un gen de *Aspergillus fumigatus* denominado agl2 que codifica una alfa-glucosidasa del ADN genómico preparado en el ejemplo 2.

Cebador directo: 5'-ACACAACCTGGCCATGGCCCGGAGCAGCTCGTC-3' (SEC ID nº 20)

Cebador inverso: 5'-AGTCACCTCTAGTTAATTAATTAGAATTCAATCTTCCATG-3' (SEC ID nº 21)

Las letras en negrita representan secuencia codificante. La secuencia restante se añade para sitios de clonación.

[0165] El fragmento de interés fue amplificado por PCR usando el Expand High Fidelity PCR System. Cincuenta picomoles de cada uno de los cebadores anteriores fueron usados en una reacción PCR que contenía 200 ng de ADN genómico de *Aspergillus fumigatus*. La mezcla de la reacción de amplificación de PCR también contenía tampón PCR 1X con MgCl₂ 1,5 mM, 1 µl de mezcla de dNTP (10 mM cada uno) y 0,75 µl (3,5U/µl) de mezcla de ADN polimerasa en un volumen final de 50 µl. Un termociclador Mastercycler de Eppendorf fue usado para amplificar el fragmento con los siguientes ajustes: 1 ciclo a 94°C durante 2 minutos; 10 ciclos cada uno a 94°C durante 15 segundos, 58,1°C durante 30 segundos, 72°C durante 2 minutos y 5 segundos; 15 ciclos cada uno a 94°C durante 15 segundos, 58,1°C durante 30 segundos, 72°C durante 2 minutos y 5 segundos más 5 segundos de prolongación en cada ciclo sucesivo; 1 ciclo a 72°C durante 7 minutos; y mantenido a 10°C.

[0166] Los productos de la reacción fueron aislados en un gel de agarosa del 1,0% usando tampón TAE y una banda de aproximadamente 3,0 kb de producto fue cortada del gel y purificada utilizando un kit de extracción de gel QIAquick (QIAGEN Inc., Valencia, CA) según las instrucciones del fabricante.

[0167] El fragmento fue luego clonado en el vector pCR2.1-TOPO (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA). El fragmento de gen fue purificado por un kit de limpieza de PCR (QIAGEN Inc., Valencia, CA). El fragmento y el vector pCR2.1-TOPO fueron ligados usando condiciones especificadas por el fabricante dando como resultado el plásmido pHyGe011mu. Dos µl de la reacción fueron usados para transformar células OneShot competentes de *E. coli*. Un transformante de *E. coli* que contiene el plásmido pHyGe011mu fue detectado por digestión de restricción y el ADN del plásmido se preparó utilizando un BioRobot 9600.

Ejemplo 10: caracterización de la secuencia genómica de *Aspergillus fumigatus* que codifica un gen de alfa-glucosidasa agl2

[0168] La secuenciación del ADN del gen de alfa-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus* agl2 de pHyGe011mu fue realizada con un secuenciador de ADN automatizado Perkin-Elmer modelo 377 XL de Applied Biosystems (Perkin-Elmer/Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA) usando química de terminador-colorante (Giesecke et al., 1992, Journal of Virology Methods 38: 47-60) y la estrategia de paseo del cebador. Los datos de la secuencia de nucleótidos fueron escrutados para mayor calidad y todas las secuencias fueron comparadas entre sí con ayuda del software PHRED/PHRAP (universidad de Washington, Seattle, WA).

[0169] El análisis de secuencias de pHyGe011mu reveló 7 cambios de pares de bases respecto de la secuencia predicha. La traducción de la secuencia de ADN a proteínas dio como resultado 3 cambios de aminoácidos en las posiciones 140, 530 y 941. Se usó la mutagénesis dirigida para cambiar los tres aminoácidos de nuevo a la secuencia predicha.

Ejemplo 11: mutagénesis dirigida del gen de alfa-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus* agl2

[0170] Para cambiar las tres mutaciones de aminoácidos en las posiciones 140, 530 y 941, tres cebadores de oligonucleótidos sintéticos mostrados a continuación fueron diseñados para amplificar por PCR el gen de alfa-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus* agl2 que contienen cinco cambios de pares de bases usando un equipo de mutagénesis dirigida de QuikChange.

5'-CGCGCAGCTCCAGACTCCAGGAAAGAAATCAC-3' (SEC ID nº 22)

5'-GTACTTGAACAAGCCGGTCCACCATTTGATTG-3' (SEC ID nº 23)

5'-GCCTGCCTGCTGGGCGTGATACTCCAAGGGTG-3' (SEC ID nº 24)

5

[0171] Cien nanogramos de cada uno de los cebadores anteriores fueron usados en una reacción PCR que contenía 100 ng de pHyGe011mu, tampón de reacción de QuikChange 1X, 0,75 µl de QuikSolution, 1 µl de mezcla de dATP, dTTP dGTP y dCTP 10 mM, 1 µl de mezcla multienzimática de QuikChange, en un volumen final de 50 µl. Un termociclador Mastercycler de Eppendorf fue usado con los siguientes ajustes: un ciclo a 95°C durante 1 minuto; 30 ciclos cada uno a 95°C durante 1 minuto, 55°C durante 1 minuto y 65°C durante 14 minutos. El bloqueo de calor luego pasó a un ciclo de remojo a 10°C. Un microlitro de Dpn I fue directamente añadido a la reacción de amplificación e incubado a 37°C durante 1 hora. Un volumen de 2 µl de la reacción de digestión de Dpn I fue usado para transformar células ultracompetentes de *E. coli* XL10-Gold. Un transformante de *E. coli* con el plásmido pHyGe011 fue detectado por digestión de restricción y el ADN del plásmido se preparó utilizando un BioRobot 9600. El análisis de secuencias verificó los cambios en los pares de bases dando como resultado el plásmido pHyGe011 (Figura 8).

10

15

[0172] Las *E. coli* XL10-Gold que contienen plásmido pHyGe011 fueron depositadas en la colección de Agricultural Research Service Patent Culture Collection, Northern Regional Research Center, 1815 University Street, Peoria, Illinois, 61604, como NRRL B-30750, con fecha de depósito del 10 de junio de 2004.

20

[0173] Modelos génicos para las secuencias fueron construidos basándose en el resultado tfasty y el alineamiento con genes homólogos de *Aspergillus oryzae*. La secuencia de nucleótidos (SEC ID nº 3) y la secuencia de aminoácidos deducida (SEC ID nº 4) se muestran en la Figura 2. El fragmento genómico codifica un polipéptido de 967 aminoácidos, interrumpido por 2 intrones de 58 (nucleótidos 85 a 142) y 54 pares de bases (nucleótidos 899 a 952). El contenido G+C% del gen es 51,2%. Usando el programa de software SignalP (Nielsen et al., 1997, Protein Engineering 10: 1-6), se predijo un péptido señal de 29 residuos. La proteína madura predicha contiene 938 aminoácidos con una masa molecular de 106,5 kDa.

25

[0174] Un alineamiento comparativo de secuencias de alfa-glucosidasa fue determinado utilizando el método Clustal W (Higgins, 1989, CABIOS 5: 151-153) utilizando el software de LASERGENE™ MEGALIGN™ (DNASTAR, Inc., Madison, WI) con una tabla de identidad y los siguientes parámetros de alineamiento múltiple: penalización de gap de 10 y penalización de longitud de gap de 10. Los parámetros de alineamiento por parejas eran Ktuple=1, penalización de gap=3, ventanas=5 y diagonales=5.

30

El alineamiento mostró que la secuencia de aminoácidos deducida de la alfa-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus* (Agl2) comparte un 71% de identidad con las secuencias de aminoácidos deducidas de una alfa-glucosidasa putativa de *Neurospora crassa* (número de acceso SWALL Q8NIY3). Ejemplo. 12: construcción de un vector de expresión de *Aspergillus oryzae* para el gen de alfa-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus* agl2

35

[0175] El gen de alfa-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus* agl2 fue clonado en el vector de expresión pBM120a. El fragmento de gen fue liberado de pHyGe011 por digestión con Pac I y Nco I y luego purificado por electroforesis en gel y purificación de gel QIAquick tal y como se ha descrito anteriormente. El vector pBM120a fue digerido con Nco I y Pac I. El fragmento de gen y el vector digerido fueron ligados utilizando un kit de ligado rápido de ADN (Boehringer Mannheim, Alemania) dando como resultado el plásmido de expresión pHyGe002 en el cual la transcripción del gen de alfa-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus* estaba bajo el control del promotor NA2-tpi en tándem. Cinco microlitros de la reacción fueron usados para transformar células competentes de *E. coli* XL1-Blue Subcloning-Grade (Stratagene, La Jolla, CA). Un transformante de *E. coli* que contenía el plásmido pHyGe002 fue detectado por digestión de restricción y el ADN del plásmido se preparó utilizando un BioRobot 9600.

40

45

Ejemplo 13: expresión del gen de alfa-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus* agl2 en *Aspergillus oryzae* BECh2

50

[0176] Se prepararon protoplastos de *Aspergillus oryzae* BECh2 según el método de Christensen et al., 1988, supra. Un total de 7,3 µg de pHyGe002 se usaron para transformar *Aspergillus oryzae* BECh2.

[0177] La transformación de *Aspergillus oryzae* BECh2 con pHyGe002 produjo 24 transformantes. Los 24 transformantes fueron transferidos a placas de COVE individuales. Se recogieron esporas de 24 transformantes en 4 ml de Tween 20 del 0,01% y 200 µl de la suspensión de esporas fueron inoculados separadamente en 25 ml de medio MY25 en matraces de agitación de plástico de 125 ml e incubados a 34°C y 250 r.p.m. Tres y cinco días después de la inoculación, los sobrenadantes de cultivo fueron ensayados para actividad de alfa-glucosidasa como se describe en el ejemplo 8.

55

60

[0178] Los resultados de los ensayos han demostrado que cerca de mitad de los transformantes expresaron actividad de alfa-glucosidasa.

Ejemplo 14: clonación de un gen de alfa-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus* agl3

65

[0179] Dos cebadores de oligonucleótidos sintéticos mostrados a continuación fueron diseñados para amplificar por

PCR un gen de *Aspergillus fumigatus* denominado agl3 que codifica una alfa-glucosidasa del ADN genómico preparado en el ejemplo 2.

Cebador directo:

5 5'-TACACAACCTGGCCATGGCCAGCGTCCTGGGCCTCGTCGC-3' (SEC ID nº 25)

Cebador inverso:

10 5'-GTCACCTCTAGTTAATTAACCTACCATTTCAGAATCCAGTGTCC-3' (SEC ID nº 26)

Las letras en negrita representan la secuencia codificante.
La secuencia restante fue añadida para sitios de clonación.

15 [0180] El fragmento de interés fue amplificado por PCR utilizando el Expand High Fidelity PCR System. Cincuenta picomoles de cada uno de los cebadores anteriores fueron usados en una reacción PCR que contenía 200 ng de ADN genómico de *Aspergillus fumigatus*. La mezcla de reacción de amplificación de PCR también contenía tampón PCR 1X con MgCl₂ 1,5 mM, 1 µl de mezcla dNTP (10 mM cada uno) y 0,75 µl (3.5 U/µl) mezcla de ADN polimerasa (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) en un volumen final de 50 µl. Un termociclador Mastercycler de Eppendorf fue usado para amplificar el fragmento con los siguientes ajustes: 1 ciclo a 94°C durante 2 minutos; 10 ciclos cada uno a 94°C durante 15 segundos, 60°C durante 30 segundos, 72°C durante 2 minutos y 30 segundos; 20 ciclos cada uno a 94°C durante 15 segundos, 60°C durante 30 segundos y 72°C durante 2 minutos y 30 segundos más una prolongación de 5 segundos en cada ciclo sucesivo; 1 ciclo a 72°C durante 7 minutos; y mantenido a 10°C.

25 [0181] Los productos reactivos fueron aislados en un gel de agarosa del 1,0% usando tampón TAE y una banda de aproximadamente 3,15 kb de producto fue cortada del gel y purificada utilizando un kit de extracción de gel QIAquick según las instrucciones del fabricante.

30 [0182] El fragmento fue luego clonado en pBM120a utilizando un kit de clonación de InFusion. El vector fue digerido con Nco I y Pac I. Tanto el vector digerido como el fragmento de PCR fueron purificados por electroforesis en gel y QIAquick extracción de gel tal y como se ha descrito anteriormente. El fragmento de gen y vector digerido fueron ligados en una reacción que daba como resultado el plásmido de expresión pJSF9b (Figura 9) donde la transcripción del gen de alfa-glucosidasa estaba bajo el control del promotor NA2-tpi en tándem. La reacción de ligado (20 µl) estaba compuesta por tampón de InFusion1X, BSA 1X (BD Biosciences, Palo Alto, CA), 1 µl de enzima de infusión (diluida 1:10), 90 ng de pBM120a digerido con Pac I y Nco I y 84 ng del producto purificado de PCR de alfa-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus*. La reacción fue incubada a temperatura ambiente durante 30 minutos. 1,5 µl de la reacción fueron usados para transformar Solopac células supercompetentes de *E. coli* de Solopac Gold (Stratagene, La Jolla, CA) según las instrucciones del fabricante. Un transformante de *E. coli* que contiene pJSF9b fue detectado por digestión de restricción y el ADN del plásmido se preparó utilizando un BioRobot 9600.

40 Ejemplo 15: caracterización de la secuencia genómica de *Aspergillus fumigatus* que codifica un gen de alfa-glucosidasa agl3

45 [0183] La secuenciación del ADN del gen de alfa-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus* agl3 de pJSF9b fue realizada con un secuenciador de ADN automatizado Perkin-Elmer modelo 377 XL de Applied Biosystems (Perkin-Elmer/Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA) usando química de colorante-terminador (Giesecke et al., 1992, Journal of Virology Methods 38: 47-60) y estrategia de paseo del cebador. Datos de secuencia de nucleótidos fueron escrutados para mayor calidad y todas las secuencias fueron comparadas entre sí con ayuda del software PHRED/PHRAP (universidad de Washington, Seattle, WA). El análisis de secuencias de pJSF9b confirmó que el clon contenía una alfa-glucosidasa.

50 [0184] Las *E. coli* XL10-Gold que contienen plásmido pJSF9b fueron depositadas en la colección de Agricultural Research Service Patent Culture Collection, Northern Regional Research Center, 1815 University Street, Peoria, Illinois, 61604, como NRRL B-30856, con fecha de depósito del 23 de junio de 2005.

55 [0185] La secuencia de nucleótidos (SEC ID nº 5) y la secuencia de aminoácidos deducida (SEC ID nº 6) se muestran en la figura 3. El fragmento genómico codifica un polipéptido de 988 aminoácidos, interrumpido por 3 intrones de 766 pares de bases (nucleótidos 700 a 765), 61 pares de bases (nucleótidos 1174 a 1235) y 70 pares de bases (nucleótidos 1407 a 1477). El contenido G+C% del gen es 56,4%. Usando del programa de software SignalP (Nielsen et al., 1997, supra), se predijo un péptido señal de 19 residuos. La proteína madura predicha, contiene 969 aminoácidos con una masa molecular de 108,6 kDa.

60 [0186] Un alineamiento comparativo de secuencias de alfa-glucosidasa fue determinado utilizando el método Clustal W (Higgins, 1989, CABIOS 5: 151-153) utilizando el software de LASERGENE™ MEGALIGN™ (DNASTAR, Inc., Madison, WI) con una tabla de identidad y los siguientes parámetros de alineamiento múltiple: penalización de gap de 10 y penalización de longitud de gap de 10. Los parámetros de alineamiento por parejas eran Ktuple=1, penalización de gap=3, ventanas=5 y diagonales=5. El alineamiento mostró que la secuencia de aminoácidos deducida de la alfa-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus* (Agl3) comparte un 81% identidad con las secuencias de aminoácidos deducidas

de una alfa-glucosidasa de *Aspergillus oryzae* (número de acceso Swissprot Q12558).

Ejemplo 16: expresión del gen de alfa-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus* agl3 en *Aspergillus oryzae* BECh2

5 [0187] Se prepararon protoplastos *Aspergillus oryzae* BECh2 según el método de Christensen et al., 1988, supra. Un total de 7,3 µg de pJSF9b fueron usados para transformar *Aspergillus oryzae* BECh2.

10 [0188] La transformación de *Aspergillus oryzae* BECh2 con pJSF9b produjo 20 transformantes. Los 20 transformantes fueron transferidos a placas de COVE individuales. Se recogieron esporas de los transformantes en 4 ml de Tween 20 del 0,01% y 200 µl de la suspensión de esporas fueron inoculados separadamente en 25 ml de medio MY25 en matraces de agitación de plástico de 125 ml e incubados a 34°C y 250 r.p.m. Tres y cinco días después la inoculación, los sobrenadantes de cultivo fueron ensayados para actividad de alfa-glucosidasa como se describe en el ejemplo 8.

15 [0189] Los resultados de los ensayos demostraron que cerca de mitad de los transformantes expresaron actividad de alfa-glucosidasa. Un transformante denominado *Aspergillus oryzae* SMO24 fue cultivado tal y como se ha descrito anteriormente en medio MY25 para suministrar enzima para la purificación y la caracterización

Ejemplo 17: purificación de alfa-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus* Agl1

20 [0190] La alfa-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus* Agl1 expresada en *Aspergillus oryzae* BECH2 tal y como se describe en el ejemplo 8 fue purificada utilizando el protocolo descrito a continuación.

25 [0191] La actividad de alfa-glucosidasa fue medida usando maltosa como sustrato. La maltosa (1,1%; 375 µl) fue incubada durante 5 minutos al baño maría a 37°C. Se mezcló con el sustrato una alícuota de la muestra enzimática (25 µl) diluida en acetato sódico 50 mM y pH 5,0 que contiene Triton-X100 del 0,01%. La reacción fue terminada después de 10 minutos de incubación añadiendo 100 µl de Tris 1 M, disolución y ebullición inmediata durante 3 minutos.

30 [0192] La concentración de proteínas fue determinada usando un kit de ensayo de proteínas BCA (Pierce, Rockford, IL) según su "Procedimiento microplaca".

35 [0193] El análisis SDS-PAGE de muestras de fracciones y fracciones agrupadas fue realizado mezclando las muestras con tampón de muestra Laemmli, (Bio-Rad Hercules, CA) en una proporción 1:1. Después de hervir durante 2 minutos, las muestras fueron cargadas en un gel de SDS-PAGE del 8-16%, (Bio-Rad, Hercules, CA) junto con 10-15 µl del marcador de peso molecular (Precision Plus Protein Standards, Bio-Rad, Hercules, CA). Los geles fueron corridos en tampón de corrida Tris-Glicina-SDS 1X (Bio-Rad, Hercules, CA) a 200 V durante 1 hora. Los geles fueron luego enjuagados 3 veces con agua durante 5 minutos cada una, y teñidos con colorante de Coomassie de Bio-Safe (Bio-Rad Hércules, CA) durante 1 hora seguido de decoloración con agua durante más de 1 hora.

40 [0194] Se centrifugaron cultivos en matraces de agitación (medio MY25) a 1000 x g y se retiró el sobrenadante. El sobrenadante fue filtrado utilizando un filtro de vacío Stericup® de 0,22 µm (Millipore, Billerica, MA).

45 [0195] El sobrenadante contenía una cantidad sustancial de pigmento de color marrón. Para eliminar el pigmento, 105 ml de sobrenadante (diluido 2,5 veces con Tris pH 8,5 y 100 mM) fueron cargados en una columna de 30 X 2,5 cm que contenía resina de Q-Sefarosa Big Beads (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia) preequilibrada con Tris pH 8,5 y 0,1 M. La alfa-glucosidasa fue eluida con un lavado de tampón de acetato sódico pH 4,0 y 0,1 M sin fraccionar. La solución de "lavado" (300 ml) fue recogida y ensayada para actividad de alfa-glucosidasa. El 59% de la actividad de alfa-glucosidasa fue recuperado. La mayor parte del pigmento de color marrón permaneció unido a la Q-Sefarosa. El inhibidor de serina proteasa, PMSF, fue añadido a 0,5 mM a la solución después del paso de lavado de acetato sódico de la columna de Q-Sefarosa para prevenir la proteólisis potencial. Esta solución fue concentrada y retamponada (Tris pH 8,5 y 100 mM) usando una célula de ultrafiltración agitada de 250 ml (Amicon, Beverly, MA).

50 [0196] La alfa-glucosidasa del paso de la columna de Q-Sefarosa fue a continuación cargada en una columna Mono Q 16/10 (Pharmacia Biotech, AB Uppsala, Suecia) preequilibrada con Tris pH 8,5 y 50 mM. La enzima fue eluida usando un gradiente de volumen de 20 columnas de NaCl de 0 a 0,55 M en Tris pH 8,5 y 50 mM. Las fracciones de 10 ml fueron recogidas, ensayadas para actividad de alfa-glucosidasa y agrupadas basándose en la actividad específica y la pureza (SDS-PAGE).

60 [0197] La alfa-glucosidasa del paso de la columna Mono Q paso de fue finalmente cargada sobre una columna Mono S 16/10 (Pharmacia Biotech, AB Uppsala, Suecia) preequilibrada con 50 mM acetato, pH 4,5. La alfa-glucosidasa fue eluida usando un gradiente de volumen de 20 columnas de NaCl de 0 a 0,5 M en Tris pH 4,5 y 50 mM. Las fracciones de 10 ml fueron recogidas, ensayadas para actividad de alfa-glucosidasa y agrupadas basándose en la pureza (SDS-PAGE).

65 [0198] La purificación se resume a continuación en la tabla 1.

Tabla 1. Purificación de alfa-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus* Agl1

	Volumen (ml)	Grado de Purificación	Recuperación (%)
Sobrenadante inicial	105	1	100
Lavado de acetato en Q-Sefarosa (retirada del pigmento)	35	3,17	59
Cromatografía columna Mono Q	34	20,9	40
Cromatografía columna Mono S	6	27,6	29

Ejemplo 18: purificación de alfa-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus* Agl3

5 [0199] La alfa-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus* Agl3 expresada en *Aspergillus oryzae* BECH2 tal y como se describe en el ejemplo 16 fue purificada utilizando el protocolo descrito a continuación.

10 [0200] La actividad de alfa-glucosidasa fue medida como se describe en el ejemplo 17. La concentración de proteína fue determinada como se describe en el ejemplo 17. El análisis SDS-PAGE fue realizado como se describe en el ejemplo 17.

[0201] Se centrifugaron cultivos en matraces de agitación (medio MY25) a 1000 x g y se retiró el sobrenadante. El sobrenadante fue filtrado utilizando un filtro de vacío Stericup® de 0,22 µm de Millipore.

15 [0202] El sobrenadante contenía una cantidad sustancial de pigmento de color marrón. Para eliminar el pigmento, 250 ml de sobrenadante (diluido 2,5 veces con Tris pH 8,5 y 100 mM) fueron cargados en una columna de 30 X 2,5 cm que contenía resina de Q-Sefarosa Big Beads preequilibrada con Tris pH 8,5 y 0,1 M. La alfa-glucosidasa fue eluida con lavado de tampón de acetato sódico pH 4,0 y 0,1 M sin fraccionar. La solución de "lavado" (300 ml) fue recogida y ensayada para actividad de alfa-glucosidasa. El 68% de la actividad de alfa-glucosidasa fue recuperado. La mayor parte del pigmento de color marrón permaneció unido a la Q-Sefarosa. El inhibidor de serina proteasa, PMSF, fue añadido a 0,5 mM a la solución después del paso de lavado de acetato sódico de la columna de Q-Sefarosa para prevenir la proteólisis potencial. Esta solución fue concentrada y retamponada (Tris pH 8,5 y 100 mM) usando una célula de ultrafiltración agitada de 250 ml.

25 [0203] La alfa-glucosidasa del paso de la columna de Q-Sefarosa fue a continuación cargada en una columna Mono Q 16/10 (Pharmacia Biotech, AB Uppsala, Suecia) preequilibrada con Tris pH 8,5 y 50 mM. La enzima fue eluida usando un gradiente de volumen de 20 columnas de NaCl de 0 a 0,5 M en Tris pH 8,5 y 50 mM. Las fracciones de 10 ml fueron recogidas, ensayadas para actividad de alfa-glucosidasa y agrupadas basándose en la actividad específica y la pureza (SDS-PAGE).

30 [0204] La alfa-glucosidasa del paso de la columna MonoQ fue finalmente cargada en una columna Fenil Sefarosa HR 16/10 (Pharmacia Biotech, AB Uppsala, Suecia) preequilibrada con (NH₄)₂ SO₄ 1,7 M, Tris 50 mM y pH 8,5. La alfa-glucosidasa fue eluida con un gradiente de volumen de 20 columnas de (NH₄)₂ SO₄ 1,7 M - Tris 50 mM y pH 8,5 a Tris 50 mM y pH 8,5. Las fracciones de 10 ml fueron recogidas, evaluadas para actividad de alfa-glucosidasa y agrupado basándose en la pureza (SDS-PAGE).

[0205] La purificación se resume a continuación en la tabla 2.

Tabla 2. Purificación de alfa-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus* Agl3

	Volumen (ml)	Grado de Purificación	Recuperación (%)
Sobrenadante inicial	250	1,0	100
Lavado de acetato en Q-Sefarosa (retirada del pigmento)	75	4,1	68
Cromatografía columna Mono Q	61	8,2	34
Cromatografía columna Fenil Superosa	9	11,8	12

Ejemplo 19: caracterización de alfa-glucosidasas de *Aspergillus fumigatus*

[0206] Análisis SDS-PAGE.

5 Las alfa- glucosidasas de *Aspergillus fumigatus* Agl1 y Agl3 purificadas fueron analizadas mediante SDS-PAGE como se ha descrito anteriormente. Aunque el peso molecular predicho de la alfa-glucosidasa madura Agl1 es 98,8 kDa, los resultados de SDS-PAGE mostraron dos bandas de aproximadamente 40 y 60 kDa. Mientras que el peso molecular predicho de la alfa-glucosidasa madura Agl3 es 108,6 kDa, los resultados de SDS-PAGE mostraron una banda de aproximadamente 110 kDa.

10 [0207] Análisis MALDI-TOF MS. El análisis MALDI-TOF MS de las bandas de 40 y 60 kDa mostró que eran de la alfa-glucosidasa Agl1 y la banda 110 kDa era de la alfa-glucosidasa Agl3 como se describe más adelante.

15 [0208] Un MultiPROBE® II Liquid Handling Robot (PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Boston, MA) fue usado para realizar digestiones en gel. Las bandas de 40 y 60 kDa observadas en el *Aspergillus fumigatus* purificado Agl1 y la banda 110 kDa de la alfa-glucosidasa Agl3 fueron cortadas del gel de SDS-PAGE. Las bandas de gel fueron reducidas con 50 µl de DTT 10 mM en bicarbonato de amonio 100 mM y pH 8,0 durante 30 minutos. Después de la reducción, las piezas de gel fueron alquiladas con 50 µl de yodoacetamida 55 mM en tampón de bicarbonato de amonio 100 mM y pH 8,0 durante 20 minutos. Las piezas de gel seco se dejaron crecer en una solución de digestión de tripsina compuesta por 6 ng de tripsina de calidad de secuenciación (Princeton Separations, Adelphia, NJ) por µl de tampón de bicarbonato de amonio 50 mM y pH 8 durante 30 minutos a temperatura ambiente, seguido de un digestión de 8 horas a 40°C. Cada uno de los pasos de la reacción descritos fue seguido por numerosos lavados y prelavados con las soluciones apropiadas siguiendo el protocolo de estándar del fabricante. Cincuenta µl de acetonitrilo fueron usados para deshidratar el gel entre reacciones y las piezas de gel fueron secadas al aire entre pasos. Los péptidos fueron extraídos dos veces con ácido fórmico del 1%/acetonitrilo del 2% en agua de calidad HPLC durante 30 minutos. Las soluciones de extracción de péptido fueron transferidas a una placa de 96 pocillos de tipo PCR con falda (ABGene, Rochester, NY) que había sido enfriada hasta 10-15°C y cubierta con una tapa de placa de 96 pocillos (PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Boston, MA) para prevenir la evaporación. Las placas fueron además almacenadas a 4°C hasta que se pudiera realizar el análisis de espectrometría de masas.

30 [0209] Las bandas de proteína de 40 y 60 kDa y la banda de 110 kDa banda fueron digeridas en gel con tripsina como se ha descrito anteriormente. Los péptidos recuperados fueron analizados mediante el análisis de la huella peptídica de masa para verificación de proteínas. Un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo MalditTM-LR fue usado (Waters Micromass® MS Technologies, Milford, MA). Se preparó ácido alfa-ciano-4-hidroxicinámico recristalizado lavando cantidades de miligramo de ácido alfa-ciano-4-hidroxicinámico (Sigma Chemical Co., St. Luis, MO) con acetonitrilo del 100% (E.M. Science, Gibbstown, NJ) y mezclando concienzudamente y centrifugando para formar un granulado en matriz. La solución de acetonitrilo fue retirada y descartada. El agua de calidad HPLC (Fisher Chemical, Fairlawn, NJ,) fue añadida seguida de una adición lenta de hidróxido amónico (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ) hasta que casi todo el granulado fue disuelto. El granulado no disuelto fue descartado. Se añadió lentamente agua con HCl concentrado (Fisher Chemicals, Fairlawn, NJ,) la solución matricial hasta que una gran cantidad de matriz se recristalizó. La matriz cristalizada fue retirada por filtración y lavada varias veces con HCl 0,1 M y se le dejó secar completamente. La solución matricial final consistía en una solución de 10 mg/ml de ácido ciano-4-hidroxicinámico alfa recristalizado en acetonitrilo del 50%/TFA del 0,1 acuoso 50%. Un µl de la solución de extracción de péptido obtenida de la digestión de proteínas en gel fue mezclado con 1 µl de la solución matricial recristalizada y secada en el momento en una placa diana de acero inoxidable MALDI-TOF (Waters Micromass® MS Technologies, Milford, MA). El espectrómetro de masas fue operado en modo reflectrón y de ión positivo usando un voltaje de aceleración de +15kV, voltaje de pulso de 2535 voltios y voltaje de reflectrón de 2000 voltios. El rango de masa de adquisición de datos fue establecido desde 640 hasta 3000 m/z. Un estándar de calibración por masa fijada consistente en 1 µl de 200 fmols/µl de ACTH (clip de hormona adrenocorticotropa 18- 39 PM = 2465,1989) (Sigma Chemical Co, St. Luis, MO) y 1 µl de solución de solución matricial recristalizada fue usada para el estándar interno y fijar el pozo diana objetivo adyacente. La adquisición de datos fue realizada utilizando una estación de trabajo microprocesadora controlada por Windows NT utilizando software Masslynx 4.0 de espectrometría de masas (Waters Micromass® MS Technologies, Milford, MA). Los espectros adquiridos fueron combinados, suavizados y centrados, y se generó una lista de valores máximos de masas iónicas de péptidos. Esta lista de valores máximos fue buscada contra bases de datos usando el software ProteinLynxTM Global Server 2.05 (Waters Micromass® MS Technologies, Milford, MA).

55 [0210] Los resultados del análisis de la huella peptídica de masa indicaron que las bandas proteínicas de 40 y 60 kDa fueron verificadas como alfa-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus* Agl1 y la banda proteínica de 110 kDa fue verificadas como alfa-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus* Agl3.

60 [0211] pH óptimo. La actividad específica de las alfa-glucosidasas purificadas de *Aspergillus fumigatus* Agl1 y Agl3 fue medida a valores de pH diferentes en tampón acetato 50 mM/tampón fosfato 50 mM a 37°C utilizando el ensayo de actividad anteriormente descrito.

65 [0212] La alfa-glucosidasa Agl1 tiene un pH ácido óptimo de actividad a pH 4,1 como se muestra en figura 10. La alfa-glucosidasa Agl3 tiene un pH ácido óptimo de actividad en el rango de pH 4,0- 4,5 como se muestra en la figura 13.

- [0213] Termoestabilidad. La termoestabilidad de las alfa-glucosidasas purificadas de *Aspergillus fumigatus* Agl1 y Agl3 fue determinada incubando cada una de las alfa-glucosidasas en acetato sódico 50 mM y pH 5,0 durante 5 minutos al baño maría a una temperatura elegida.
La maltosa como sustrato (1,1%; 375 μ l) fue incubada durante 5 minutos al baño maría a 37°C. Una alícuota de la muestra enzimática fue mezclada con el sustrato y la actividad específica fue medida a 37°C.
- [0214] La alfa-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus* Agl1 tiene buena termoestabilidad (aproximadamente un 80% residual) hasta aproximadamente 70°C como se muestra en figura 11. La enzima pierde solo un 22% de actividad después de 5 minutos en tampón acetato 50 mM y pH 5,0 a esta temperatura y pierde toda la actividad a 100°C.
- [0215] La alfa-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus* Agl3 tiene buena termoestabilidad (aproximadamente un 80% residual) hasta aproximadamente 67°C como se muestra en la figura 14. La enzima pierde un 33% de actividad después de 5 minutos en tampón acetato 50 mM y pH 5,0 a 70°C y pierde toda la actividad a 100°C.
- [0216] Temperatura óptima. La actividad específica de las alfa-glucosidasas purificadas de *Aspergillus fumigatus* Agl1 y Agl3 fue medida a diferentes valores de temperatura en acetato sódico 50 mM y pH 5,0. La maltosa como sustrato (1.1%; 375 μ l) fue incubada durante 5 minutos al baño maría a una temperatura elegida.
Una alícuota de la muestra enzimática (25 μ l) diluida en acetato sódico 50 mM y pH 5,0 que contiene Triton-X100 del 0,01% fue mezclada con el sustrato. La reacción fue terminada después de 10 minutos de incubación a la misma temperatura añadiendo solución Tris 1 M (100 μ l) e hirviendo inmediatamente durante 3 minutos.
- [0217] La temperatura óptima para la enzima Agl1 estaba alrededor de 63°C como se muestra en la figura 12. La temperatura óptima para la enzima Agl3 estaba alrededor de 60°C como se muestra en la figura 15.
- [0218] Parámetros cinéticos. Se determinaron los parámetros cinéticos para la hidrólisis específica de la maltosa mediante las alfa-glucosidasas purificadas de *Aspergillus fumigatus* Agl1 y Agl3.
- [0219] Un dispositivo BioLC HPLC de Dionex equipado con una columna CarboPac PA10 4 x 250 mm columna y un detector electroquímico ED50 (Sunnyvale; CA) fue usado para detectar glucosa de forma cuantitativa de la hidrólisis de maltosa. Se aplicó una solución de hidróxido sódico (200 mM) como fase líquida. Este método proporciona una determinación precisa al nivel de alrededor de glucosa 0,01 mM. La curva de calibración fue lineal para glucosa entre 0 mM y 1,2 mM.
- [0220] La mezcla de incubación contenía 10 ml de solución de maltosa en el rango de 0,19-4,61 mM a 37°C. La reacción enzimática fue iniciada añadiendo 10 μ l de solución de alfa-glucosidasa. La reacción enzimática fue terminada colocando 1 ml de alícuota en agua hirviendo durante 2,5 minutos y luego en hielo durante al menos 30 minutos.
- [0221] Los valores de k_{cat} fueron calculados utilizando masas moleculares de 98,8 kDa y 108,6 kDa para las alfa-glucosidasas de *Aspergillus fumigatus* Agl1 y Agl3, respectivamente.
- [0222] Los gráficos recíprocos, comúnmente usados para determinar parámetros cinéticos, no eran lineales para ninguna de las enzimas. A concentraciones de maltosa elevada, la velocidad de la reacción de hidrólisis (acumulación de glucosa) fue significativamente disminuida. Este efecto fue especialmente pronunciado para la alfa-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus* Agl1 donde se observó que la velocidad de reacción disminuida empezó a partir de maltosa 0,58 mM.
- [0223] La velocidad disminuida observada en la hidrólisis de maltosa catalizada por alfa-glucosidasa puede estar causada por la inhibición del sustrato (Segel, I.H. Enzyme Kinetics. Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems. 1975, John Wiley & Sons) o puede alternativamente ser el resultado de una utilización competitiva de glucosa en una reacción de transglicosilación. A medida que las concentraciones de maltosa se incrementan, se convierte en un aceptor para la molécula de glucosa. La reacción de transglicosilación entre la glucosa y la maltosa produce panosa (6-O-alfa-D-glucosilmaltosa). La probabilidad de interacción entre dos moléculas de glucosa, que dé lugar a maltosa e isomaltosa, fue baja debido a la baja concentración de maltosa en el régimen "tasa inicial". La columna CarboPac PA10 permite la separación de glucosa a partir de oligosacáridos, pero no separa maltosa y panosa.
- [0224] Los parámetros cinéticos para las alfa-glucosidasas fueron estimados a partir de los gráficos. A pH 5,0 y 37°C, el K_m para la alfa-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus* Agl1 era 0,04 mM y k_{cat} era 48 s⁻¹ (intervalo de sustrato 0,12 mM- 0,41 mM). A pH 5,0 y 37°C, el K_m para la alfa-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus* Agl3 era 0,34 mM y el k_{cat} fue 237 s⁻¹ (intervalo de sustrato 0,14 mM- 0,55 mM).
- [0225] Como se ha indicado anteriormente, los intervalos de sustrato no eran siempre óptimos. Al mismo tiempo el límite de detección no permite la aplicación de concentraciones inferiores de sustrato. Ambas alfa-glucosidasas demostraron fuerte "inhibición de sustrato" que puede ser probablemente atribuida a la actividad de transglicosilación.
Ejemplo 20: purificación de alfa-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus* Agl2

[0226] La alfa-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus* Agl2 expresada en *Aspergillus oryzae* BECH2 como se describe en el ejemplo 13 fue purificada utilizando el protocolo descrito a continuación.

5 [0227] La actividad de alfa-glucosidasa fue medida como se describe en el ejemplo 17. La concentración de proteínas fue determinada como se describe en el ejemplo 17. El análisis SDS-PAGE fue realizado como se describe en el ejemplo 17.

10 [0228] Los cultivos en matraz de agitación (medio MY25) fueron centrifugados a 1000 x g y se retiró el sobrenadante. El sobrenadante fue filtrado utilizando un filtro de vacío de 0,22 µm Stericup® de Millipore.

15 [0229] El sobrenadante fue diluido con Tris 100 mM y el pH ajustado a 8,5. El pigmento sobrenadante diluido contenía pigmento de color marrón. Para eliminar el pigmento, 250 ml de sobrenadante (diluido 2,5 veces con Tris 100 mM y pH 8,5) fue cargado en una columna de 30 x 2,5 cm (Pharmacia Biotech, AB Uppsala, Suecia) que contenía resina de perlas grandes de Q-Sefarosa (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia) preequilibradas con Tris 0,1 M y pH 8,5. La alfa-glucosidasa fue eluida con un lavado de tampón de acetato sódico 0,1 M y pH 4,0 sin fraccionar. La solución de "lavado" (300 ml) fue recogida y ensayada para actividad de alfa-glucosidasa. El 90% de la actividad de alfa-glucosidasa fue recuperada. La mayor parte del pigmento de color marrón permaneció unido a la Q-Sefarosa. El inhibidor de serina proteasa, PMSF, fue añadido a 0,5 mM a la solución después del paso de lavado de acetato sódico de la columna de Q-Sefarosa para prevenir la proteólisis potencial. Esta solución fue concentrada y retamponada (Tris pH 8,5 y 100 mM) usando una célula de ultrafiltración agitada de 250 ml (Amicon, Beverly, MA).

20 [0230] La alfa-glucosidasa del paso de la columna de Q-Sefarosa fue a continuación cargada en una columna Mono Q 16/10 preequilibrada con Tris pH 8,5 y 50 mM. La enzima fue eluida usando un gradiente de volumen de 20 columnas de NaCl de 0 a 0,5 M en Tris pH 8,5 y 50 mM. Las fracciones de 10 ml fueron recogidas, ensayadas para actividad de alfa-glucosidasa y agrupadas basándose en la actividad específica y la pureza (SDS-PAGE).

[0231] La purificación se resume a continuación en la tabla 3.

Tabla 3. Purificación de alfa-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus* Agl2

	Volumen (ml)	Grado de Purificación	Recuperación (%)
Sobrenadante inicial	1700	1	100
Cromatografía columna Q-Sefarosa	520	2,5	90
Cromatografía columna Mono Q	90	6,2	63
Precipitación	40	72	28

30 [0232] La preparación purificada da cuatro bandas en SDS-PAGE con pesos moleculares de 33, 36, 75 y 105 kDa. Basándose en la masa predicha de la alfa-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus* Agl3, la banda 105 kDa corresponde a la alfa-glucosidasa.

35 Depósito de Material biológico

[0233] Los siguientes materiales biológicos han sido depositados según las condiciones del tratado de Budapest con la Agricultural Research Service Patent Culture Collection, Northern Regional Research Center, 1815 University Street, Peoria, Illinois, 61604, y se les ha dado los siguientes números de acceso:

40

Depósito	Número de Acceso	Fecha del Depósito
<i>E. coli</i> XL10-Gold (pSMO216)	NRRL B-30751	17 de junio de 2004
<i>E. coli</i> XL10-Gold (pHyGe011)	NRRL B-30750	10 de junio de 2004
<i>E. coli</i> XL10-Gold (pJSF9b)	NRRL B-30856	23 de junio de 2004

[0234] Las cepas han sido depositadas bajo condiciones que aseguran que el acceso al cultivo estará disponible durante la pendencia de esta solicitud de patente para aquel que el comisario de patentes y marcas registradas

determine que está autorizado a ello bajo 37 C.F.R. §1.14 y 35 U.S.C. §122.

Los depósitos representan un cultivo sustancialmente puro de las cepas depositadas.

Los depósitos están disponibles según los requisitos de las leyes de patente extranjera en países donde duplicados de la solicitud o su descendencia sean solicitados.

5 No obstante, se debe entender que la disponibilidad de un depósito no constituye una licencia para practicar la presente invención en derogación de los derechos de patentes concedidos por acción gubernamental.

LISTADO DE SECUENCIAS

10 [0235]

<110> Novozymes, Inc.

15

<120> Polipéptidos que tienen actividad de alfa-glucosidasa y polinucleótidos que los codifican

<130> 10655.204-WO

<150> 60/585,336 <151> 2005-06-29

20

<160> 26

<170> PatentIn versión 3.2

25

<210> 1

<211> 2954

<212> DNA

<213> *Aspergillus fumigatus*

<400> 1

ES 2 545 612 T3

atggttgagat cgctgctact tcttgcgccc cttgtgggcg ctgccgtgat cggcgccagg 60
 gaccacagcc aggagtgtcc tggttacaag gccaccaata ttagagaggg tgcgattcc 120
 ttaacggcgg atttgacctt ggccggtaaa ccgtgcaaca cttacggcac cgacttgaag 180
 aatctgaaac tccttgttga gtaccagacc ggtacgtttt cagcgttaaa cggctatgat 240
 tgtagcttac ttctttctag ataaacgcct ccatgttaag atctatgacg ccgatgagga 300
 ggtttaccaa gtcctcgagt cggttctccc tcgctgggat ggcaaagggt gatcgagcaa 360
 gaagtcggcg ctcaagttcg actatcaggc gaatccgttc tctttcaagg tcaagagagg 420
 cggcgagggtg ctcttcgaca cctccggttc gaatctgac ttccagtcgc agtacctgag 480
 cctccgcacc tgggtgcccc aggatcctaa tctctacggt cttggcgagc acacggattc 540
 tcttcgtctg gagaccacca actacacgcg tactctgtgg aaccgtgacg cgtatgctat 600
 tcctgagaag accaacctgt acggcactca tcccgtgtac tatgaccacc gtggccaaca 660
 cggcaccacac ggtgtcttct tgctgaactc caacggcatg gacattaaga tcgacaagac 720
 caaggatggc aagcagtact tagagtacaa cactctggga ggtgtctttg acttttactt 780
 ctttaccggt gccaccccca aggatgccag catcgagtat gcgaaagtcg tcggtcttcc 840
 cgctatgcag tcctactgga cgttcgggtg acgtttccct gattcgatct gcggtccttc 900
 cggctaactc ttgtcgtcta gttccaccaa tgcagatacg gctatcgtga tgtctttgag 960
 gtcgcccagg ttgtctacaa ctacagccag gcgaagattc cactggagac catgtggacc 1020
 gacattgact acatggacag acgtcgggtg ttcactcttg acccggagcg attccccgctc 1080
 gagaagatgc gtgagttggt gtcatatctt cacaaccaca accaacacta catcgtcatg 1140
 gttgacccgg ccgtcagcgt gagcggtaag tttaccttcc caagtatgga ggggggtgggt 1200
 gcatattgac aatgatcag acaacgttgg ctacaatgat ggcattggagc agggcatctt 1260
 cctgcagact caaaacggta gcctctacaa gggtaagcct tacctaaaag tactaatgac 1320
 acccagaata ttgacctat acaggtgccg tctggcctgg tgtgactgcg tctcctgact 1380
 ggttccaccc tgacatccaa aagtactgga acgaccagtt tgccaaatc ttcgacccca 1440

ES 2 545 612 T3

agaccggcgt cgacatcgac ggtctgtgga tcgatatgaa cgaggccgcc aacttctgcc 1500
 cttacccttg cagtgatecc gagggctacg ctagggataa cgacctgcct cccgcgcctc 1560
 cccccgttcg gcccagcaac ccgcgcccgt tgcccggatt ccctgggtgat ttccagccct 1620
 catcctcgtc gaagcgcctc accaagggat ctaaagttgg actgcctaata cgtgacctga 1680
 tcaaccctcc gtacatgatc cgtaatgaag ctggctcgcct cagcaacaag accatcaaca 1740
 ccgatatacat tcatgetggg gagggatatg ccgagtatga cactcacaac ctttatggta 1800
 ccagtaagta ggcateccctc tgaatgacgg ggacagtcta acattcaaag tgatgagttc 1860
 cgcttctcgc aatgccatgc aacaccgccg ccttgggggtg cggccattgg tcatcactcg 1920
 cagcacgtat gctgggtgctg gcgcccacgt tggacactgg tcgggtgtgca tccatctagt 1980
 acctgcgaac tcttatactg acacttgaca ggctcgggtga caacatctcc gagtggagca 2040
 agtaccgcat ctccatctcg cagatgcttg cgtttgcctc gatgttccag gtgcctatga 2100
 tcggatcaga cgtctgcggg ttccggcggca acaccaccga ggagctctgc gctcgcctggg 2160
 cgcgtctcgg agccttctac accttctctc gcaaccacaa tgaateacc ggtatccgcg 2220
 aggagttcta ccgctggccc accgctgccc agtccgctcg caaggccatc gacatccgct 2280
 acaggctgct tgactacatc tacacagcct tccaccggca gaccagacc ggcgagccct 2340
 tcctgcagcc catgttctac ctctatccca aggacaagga caccctcagc aaccagctgc 2400
 agttcttcta cgggtgacgc atctctgtca gccctgtcac cgacggggagc cagacttcag 2460
 ttgacgcata ctccccgat gatattctt acgattggca cacggggcgc gccctacgcg 2520
 gccgcgggagc caacgtcacc ctccagcaaca tcgacgtgac tgagatcccc atccacatcc 2580
 gggcgggcag catcatcccc gtccggctcc agtccgcat gaccaccacc gagctgcgca 2640
 agaagggctt cgagctcatc atcgcgccag ggcttgatgg gactgcctcg ggcagtttgt 2700
 atctcgacga cggcgactcc atcgagccgc gcgcgacct cgagctggag ttcacgtacc 2760
 gcaagggccca tctccaggtg aagggcaagt tcggtttccg cacggaggtc aagatcaacg 2820
 ccgtcaccct gcttggccag tctgcgcctg cctccaagtc tgcagacgtg gcctcccttg 2880
 actctggccg ccaggcagtg accatcaaga cgagcctgga tctgactggt ccttccgaga 2940
 ttgacctcgg ctag 2954

<210> 2

<211> 880

<212> PRT

5 <213> Aspergillus fumigatus

<400>

Met Leu Arg Ser Leu Leu Leu Leu Ala Pro Leu Val Gly Ala Ala Val
 1 5 10 15

Ile Gly Ala Arg Asp His Ser Gln Glu Cys Pro Gly Tyr Lys Ala Thr
 2 20 25 30

ES 2 545 612 T3

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

Gln Val Pro Met Ile Gly Ser Asp Val Cys Gly Phe Gly Gly Asn Thr
 595 600 605
 Thr Glu Glu Leu Cys Ala Arg Trp Ala Arg Leu Gly Ala Phe Tyr Thr
 610 620
 Phe Phe Arg Asn His Asn Glu Ile Thr Gly Ile Pro Gln Glu Phe Tyr
 625 630 635 640
 Arg Trp Pro Thr Val Ala Glu Ser Ala Arg Lys Ala Ile Asp Ile Arg
 645 650 655
 Tyr Arg Leu Leu Asp Tyr Ile Tyr Thr Ala Phe His Arg Gln Thr Gln
 660 665 670
 Thr Gly Glu Pro Phe Leu Gln Pro Met Phe Tyr Leu Tyr Pro Lys Asp
 675 685
 Lys Asp Thr Phe Ser Asn Gln Leu Gln Phe Phe Tyr Gly Asp Ala Ile
 690 695 700
 Leu Val Ser Pro Val Thr Asp Gly Ser Gln Thr Ser Val Asp Ala Tyr
 705 710 715 720
 Phe Pro Asp Asp Ile Phe Tyr Asp Trp His Thr Gly Ala Ala Leu Arg
 725 730 735
 Gly Arg Gly Ala Asn Val Thr Leu Ser Asn Ile Asp Val Thr Glu Ile
 740 745 750
 Pro Ile His Ile Arg Gly Gly Ser Ile Ile Pro Val Arg Ser Glu Ser
 755 760 765
 Ala Met Thr Thr Thr Glu Leu Arg Lys Lys Gly Phe Glu Leu Ile Ile
 770 775 780
 Ala Pro Gly Leu Asp Gly Thr Ala Ser Gly Ser Leu Tyr Leu Asp Asp
 785 790 795 800
 Gly Asp Ser Ile Glu Pro Arg Ala Thr Leu Glu Leu Glu Phe Thr Tyr
 805 810 815
 Arg Lys Gly His Leu Gln Val Lys Gly Lys Phe Gly Phe Arg Thr Glu
 820 825 830
 Val Lys Ile Asn Ala Val Thr Leu Leu Gly Gln Ser Ala Pro Ala Ser
 835 840 845
 Lys Ser Ala Asp Val Ala Ser Leu Asp Ser Gly Arg Gln Ala Val Thr
 850 855 860
 Ile Lys Thr Ser Leu Asp Leu Thr Gly Pro Ser Glu Ile Asp Leu Gly
 865 870 875 880

<211> 3016

<212> ADN

<213> *Aspergillus fumigatus*

<400> 3

ES 2 545 612 T3

atggcccgga	gcagctcgtc	tctctccaga	tggacgctat	tgctcgcgtt	ggttgtcatt	60
ctcgggtgtc	ttgttgtaac	cggaggtgag	ctctatgcgc	tcaacttaat	ccaatagtaa	120
cgccatctga	ccaagtctgc	cagttactgt	gaagcatgag	aacttcaaga	aatgctctca	180
atcgggtttt	tgtaagcgaa	accgagcttt	tgcagatgac	gtctccgccc	aaggcgcgtc	240
ttggatttca	ccatatgaac	tcgatccctc	ctcaattcac	ttcaaagatg	gccaactgca	300
agggacaatt	ctcaagtcca	tatctgccaa	tgagaaagtc	aagctgccac	ttgtgatttc	360
tttctggag	tctggagctg	cgcgcacgt	ggtcgcgcaa	gagaagcggg	tgaagggcga	420
aattgacctc	cgacataaca	gccaaagtgc	caaagagcga	tacaatgaag	cagagcaatg	480
ggcactgggt	ggtggtttgg	aatcgcgcaa	aactgccgct	gtggacacag	aatccgagac	540
tggattcaca	aaggtacttt	acgggccgga	taacaagttt	caggcaatca	ttcgccatgc	600
gccgttcagc	ggtgatittc	agcgcgatgg	ccagagccat	gtccgagtga	atcacaaggg	660
cttctcaac	gtggaacact	ggcggccaaa	ggtggatgtg	gcagagggtg	acagtgttca	720
ggaaaaatcg	atacctcagc	aagatgaaag	cacttgggtg	gaggaaactt	ttggtgggaa	780
caccgactcc	aagccaaaag	gtcccgaaag	tatcggcctg	gacatcacat	tcctggcta	840
cagccatggt	tttgggattc	cagagcatgc	cgactcgtg	tctctgaagg	aaaccaggta	900
ggtgttacat	gtccctgccc	ctctagagac	gcaaagctga	tcagtttgaa	ggggcgggtga	960
tggaaatcat	gcggaacctt	atcgcattgt	caatacggac	gtctttgaat	atgaactcaa	1020
cagtcccatg	acgctctatg	gggccattcc	gttcatgcag	gttcacaaga	aggactctac	1080
tgtgggtgtc	ttctggctga	acgctgcgga	gacctgggtc	gacatcgtca	agtcgaaatc	1140
ctcgcctcag	cctctttctc	ttggagtagg	ttcgaagaca	gacacccaaa	ctcattgggt	1200
ttccgagctg	ggacgtattg	atctgtttgt	cttcttgggc	cccactccgc	aagagatcag	1260
caaaacatac	ggtgaactta	ccggctacac	tcaattacct	caacagttcg	ctatcgttta	1320
ccaccagtgt	cgttggaact	atgtcacgga	cgaggatgtc	aaggaagttg	atcgcaagtt	1380
tgacaagtat	cagatccctt	acgatgtgat	ttggcttgac	attgagtaca	cggatgaccg	1440
gaagtacttt	acctgggacc	ctctgagttt	tcctgaccgc	aagggtatgg	aagagcagct	1500
tgatgactcc	gagcgcaaac	tcgttgatgat	cattgaccgc	cacattaata	acaaggaagg	1560
atactccatc	tctgaagagc	tgaagggcaa	ggatctggct	attaagaaca	agggcgggga	1620
gacctacgac	ggctgggtgt	ggcctgggtc	atctcactgg	gtggactgct	tcaatcccga	1680
agcaatcaaa	tggtggaccg	gcttgttcaa	gtacgacaaa	ttcaagggca	cccagccaaa	1740

ES 2 545 612 T3

cgtctttatt	tggaatgaca	tgaatgagcc	ctctgtcttc	aatggaccgg	aaaccactat	1800
gccccaaagac	aatatccaact	atggcaactg	ggaacaccgc	gacgtgcata	atgtcaacgg	1860
actgaccttt	atcaacgcaa	catacaatgc	cttactggag	cggaagaaag	gcgtggttcg	1920
tcggcccttc	gtcttgaccc	gatcattcta	cgccggggct	caacgggtat	ctgctatgtg	1980
gacgggagac	aatcaagcca	cctgggaaca	tctggccgca	tccttgccca	tggtattgaa	2040
taacggcatt	gccgggttcc	cgtttgccgg	tgccgatggt	ggcgggtttt	tccagaacct	2100
aagcaaggaa	cttttgaccc	ggtggatca	ggccggcatt	tggtatccct	tcttcctgtc	2160
ccatgcgcac	attgacactc	gcagacgaga	gccctacttg	atcgctgagc	cattcaggtc	2220
gatcatatcc	caggctatcc	gtctgagata	tcaactgctg	cctgcatggt	acactgcttt	2280
tcatgaagct	tcggtgaatg	gaatgcctat	tgttcggccc	cagtattatg	tccaccgggc	2340
ggacgaacaa	ggctttgcca	ttgatgacca	actctacctt	ggatctactg	gcctgctggc	2400
caaacctgtg	gttgtggagg	gtgccaccac	tacagatate	tacatcgctg	acgatgagaa	2460
gtactacgat	tactatgatt	ttactgtcta	ccaaggagcg	ggcaggagac	ataccggtgcc	2520
ttccccatt	gagaagggtcc	cattggtgat	gcaaggaggt	catattatcc	ctcgcaagga	2580
ccgcgcacgt	cgtagcagcg	ggctgatgag	atgggatcct	tatacacttg	tgatcgctct	2640
cgacaagaac	gggaaggccg	aaggcacact	ctatggtgat	gatggggagt	cgttcaacta	2700
ccagcagggt	gcatacatac	accgtcgctt	caaatttgaa	aaatctaccc	tttgctcgga	2760
agacatcggc	accaaggggt	cgaagacagc	cgaatacctg	aagagcatga	cgaatgtgcg	2820
ggttcaaaaag	gtggttggtg	tcgacgctcc	caaggagtgg	cagggaaagga	cgtctgtgac	2880
cgtcatcgaa	gacggtgcaa	agatggcttc	taccgcaccc	ttggagtatc	acgccagca	2940
ggcaggcaag	gctgcgtatg	ctgtcgtgaa	gaaaccggat	gttggcattg	gaaagacatg	3000
gaagattgaa	ttctaa					3016

<210> 4

<211> 967

5

<212> PRT

<213> *Aspergillus fumigatus*

<400> 4

ES 2 545 612 T3

Met Ala Arg Ser Ser Ser Ser Leu Ser Arg Trp Thr Leu Leu Leu Ala
1 5 10 15
Leu Val Val Ile Leu Gly Cys Leu Val Val Pro Gly Val Thr Val Lys
20 25 30
His Glu Asn Phe Lys Lys Cys Ser Gln Ser Gly Phe Cys Lys Arg Asn
35 40 45
Arg Ala Phe Ala Asp Asp Val Ser Ala Gln Gly Ala Ser Trp Ile Ser
50 55 60
Pro Tyr Glu Leu Asp Pro Ser Ser Ile His Phe Lys Asp Gly Gln Leu

ES 2 545 612 T3

65					70					75					80
Gln	Gly	Thr	Ile	Leu	Lys	Ser	Ile	Ser	Ala	Asn	Glu	Lys	Val	Lys	Leu
				85					90					95	
Pro	Leu	Val	Ile	Ser	Phe	Leu	Glu	Ser	Gly	Ala	Ala	Arg	Ile	Val	Val
			100					105					110		
Asp	Glu	Glu	Lys	Arg	Met	Lys	Gly	Glu	Ile	Asp	Leu	Arg	His	Asn	Ser
		115					120					125			
Gln	Val	Arg	Lys	Glu	Arg	Tyr	Asn	Glu	Ala	Glu	Gln	Trp	Ala	Leu	Val
	130					135					140				
Gly	Gly	Leu	Glu	Ser	Ser	Lys	Thr	Ala	Ala	Val	Asp	Thr	Glu	Ser	Glu
145					150					155					160
Thr	Gly	Phe	Thr	Lys	Val	Leu	Tyr	Gly	Pro	Asp	Asn	Lys	Phe	Gln	Ala
				165					170					175	
Ile	Ile	Arg	His	Ala	Pro	Phe	Ser	Val	Asp	Phe	Gln	Arg	Asp	Gly	Gln
			180					185					190		
Ser	His	Val	Arg	Val	Asn	His	Lys	Gly	Phe	Leu	Asn	Val	Glu	His	Trp
		195					200					205			
Arg	Pro	Lys	Val	Asp	Val	Ala	Glu	Gly	Asp	Ser	Val	Gln	Glu	Lys	Ser
	210					215					220				
Ile	Pro	Gln	Gln	Asp	Glu	Ser	Thr	Trp	Trp	Glu	Glu	Thr	Phe	Gly	Gly
225					230					235					240
Asn	Thr	Asp	Ser	Lys	Pro	Lys	Gly	Pro	Glu	Ser	Ile	Gly	Leu	Asp	Ile
				245					250					255	
Thr	Phe	Pro	Gly	Tyr	Ser	His	Val	Phe	Gly	Ile	Pro	Glu	His	Ala	Asp
			260					265					270		
Ser	Met	Ser	Leu	Lys	Glu	Thr	Arg	Gly	Gly	Asp	Gly	Asn	His	Ala	Glu
		275					280					285			
Pro	Tyr	Arg	Met	Tyr	Asn	Thr	Asp	Val	Phe	Glu	Tyr	Glu	Leu	Asn	Ser
	290				295						300				
Pro	Met	Thr	Leu	Tyr	Gly	Ala	Ile	Pro	Phe	Met	Gln	Ala	His	Lys	Lys
305					310					315					320
Asp	Ser	Thr	Val	Gly	Val	Phe	Trp	Leu	Asn	Ala	Ala	Glu	Thr	Trp	Val
				325					330					335	
Asp	Ile	Val	Lys	Ser	Lys	Ser	Ser	Pro	Asp	Pro	Leu	Ser	Leu	Gly	Val
			340					345					350		

Gly Ser Lys Thr Asp Thr Gln Thr His Trp Phe Ser Glu Ser Gly Arg
 355 360 365
 Ile Asp Leu Phe Val Phe Leu Gly Pro Thr Pro Gln Glu Ile Ser Lys
 370 375 380
 Thr Tyr Gly Glu Leu Thr Gly Tyr Thr Gln Leu Pro Gln Gln Phe Ala
 385 390 395 400
 Ile Ala Tyr His Gln Cys Arg Trp Asn Tyr Val Thr Asp Glu Asp Val
 405 410 415
 Lys Glu Val Asp Arg Lys Phe Asp Lys Tyr Gln Ile Pro Tyr Asp Val
 420 425 430
 Ile Trp Leu Asp Ile Glu Tyr Thr Asp Asp Arg Lys Tyr Phe Thr Trp
 435 440 445
 Asp Pro Leu Ser Phe Pro Asp Pro Lys Gly Met Glu Glu Gln Leu Asp
 450 455 460
 Asp Ser Glu Arg Lys Leu Val Val Ile Ile Asp Pro His Ile Lys Asn
 465 470 475 480
 Lys Glu Gly Tyr Ser Ile Ser Glu Glu Leu Lys Gly Lys Asp Leu Ala
 485 490 495
 Ile Lys Asn Lys Gly Gly Glu Thr Tyr Asp Gly Trp Cys Trp Pro Gly
 500 505 510
 Ser Ser His Trp Val Asp Cys Phe Asn Pro Glu Ala Ile Lys Trp Trp
 515 520 525
 Thr Gly Leu Phe Lys Tyr Asp Lys Phe Lys Gly Thr Gln Pro Asn Val
 530 535 540
 Phe Ile Trp Asn Asp Met Asn Glu Pro Ser Val Phe Asn Gly Pro Glu
 545 550 555 560
 Thr Thr Met Pro Lys Asp Asn Ile His Tyr Gly Asn Trp Glu His Arg
 565 570 575
 Asp Val His Asn Val Asn Gly Leu Thr Phe Ile Asn Ala Thr Tyr Asn
 580 585 590
 Ala Leu Leu Glu Arg Lys Lys Gly Val Val Arg Arg Pro Phe Val Leu
 595 600 605
 Thr Arg Ser Phe Tyr Ala Gly Ala Gln Arg Val Ser Ala Met Trp Thr
 610 615 620

Gly Asp Asn Gln Ala Thr Trp Glu His Leu Ala Ala Ser Leu Pro Met
 625 630 635 640

Val Leu Asn Asn Gly Ile Ala Gly Phe Pro Phe Ala Gly Ala Asp Val
 645 650 655

Gly Gly Phe Phe Gln Asn Pro Ser Lys Glu Leu Leu Thr Arg Trp Tyr
 660 665 670

Gln Ala Gly Ile Trp Tyr Pro Phe Phe Arg Ala His Ala His Ile Asp
 675 680 685

Thr Arg Arg Arg Glu Pro Tyr Leu Ile Ala Glu Pro Phe Arg Ser Ile
 690 695 700

Ile Ser Gln Ala Ile Arg Leu Arg Tyr Gln Leu Leu Pro Ala Trp Tyr
 705 710 715 720

Thr Ala Phe His Glu Ala Ser Val Asn Gly Met Pro Ile Val Arg Pro
 725 730 735

Gln Tyr Tyr Val His Pro Ala Asp Glu Gln Gly Phe Ala Ile Asp Asp
 740 745 750

Gln Leu Tyr Leu Gly Ser Thr Gly Leu Leu Ala Lys Pro Val Val Val
 755 760 765

Glu Gly Ala Thr Thr Thr Asp Ile Tyr Ile Ala Asp Asp Glu Lys Tyr
 770 775 780

Tyr Asp Tyr Tyr Asp Phe Thr Val Tyr Gln Gly Ala Gly Arg Arg His
 785 790 795 800

Thr Val Pro Ser Pro Ile Glu Lys Val Pro Leu Leu Met Gln Gly Gly
 805 810 815

His Ile Ile Pro Arg Lys Asp Arg Ala Arg Arg Ser Ser Gly Leu Met
 820 825 830

Arg Trp Asp Pro Tyr Thr Leu Val Ile Val Leu Asp Lys Asn Gly Lys
 835 840 845

Ala Glu Gly Thr Leu Tyr Val Asp Asp Gly Glu Ser Phe Asn Tyr Gln
 850 855 860

Gln Gly Ala Tyr Ile His Arg Arg Phe Lys Phe Glu Lys Ser Thr Leu
 865 870 875 880

Leu Ser Glu Asp Ile Gly Thr Lys Gly Ser Lys Thr Ala Glu Tyr Leu
 885 890 895

ES 2 545 612 T3

Lys Ser Met Thr Asn Val Arg Val Gln Lys Val Val Val Val Asp Ala
900 905 910

Pro Lys Glu Trp Gln Gly Arg Thr Ser Val Thr Val Ile Glu Asp Gly
915 920 925

Ala Lys Met Ala Ser Thr Ala Pro Leu Glu Tyr His Ala Gln Gln Ala
930 935 940

Gly Lys Ala Ala Tyr Ala Val Val Lys Lys Pro Asp Val Gly Ile Gly
945 950 955 960

Lys Thr Trp Lys Ile Glu Phe
965

<210> 5

<211> 3167

5 <212> ADN

<213> Aspergillus fumigatus

<400> 5

ES 2 545 612 T3

atggccagcg	tcttgggcct	cgtcgccagt	gcctggctcc	tccccacggc	ctatggcgca	60
agccattcgc	ttgcgcctag	cacgtccgca	acctcagcac	aggcgcaata	cactttacca	120
tcttctattg	acgttggcgc	tcaattgatc	gccaacatcg	acgatccccct	tgccgtcgac	180
gcgcagtctg	tgtgtccggg	ctacacagcc	tcagatgtgc	accagacatc	ccatggtttc	240
accgctaacc	tacagctcgc	gggtgaccca	tgcaacgtgt	acgggacaga	cgttgattcg	300
ctgtctctga	cagtggatta	tttggccaag	gaccgcctga	atatccaagt	tgttcctacc	360
cacgtggatg	cctccaacgc	ttcttggtac	ctcctctcgg	aagatttggg	gccccgggct	420
catggccccg	gogtgtccgc	ctctcaaagc	gactttgaag	tgaagtggtc	caacgagcct	480
tctttcaacc	tcaaggteat	tcgcaaggct	actggagacg	tcctcttcga	taccgagggc	540
tctgtcttgg	tctttgagaa	ccagttttatc	gagtttgtct	cttcgttgcc	tgagggttac	600
aacctgtacg	ggctgggaga	gcgcatggcc	cagctgcggc	tcttgagaaa	cgcgaccctg	660
accacctatg	cagcggatgt	gggagacccg	attgataggt	atggttctgg	ccatggttga	720
aatctaattg	acgaagtcga	caagcttaca	atcggctctc	cacagcaaca	tctatggaca	780
gcatccgctc	tacctcgaca	ctcgatacta	caccaaaggc	gcgaatgggt	cctactcgct	840
tgtcaacgcc	gacgaggcgg	acttgtcggg	ggatcatgaa	tcattctccc	acggtgtctt	900
tctgagaaac	gctcatggtc	aggaagttct	cctgcagccc	cgcaacatta	cctggcgcac	960
aattggtggt	agcatcgatc	tgactttcta	ctccggtccc	acgcaagcgg	acgtcacaaa	1020
gagctaccag	ctctccacta	ttggacttcc	tgcaatgcag	cagtacagcg	cccttggata	1080
ccaccaatgc	cgctggggct	accagaattg	gtctcagctc	gaggaagtag	tcaacaactt	1140
tgagcgattt	gagattcctc	tggaaatacat	ctggtcagtc	gggtttctga	gtttctacat	1200
attgtcctag	tttcttttat	ttaccttcc	tccaggagcg	acatcgatta	catgcttggc	1260
taccgggact	ttgagaatga	tcccgaaacgg	ttctcctacg	atgaaggcga	ggaatttctg	1320

ES 2 545 612 T3

aacaactgc acaagtcggg acgacactgg gttcctatcg ttgactcggc aatctatatt 1380
cccaaccccg acaatgcatt ggatgcgtaa gtccttatta tcttatcctc cttgtgagat 1440
ggtaagttc aagtctcac gaaagtgtga actccaggta cgagccttat gctcgcgggg 1500
caaaggatga cgtttttatc aagaaccctg atggcacctc ctacatcggg gcagtgtggc 1560
cgggctttac tgtcttcccc gattggcaca accccaaggc atttgactac tgggccaacg 1620
aactcgtcat ctggtcaaag aagggttgcgt tcgatggcat ctggattgat atgagcgaag 1680
tatcctcttt ctgctgtggc agctgtggaa caggaaagct acatctgaat ccggttcacc 1740
caccattcca gttcccggt gaacctggca atgtcggcta cgactacccc gaggccttca 1800
acgtgacgaa ctctaccgaa gcggcctctg cctccgccc cctctgccagt caggcttcgg 1860
ctgcttctgc taccgaagcc gccacgacgt caacatctac atcgtatctg cggacgacgc 1920
ccacgccggg cgtccgcgac gtcaactacc ctccatagt gattaatcat gttcaggagg 1980
gccatgacct tgccgtgac gccatttctc ccaactccac ccagtggac ggcgtccagg 2040
aatacgatgt tcacagtctg tggggccacc agatcctcaa tgctacctac tacggactgc 2100
gccagggtct cactgagaag cgaccttca tcattggccg gtctaccttt gctggctcgg 2160
gcaagtgggc cggtaactgg ggcggtgata acaactccaa atgggggtcc atgttctctg 2220
ccatctcgca gggctctgct ttctcgetat tcggatttcc catgttcggc gtggatacat 2280
gcggtttcaa cggcaactact gacgaggagc tttgcagccg gtggatgcag ctgtcggcct 2340
tcttccccct craccgcaac cacaatgtcc ttgcccctat cccccaggaa ccttaccgct 2400
gggcctctgt cgcccaagcc tccaaggccg ctatgaagat ccgctattcc ctctacctt 2460
acttctacac tcttttccac cagggccaca ccaccggctc taccgtcatg cgcgctctcg 2520
cctgggagtt ccccacggac ccgtccctcg ccgcccgcga cactcagttc atggtcggcc 2580
cttccatcat ggtctgcccc gtgcttgagc ccctcggcga taccgtcaag ggcgtgttcc 2640
caggcgtcgg caaaggcgaa gtctggtacg actggtacac ccagaccgcc gtggacgcca 2700
aaccggcgt caacgccacc attcccgcac cgtcgggcca cattcccgtc tatgtccgtg 2760
gaggcagcat cctgcccatt caggagcccg ccctcacgac cagagaccgc cgtaacactc 2820
cctggtctct actcgtcgt ctgagtggca accagactgc cttgggctcg ctgtatcttg 2880
acgacggaag cagcctcaac ccgtcccgca ctctcgatgt cgacttccag gctacagcct 2940
cgagcatcaa ggtctcggtc aagggtacct gggaggagaa gaaccgctg gataagggtga 3000
ctgtcctcgg cgtgactgag aagccttctg ctgtgacgtt caacggcccgc aacgtccacc 3060
ctggtcagat gcaactacaat actaccacca aggtgctgtc tgtgcaggga ttgcacagca 3120
tgactccccca tggcgcctgg gctggacact ggattctgaa atggtag 3167

- <210> 6
- <211> 988
- <212> PRT
- <213> Aspergillus fumigatus
- <400>6

5

ES 2 545 612 T3

Met Ala Ser Val Leu Gly Leu Val Ala Ser Ala Trp Leu Leu Pro Thr
1 5 10 15

Ala Tyr Gly Ala Ser His Ser Leu Ala Pro Ser Thr Ser Ala Thr Ser
20 25 30

Ala Gln Ala Gln Tyr Thr Leu Pro Ser Ser Ile Asp Val Gly Ala His
35 40 45

Leu Ile Ala Asn Ile Asp Asp Pro Leu Ala Val Asp Ala Gln Ser Val
50 55 60

Cys Pro Gly Tyr Thr Ala Ser Asp Val His Gln Thr Ser His Gly Phe
65 70 75 80

Thr Ala Asn Leu Gln Leu Ala Gly Asp Pro Cys Asn Val Tyr Gly Thr
85 90 95

Asp Val Asp Ser Leu Ser Leu Thr Val Asp Tyr Leu Ala Lys Asp Arg
100 105 110

Leu Asn Ile Gln Val Val Pro Thr His Val Asp Ala Ser Asn Ala Ser
115 120 125

Trp Tyr Leu Leu Ser Glu Asp Leu Val Pro Arg Ala His Gly Pro Gly
130 135 140

Val Ser Ala Ser Gln Ser Asp Phe Glu Val Lys Trp Ser Asn Glu Pro
145 150 155 160

Ser Phe Asn Leu Lys Val Ile Arg Lys Ala Thr Gly Asp Val Leu Phe
165 170 175

Asp Thr Glu Gly Ser Val Leu Val Phe Glu Asn Gln Phe Ile Glu Phe
180 185 190

Val Ser Ser Leu Pro Glu Gly Tyr Asn Leu Tyr Gly Leu Gly Glu Arg
195 200 205

Met Ala Gln Leu Arg Leu Leu Arg Asn Ala Thr Leu Thr Thr Tyr Ala
210 215 220

Ala Asp Val Gly Asp Pro Ile Asp Arg Asn Ile Tyr Gly Gln His Pro
225 230 235 240

Phe Tyr Leu Asp Thr Arg Tyr Tyr Thr Lys Gly Ala Asn Gly Ser Tyr
245 250 255

Ser Leu Val Asn Ala Asp Glu Ala Asp Leu Ser Glu Asp His Glu Ser
260 265 270

Phe Ser His Gly Val Phe Leu Arg Asn Ala His Gly Gln Glu Val Leu
 275 280 285
 Leu Gln Pro Arg Asn Ile Thr Trp Arg Thr Ile Gly Gly Ser Ile Asp
 290 300
 Leu Thr Phe Tyr Ser Gly Pro Thr Gln Ala Asp Val Thr Lys Ser Tyr
 305 310 315 320
 Gln Leu Ser Thr Ile Gly Leu Pro Ala Met Gln Gln Tyr Ser Ala Leu
 325 330 335
 Gly Tyr His Gln Cys Arg Trp Gly Tyr Gln Asn Trp Ser Gln Leu Glu
 340 345 350
 Glu Val Val Asn Asn Phe Glu Arg Phe Glu Ile Pro Leu Glu Tyr Ile
 355 360 365
 Trp Ser Asp Ile Asp Tyr Met Leu Gly Tyr Arg Asp Phe Glu Asn Asp
 370 375 380
 Pro Glu Arg Phe Ser Tyr Asp Glu Gly Glu Glu Phe Leu Asn Lys Leu
 385 390 395 400
 His Lys Ser Gly Arg His Trp Val Pro Ile Val Asp Ser Ala Ile Tyr
 405 410 415
 Ile Pro Asn Pro Asp Asn Ala Leu Asp Ala Tyr Glu Pro Tyr Ala Arg
 420 425 430
 Gly Ala Lys Asp Asp Val Phe Ile Lys Asn Pro Asp Gly Thr Leu Tyr
 435 440 445
 Ile Gly Ala Val Trp Pro Gly Phe Thr Val Phe Pro Asp Trp His Asn
 450 455 460
 Pro Lys Ala Phe Asp Tyr Trp Ala Asn Glu Leu Val Ile Trp Ser Lys
 465 470 475 480
 Lys Val Ala Phe Asp Gly Ile Trp Ile Asp Met Ser Glu Val Ser Ser
 485 490 495
 Phe Cys Val Gly Ser Cys Gly Thr Gly Lys Leu His Leu Asn Pro Val
 500 505 510
 His Pro Pro Phe Gln Leu Pro Gly Glu Pro Gly Asn Val Gly Tyr Asp
 515 520 525
 Tyr Pro Glu Ala Phe Asn Val Thr Asn Ser Thr Glu Ala Ala Ser Ala
 530 535 540

ES 2 545 612 T3

Ser Ala Ala Ser Ala Ser Gln Ala Ser Ala Ala Ser Ala Thr Gln Ala
 545 550 555 560
 Ala Thr Thr Ser Thr Ser Thr Ser Tyr Leu Arg Thr Thr Pro Thr Pro
 565 570 575
 Gly Val Arg Asp Val Asn Tyr Pro Pro Tyr Val Ile Asn His Val Gln
 580 585 590
 Glu Gly His Asp Leu Ala Val His Ala Ile Ser Pro Asn Ser Thr His
 595 600 605
 Val Asp Gly Val Gln Glu Tyr Asp Val His Ser Leu Trp Gly His Gln
 610 615 620
 Ile Leu Asn Ala Thr Tyr Tyr Gly Leu Arg Gln Val Phe Thr Glu Lys
 625 630 635 640
 Arg Pro Phe Ile Ile Gly Arg Ser Thr Phe Ala Gly Ser Gly Lys Trp
 645 650 655
 Ala Gly His Trp Gly Gly Asp Asn Asn Ser Lys Trp Gly Ser Met Phe
 660 665 670
 Leu Ser Ile Ser Gln Gly Leu Ser Phe Ser Leu Phe Gly Ile Pro Met
 675 680 685
 Phe Gly Val Asp Thr Cys Gly Phe Asn Gly Asn Thr Asp Glu Glu Leu
 690 700
 Cys Ser Arg Trp Met Gln Leu Ser Ala Phe Phe Pro Phe Tyr Arg Asn
 705 710 715 720
 His Asn Val Leu Ala Ala Ile Pro Gln Glu Pro Tyr Arg Trp Ala Ser
 725 730 735
 Val Ala Gln Ala Ser Lys Ala Ala Met Lys Ile Arg Tyr Ser Leu Leu
 740 745 750
 Pro Tyr Phe Tyr Thr Leu Phe His Gln Ala His Thr Thr Gly Ser Thr
 755 760 765
 Val Met Arg Ala Leu Ala Trp Glu Phe Pro Thr Asp Pro Ser Leu Ala
 770 775 780
 Ala Val Asp Thr Gln Phe Met Val Gly Pro Ser Ile Met Val Val Pro
 785 790 795 800
 Val Leu Glu Pro Leu Ala Asp Thr Val Lys Gly Val Phe Pro Gly Val
 805 810 815
 Gly Lys Gly Glu Val Trp Tyr Asp Trp Tyr Thr Gln Thr Ala Val Asp

ES 2 545 612 T3

	820		825		830														
Ala	Lys	Pro	Gly	Val	Asn	Ala	Thr	Ile	Pro	Ala	Pro	Leu	Gly	His	Ile				
		835					840					845							
Pro	Val	Tyr	Val	Arg	Gly	Gly	Ser	Ile	Leu	Pro	Met	Gln	Glu	Pro	Ala				
	850					855					860								
Leu	Thr	Thr	Arg	Asp	Ala	Arg	Asn	Thr	Pro	Trp	Ser	Leu	Leu	Val	Ala				
865					870					875					880				
Leu	Ser	Gly	Asn	Gln	Thr	Ala	Leu	Gly	Ser	Leu	Tyr	Leu	Asp	Asp	Gly				
			885						890					895					
Ser	Ser	Leu	Asn	Pro	Ser	Arg	Thr	Leu	Asp	Val	Asp	Phe	Gln	Ala	Thr				
			900					905					910						
Ala	Ser	Ser	Ile	Lys	Val	Ser	Val	Lys	Gly	Thr	Trp	Glu	Glu	Lys	Asn				
		915					920					925							
Arg	Leu	Asp	Lys	Val	Thr	Val	Leu	Gly	Val	Thr	Glu	Lys	Pro	Ser	Ala				
	930					935					940								
Val	Thr	Phe	Asn	Gly	Arg	Asn	Val	His	Pro	Gly	Ser	Val	His	Tyr	Asn				
945					950					955					960				
Thr	Thr	Thr	Lys	Val	Leu	Ser	Val	Gln	Gly	Leu	His	Ser	Met	Thr	Pro				
			965						970					975					
His	Gly	Ala	Trp	Ala	Gly	His	Trp	Ile	Leu	Lys	Trp								
			980					985											

<210> 7
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Aspergillus niger

<400> 7
 gtgccccatg atacgcctcc gg 22

<210> 8
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Aspergillus niger

<400> 8
 gagtcgtatt tccaaggctc ctgacc 26

<210> 9
 <211> 24

ES 2 545 612 T3

<212> ADN

<213> Aspergillus niger

<400> 9

5 ggaggccatg aagtggacca acgg 24

<210> 10

<211> 45

<212> DNA

10 <213> Aspergillus niger

<400> 10

caccgtgaaa gccatgctct ttcctcgtg tagaagacca gacag 45

15 <210> 11

<211> 45

<212> ADN

<213> Aspergillus niger

20 <400> 11

ctggtcttct acacgaagga aagagcatgg ctttcacggt gtctg 45

<210> 12

<211> 44

25 <212> DNA

<213> Aspergillus niger

<400> 12

ctatatacac aactggattt accatgggcc cgcggccgca gatc 44

30

<210> 13

<211> 44

<212> ADN

<213> Aspergillus niger

35

<400> 13

gatctgcggc cgcgggcca tggtaatcc agttgtgtat atag 44

<210> 14

40 <211> 26

<212> ADN

<213> Aspergillus niger

<400> 14

45 gtcgacatgg tgtttgatc atttta 26

<210> 15

<211> 26

ES 2 545 612 T3

<212> ADN
 <213> Aspergillus niger

 <400> 15
 5 ccatggccag ttgttatat agagga 26

 <210> 16
 <211> 29
 <212> ADN
 10 <213> Aspergillus fumigatus

 <400> 16
 tacacaactg gccatgttga gatcgctgc 29

 15 <210> 17
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Aspergillus fumigatus

 20 <400> 17
 gtcacctcta gttaattaac tagctgaggt caatctcgg 39

 <210> 18
 <211> 30
 25 <212> ADN
 <213> Aspergillus fumigatus

 <400> 18
 30 gcatggagca gggcatcttc ctgcagactc 30

 <210> 19
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Aspergillus fumigatus
 35
 <400> 19
 gagtctgcag gaagatgcc tgctccatgc 30

 <210> 20
 40 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Aspergillus fumigatus

 <400> 20
 45 acacaactgg ccatggccc gagcagctcg tc 32

 <210> 21
 <211> 40

<212> ADN

<213> Aspergillus fumigatus

<400> 21

5 agtcacctct agttaattaa ttagaattca atcttccatg 40

<210> 22

<211> 32

<212> ADN

10 <213> Aspergillus fumigatus

<400> 22

cgcgagctc cagactccag gaaagaaatc ac 32

<210> 23

<211> 32

<212> ADN

<213> Aspergillus fumigatus

20 <400> 23

gtacttgaac aagccgtcc accattgat tg 32

<210> 24

<211> 32

25 <212> ADN

<213> Aspergillus fumigatus

<400> 24

gcctgctgc tggcggtgat actccaaggg tg 32

30

<210> 25

<211> 39

<212> ADN

<213> Aspergillus fumigatus

35

<400> 25

tacacaactg gccatggcca gcgtcctggg cctcgtcgc 39

<210> 26

40 <211> 43

<212> ADN

<213> Aspergillus fumigatus

<400> 26

45 gtcacctcta gtaattaac taccattca gaatccagt tcc 43

- 21 -

REIVINDICACIONES

- 5 1. Polipéptido aislado que tiene actividad de alfa-glucosidasa, donde el polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90% de identidad con los aminoácidos 20 a 988 de la SEC ID nº 6.
2. Polipéptido según la reivindicación 1, con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95%, al menos un 97% de identidad con los aminoácidos 20 a 988 de la SEC ID nº 6.
- 10 3. Polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID nº 6.
4. Polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que consiste en la SEC ID nº 6; o fragmentos de la misma que tienen actividad de alfa-glucosidasa.
- 15 5. Polipéptido según las reivindicaciones 1-4, que consiste en la SEC ID nº 6.
6. Polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que consiste en los aminoácidos 20 a 988 de la SEC ID nº 6.
- 20 7. Polipéptido según la reivindicación 1, que es codificado por el polinucleótido contenido en plásmido pJSF9b que está contenido en *E. coli* NRRL B-30856.
8. Polinucleótido aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-7.
- 25 9. Constructo de ácidos nucleicos que comprende el polinucleótido según la reivindicación 8 operativamente enlazado a una o varias secuencias de control que dirigen la producción del polipéptido en un huésped de expresión.
- 30 10. Vector de expresión recombinante que comprende el constructo de ácidos nucleicos según la reivindicación 9.
11. Célula huésped recombinante que comprende el constructo de ácidos nucleicos según la reivindicación 9.
- 35 12. Método para producir el polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-7 que comprende (a) cultivar una célula, que en su forma tipo salvaje es capaz de producir el polipéptido, bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido; y (b) recuperar el polipéptido.
- 40 13. Método para producir el polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-7 que comprende (a) cultivar una célula huésped que comprende un constructo de ácidos nucleicos que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido; y (b) recuperar el polipéptido.

M L R S L L L A P L V G A A V I G A R
1 ATGTGAGATCGCTGCTACTTCTTGGCCCTTGTGGCGCTCCGTGATCGGCCAGG
D H S Q E C P G Y K A T N I R E G R D S
61 GACCACAGCCAGAGTGTCTGTACAAGGCCACCAATATAGAGAGGGTCCGATCC
L T A D L T L A G K P C N T Y G T D L K
121 TTAACGGCGGATTTGACCTTGGCCGGTAAACCGTGAACACTTACGGCACCGACTTGAAG
N L K L L V E Y Q T
181 AATCTGAAACTCCTTGTGAGTACCAGACCCGGTACCGTTTTCAGCGTTAAACGGCTATGAT
D K R L H V K I Y D A D E E
241 TGTAGCTTACTTCTTCTAGATAAACGCCCTCCATGTTAAGATCTATGACGCCGATGAGGA
V Y Q V P E S V L P R V D G K G S S K
301 GGTTTACCAAGTCCCAGTCCGTTCTCCCTCGGTGGATGGCAAGGTGGATCGAGCAA
K S A L K F D Y Q A N P F S F K V K R G
361 GAAGTCGGCGCTCAAGTTCGACTATCAGGCGAATCCGTTCTCTTCAAGGTCAAGAGAGG
G E V L F D T S G S N L I F Q S Q Y L S
421 CGCGAGGTGCTCTTCGACACCTCCGGTTCGAATCTGATCTTCCAGTCCGAGTACCTGAG
L R T W L P E D P M L Y G L G E H T D S
481 CCTCCGACCTGGTTGCCCGAGGATCCTAATCTCTACGGTCTTGGCGGACACACGGATTC
L R L E T T N Y T R T L W N R D A Y A I
541 TCTTCGTCTGGAGACCACCACTACACCGGTACTCTGTGGAACCCGTGACCGGTATGCTAT
P E K T N L Y G T H P V Y Y D H R G Q H
601 TCCTGAGAAGACCAACTGTACGGCACTCATCCCGTGTACTATGACCCCGTGGCCCAACA
G T H G V F L L N S N G M D I K I D K T
661 CGGCACCCCGGTGCTTCTTGGTGAACCTCCAACGGCATGGACATTAAGATCGACAAGAC

Fig. 1A

K D G K Q Y L E Y N T L G G V F D F Y F
 721 CAAGGATGGCAAGCAGTACTTAGAGTACAACACACTCGGGAGGGTGTCTTTGACTTTTACTTT
 F T G A T P K D A S I E Y A K V V G L P
 781 CTTTACCGGTGCCACCCCAAGGATGCCAGCATGGAGTATGGGAAGTCCGTCGGTCTTCC
 A M Q S Y W T F G
 841 CGCTATGCAGTCTTACTGGACGTTCCGGTGTACGTTTCCCTTGATTCCGATCTCCGGTCCCTTC
 F H Q C R Y G Y R D V F E
 901 CGGCTAACTCTGTGCTTAGTTCACCAATGCAGATACCGGCTATCGTGTATGTCTTTGAG
 V A E V V Y N Y S Q A K I P L E T M W T
 961 GTCCCGAGGTTCTTACAACCTACAGCCAGCGGAAGATTCCACTGGAGACCATGTGGACC
 D I D Y M D R R R V F T L D P E R F P L
 1021 GACATFGACTACATGGACAGACGTCGGGTGTTCACTCTTGACCCCGGAGCGGATTCGCCGCTC
 E K M R E L V S Y L H N H N Q H Y I V M
 1081 GAGAAAGATGCCGTGAGTTGGTGTCAATATCTTCACAACCAACCAACACACATACATCGTTCATG
 V D P A V S V S
 1141 GTTGACCCCGCGTCAGCGTGCAGCGGTAAGTTTACCTTTCCAAAGTATGGAGGGGGTGGGT
 D N V G Y N D G M E Q G I F
 1201 GCATATTGACAAATGATCAGACAACGTTGGCTFACAATGATGGCAITGGAGCAGGGCATCTTT
 L Q T Q N G S L Y K
 1261 CCTGCAGACTCAAAACGGTAGCCTCTACAAGGGTAAGCCTTACCTAAAAGFACATAATGAC
 G A V W P G V T A Y P D
 1321 ACCCAGAAATATTGACCCCTATACAGGTGCCGTCGTGGCCCTGGTGTGACTGCGTATCCCTGACT
 W F H P D I Q K Y W N D Q O F A K F F D P
 1381 GGTTCACCCCTGACATCCAAAAGFACCTGGAAACGACCAGTTTGCCAAAATCTTCGACCCCA

Fig. 1B

K T G V D I D G L W I D M N E A A N F C
 1441 AGACCGGCGTCGACATCGACGGTCTGTGGATCGATATGAACGAGGCCGCAACTTCTGCCC
 F Y P C S D P E G Y A R D N D L P P A A
 1501 CTPACCCCTGCAGTATCCCGAGGGCTACGCTAGGGATAACGACCTGCCCTCCCGCCGCTC
 P P V R P S N P R P L P G F P G D F Q P
 1561 CCCCCGTTCCGGCCAGCAACCCGGCCCGTTGCCCGGATTCCTGGTGAATTCAGCCCT
 S S S K R S T K G S K V G L P N R D L
 1621 CATCCCTCGTGAAGCGCTCCACCAAGGATCTAAAGTTGGACTGCCCTAATCGTACCTGGA
 I N P P Y M I R N E A G S L S N K T I N
 1681 TCAACCTCCGTACATGATCCGTAATGAAGCTGGCTCGCTCAGCAACAAGACCATCAACA
 T D I I H A G E G Y A E Y D T E N L Y G
 1741 CCGATATCATTCATGCTGGTGGAGGATATGCCGAGTAIGACACACACACCTTTATGGTA
 T M S S
 1801 CCAGTAAGTAGGCATCCCTCTGAATGACGGGGACAGTCTAAACATTCAAAAGTGAATGATTC
 A S R N A M Q H R R P G V R P L V I T R
 1861 CGCTTCTCGCAATGCCAATGCAACACCGCCCGCTGGGGTGGCCCATTTGGTCACTACTCG
 S T Y A G A G A H V G H W
 1921 CAGCACGTAATGCTGGTGGCCCGCCACGTTGGACACTGGTGGTGCATCCATCTPAGT
 L G D N I S E W S
 1981 ACCTGCGAACTCTTATACTGACACTTGACAGGCTCGGTGACAAACAATCTCCGAGTGGAGCA
 K Y R I S I S Q M L A F A S M F Q V P M
 2041 AGTACCGCATCTCCATCTCGCAGATGCTTGGCTTGCCTCGATGTCCAGGTGCCCTAIGA
 I G S D V C G F G G N T T E E L C A R W
 2101 TCGGATCAGACGCTCTGGGGTTCGGCGGCAACACCAGGAGCTCTGGCGCTCGCTGGG

Fig. 1C

A R L G A F Y T F F R N H N E I T G I P
 2161 CGCGTCTCGGAGCCCTTCTACACCTTCTTCGCAACCACAATGAAATCACCGGATATCCCGC
 Q E F Y R W P T V A E S A R K A I D I R
 2221 AGGAGTCTACCGCTGGCCACCGTGGAGTCGGCTCGCAAGGCCATCGACATCCGGCT
 Y R L L D Y I Y T A F H R Q T Q T G E P
 2281 ACAGGCTGCTTGACTACATCACAGCCCTCCACCGGAGACCCAGACCGGCGGAGCCCT
 F L Q P M F Y L Y P K D K D T F S N Q L
 2341 TCCTGACGCCCATGTTCTACCTCTATCCCAAGGACAAGGACACCTTCAGCAACCAGCTGC
 Q F F Y G D A I L V S P V T D G S Q T S
 2401 AGTTCTTCTACGGTGACGCCATCCTGTCAGCCCTGTCCCGGAGCCAGACTTCAG
 V D A Y F P D D I F Y D W H T G A A L R
 2461 TTGACGCATACITCCCGGATGATATCTTCTACGATTTGGCACACGGCGCCCGCTACGCG
 G R G A N V T L S N I D V T E I P I H I
 2521 GCCGGGAGCCAACGTCACCTCAGCAACATCGAAGTGAAGTGCATCCCATCCACATCC
 R G G S I I P V R S E S A M T T E L R
 2581 GCGGGGCAGCATCATCCCGTCCGGTCCGAGTCCGCCATGACCCACCGGAGCTGGCCA
 K K G F E L I I A P G L D G T A S G S L
 2641 AGAAGGCTTCGAGCTCATCATGCCCCAGGGCTTGATGGGACTGCCCTGGGCGAGTTGT
 Y L D D G D S I E P R A T L E L E F T Y
 2701 ATCTCGACGGCGACTCCATCGAGCCGCGCGGACCCCTCGAGCTGGAGTTCACGTACC
 R K G H L Q V K G K F G F R T E V K I N
 2761 GCAAGGCCATCTCCAGGTGAAGGGCAAGTTCGGTTTCGGCACGGAGGTCAAGATCAACG
 A V T L L G Q S A P A S K S A D V A S L
 2821 CCGTCACCCCTGCTGGCCAGTCTGGCCCTGCCCTCCAAGTCTGCAGACGTTGGCCCTCCCTTG

Fig. 1D

D S G R Q A V T I K T S L D L T G P S E
2881 ACTCTGGCCGCCAGGCACTGACCATCAAGACGAGCCCTGGATCTGACTGGTCTTCCGAGA
I D L G *
2941 TTGACCTCGGCTAG

Fig. 1E

M A R S S S L S R W T L L L A L V V I L G C
1 ATGGCCCGGA GCAGCTCGTC TCTCTCCAGA TGGAGGCTAT TGCTCGCGTT GGTGTGCAAT CTCGGGTGTC
L V V P G
71 TTGTGTACC CGGAGGTGAG CTCTATGGC TCAACTTAAT CCAATAGTAA CGCCATCTGA CCAAGTCTGC
V T V K H E N F K K C S Q S G F C K R N R A F
141 CAGTACTGT GAAGCATGAG AACTTCAAGA AATGCTCTCA ATCGGTTTT TGTAAAGCAA ACCGAGCTTT
A D D V S A Q G A S W I S P Y E L D P S S I H
211 TGCAGATGAC GTCTCCGCC AAGCGCGTC TTGGATTCA CCATATGAAC TCGATCCCTC CTCRATTCAC
F K D G Q L Q G T I L K S I S A N E K V K L P
281 TTCAAAGATG GCCAACTGCA AGGGACAATT CTCAAAGTCCA TATCTGCCNA TGAGAAAGTC AAGCTGCCAC
L V I S F L E S G A A R I V V D E E K R M K G R
351 TTGTGATTTC TTTCTGGAG TCTGGAGCTG CCGGCATCGT GGTCGAGCAA GAGAAGCGGA TGAAGGGCGA
I D L R H N S Q V R K E R Y N E A E Q W A L V
421 AATGACCTC CGACATAACA GCCAAGTGG CAAAGAGCGA TACAATGAAG CAGAGCAATG GGCACVTGTT
G G L E S S K T A A V D T E S E T G F T K V L
491 GGTGGTTTTG AATCGAGCAA AACTGCCGCT GTGGACACAG AATCCGAGAC TGGATTACA AAGTACTTT
Y G P D N K F Q A I I R H A P F S V D F Q R D G
561 ACGGGCCGGA TAACAAGTTT CAGGCAATCA TTGCGCATGC GCCGTTCCAGC GTTGATTTTC AGCGCGATGG
Q S H V R V N H K G F L N V E H W R P K V D V
631 CCGAGCCAT GTCCGAGTGA ATCACAAGGG CTTCTCAAC GTGGAACACT GGCGGCCAAA GGTGGATGIG
A E G D S V Q E K S I P Q Q D E S T W W E T
701 GCAGAGGGTG ACAGTGTCA GGAATAATCG ATACTCAGC AAGATGAAG CACTTGGTGG GAGGAACCTT
F G G N T D S K P K G P E S I G L D I T F P G Y
771 TTGGTGGAA CACCGACTCC AAGCCAAAAG GTCCGAAAG TATCGGCCIG GACATCACAT TCCCTGGCTA
S H V F G I P E H A D S M S L K E T R
841 CAGCCATGTT TTTGGGATTC CAGAGCATGC CGACTCGAATG TCTCTGAAGG AAACCAGGTA GGTGTACAT
G G D G N H A E P
911 GTCCCTGCC CTCTAGAGAC GCAAAGCTGA TCAGTTGAA GGGCGGTGA TGGAAATCAT GCGCAACCTT
Y R M Y N T D V F E Y E L N S P M T L Y G A I P
981 ATCGCATGTA CAAACCGGAC GTCTTTGAAAT ATGAACTCAA CAGTCCCATG ACGCTCTAATG GGGCCATTC

Fig. 2A

F M Q A H K K D S T V G V F W L N A A E T W V
 1051 GTTCATGCAE GCTCACAAGA AGGACICTAC TGTGGGTGTC TTCTGGCTGA ACGCTGCCGA GACCTGGGTC
 D I V K S K S S P D P L S L G V G S K T D T Q
 1121 GACATCGTCA AGTCGAAATC CTCGCCCGAC CCTCTTCTC TTGGAGTAGG TTGGAAGACA GACACCCAAA
 T H W F S E S G R I D L F V F L G P T P Q E I S
 1191 CTCATTGGTT TTCCGAGTCG GGACGTATTG ATTTGTTTGT CTTCCTGGGC CCCACTCCGC AAGAGATCAG
 K T Y G E L T G Y T Q L P Q Q F A I A Y H Q C
 1261 CAAPACATAC GGTGAACCTA CCGGCTACAC TCAATTACCT CAACAGTTGG CTATCGCTTA CCACCAGTGT
 R W N Y V T D E D V K E V D R K F D K Y Q I P
 1331 CGTTGGAACT ATGTCACCGA CGAGGATGC AAGGAATG ATOGCAAGTT TGACAAGTAT CAGATCCCTT
 Y D V I W L D I E Y T D D R K Y P T W D P L S F
 1401 ACGAATGTGAT TTGGCTTGAC ATTGAGTACA CCGATGACCG GAAGTACTTT ACCTGGGACC CTCYAGTTTT
 P D P K G M E E Q L D D S E R K L V V I I D P
 1471 TCCTGACCCG AAGGATATGG AAGAGCAGCT TGATGACTCC GAGGCAAAC TCCTTGTGAT CATTGACCCG
 H I K N K E G Y S I S E E L K G K D L A I K N
 1541 CACATTAAA ACAAGGAGG ATACTCCATC TCTGAAGAGC TGAAGGGCAA GGATCTGGCT ATTAAGAACA
 K G G E T Y D G W C W P G S S H W V D C F N P E
 1611 AGGGCGGGA GACCTACGAC GGCCTGGTGT GGCCTGGTTC ATCTCAGTGG GTGGACTGCT TCAATCCCGA
 A I K W M T G L F K Y D K F K G T Q P N V F I
 1681 AGCAATCAA TGGTGGACCG GCTTGTTCAA GTACGACAAA TTCAAGGGCA CCCAGCCAAA CGTCTTTATT
 W N D M N E P S V F N G P E F T M P K D N I H
 1751 TGGATGACA TGAATGAGCC CTCGTCTTC AATGGACCGG ARACCACATAT GCCCAAGAC AATATCCACT
 Y G N W E H R D V H N V M G L T F I N A T Y N A
 1821 AXXGCAACTG GGAACACCGC GACGTGCATA ATGTCAACGG ACTGACCTTT ATCAACGCAA CATACAATGC
 L L E R K K G V V R R P F V L T R S F Y A G A
 1891 CTTACTGGAG CGGAAGAAG GCGTGGTTCG TCGGCCCTTC GTCTTGACCC GATCATCTTA CCGCGGGCT
 Q R V S A M W T G D N Q A T W E H L A A S L P
 1961 CAACGGGTAT CTGCTATGTG GACGGGAGAC AATCAAGCCA CCTGGGAACA TCTGGCCGCA TCCTTGCCTA
 M V L N N G I A G F P F A G A D V G G F F Q N P

Fig. 2B

2031 TGGTATTGAA TAACGGCATT GCOGGTTCC CGFTTGCCTG TCGCGAAGTT GCGGGGTTT TCCAGAAACCC
 S K E L L T R N Y Q A G I W Y P F F R A H A H
 2101 AAGCAAGGAA CTTTIGACCC GGTGGTATCA GCGCGGCATT TGGTATCCCT TCTTCCGTGC CCATGCCGCAC
 I D T R R R E P Y L I A E P F R S I I S Q A I
 2171 ATYGACACTC GCAGACGAGA GGCCTACTTG ATCGCTGAGC CATTGAGGTC GATCATATCC CAGGCTATCC
 R L R Y Q L L P A W Y T A F H E A S V N G M P I
 2241 GTCTGASATA TCAACTGCTG CCTGCATGGT ACACGTGCTT TCAATGAACT TCGGTGAATG GAATGCCTAT
 V R P Q Y Y V H P A D E Q G F A I D D Q L Y L
 2311 TGTTCGGCCC CAGTATATG TCCACCCGGC GGACGAACAA GGCTTIGCCA TTGATGACCA ACTCTACCTT
 G S T G L L A K P V V V E G A T T T D I Y I A
 2381 GGAICTACTG GCCYGTGGC CAPACCTGIG GTTGTGGAGG GTGCCACCAC TACAGATATC TACATCGCTG
 D D E K Y Y D Y Y D F T V Y Q G A G R R H T V P
 2451 ACGATGAGAA GFACTACGAT TACTATGATT TTACTGICTA CCAAGGAGCG GGCAGGAGAC ATACGGTGGC
 S P Y E K V P L L M Q G G H I I P R K D R A R
 2521 TTCCCCCATT GAGAGGTCC CATTGTTGAT GCAAGGAGGT CATAATTATCC CTCCGCAAGGA CCGGGCACGT
 R S S G L M R W D P Y T L V I V L D K N G K A
 2591 CGTAGCAGCG GCCTGATGAG ATGGATCCT TATACACTTG TGAATGCTCT CGACAAGAAC GGEAAGGCCG
 E G T L Y V D D G E S F N Y Q Q G A Y I H R R F
 2661 AAGGCACACT CTAATGTTGAT GATGGGAGT CGTTCACCTA CCAGCAGGGT GCATACATAC ACCGTGCTT
 K F E K S T L L S E D I G T K G S K T A E Y L
 2731 CAATTTGAA AATCTACCC TTTTGTCCGA AGACATCGGC ACCAAGGGTT CGAAGACAGC CGAATACCTG
 K S M T N V R V Q K V V V V D A P K E W Q G R
 2801 AAGAGCATGA CGAATGTCCG GGTTCAAAG GTGGTTGTTG TCGACGCTCC CAAGGAGTGG CAGGGAAGGA
 T S V T V I E D G A K M A S T A P L E Y H A Q Q
 2871 CGTCTGTGAC CCTCATCGAA GACGGTGCAA AGATGGCTTC TACCGCACCC TTGGAGTATC ACGCCCGCA
 A G K A A Y A V V K K P D V G I G R T W K I E
 2941 GGCAGGCAAG CCTGCGTATG CTGTCGTGAA GAAACCCGAT GTTGGCATTG GAAAGACATG GARGATTGAA
 F *
 3011 TTCTAA

Fig. 2C

M A S V L G L V A S A W L L P T A Y G A
 1 ATGGCCAGCGTCTGGGCTCGFCGCCAGTGCCTGGCTCCTCCACGGCCATATGGCGCA
 S H S L A P S T S A T S A Q A Q Y T L P.
 61 AGCCATTCGCTTGGCCCTAGCACGTCCGCAACCTCAGCACAGGGCCAAATACACTTACCA
 S S I D V G A H L I A N I D D P L A V D
 121 TCTTCTATTGACGTTGGCGCTCACTTGATCGCCAAACATCGACCGATCCCTTGGCCGTCGAC
 A Q S V C P G Y T A S D V H Q F S H G F
 181 GCGCAGTCTGTGTCCGGCTACACAGCCTCAGATGTGCACCAGACATCCCATGTTTC
 T A N L Q L A G D P C N V Y G T D V D S
 241 ACCGCTAACCTACAGCTCGGGGTGACCCATGCAACGTGTACGGGACAGACGTTGATTCG
 L S L T V D Y L A K D R L N I Q V V P T
 301 CTGTCCTGACAGTGGATTAATTTGGCCAAAGGACCGCCTGAATATCCAAAGTTGTTCCCTACC
 H V D A S N A S W Y L L S E D L V P R A
 361 CACGTGGATGCCCTCCAACGCTCTTGGTACCTCCTCCGGAAGATTTGGTCCCCCGGGCT
 H G P G V S A S Q S D F E V K W S N E P
 421 CATGGCCCTGGGTGTCCGCTCTCAAAGCGACTTTGAAGTGAAGTGGTCCAAACGAGCCT
 S F N L K V I R K A T G D V L F D T E G
 481 TCTTTC AACCTCAAGGTCATTCGCAAGGCTACTGGAGACGTCCTCTTGGATACCGAGGGC
 S V L V F E N Q F I E F V S S L P E G Y
 541 TCIGTCTTGGTCTTTGAGAACCAAGTTPAACGAGTTTGTCTCTTTCGTTGCCCTGAGGGTTAC
 N L Y G L G E R M A Q L R L L R N A T L
 601 AACCTGTACGGGCTGGGAGAGCGCATGGCCCGCTGCGGGCTCTTGGAGAAACGGACCCCTG
 T T Y A A D V G D P I D R
 661 ACCACCTATGCAGCGGATGTGGGAGACCCCGATGATAGGTATGTTGCTGGCCCATGTTGA
 N I Y G Q
 721 AAATCAATGTACGARGTCGACAAGCTTACAATCGGCTCTCCACAGCAACATCTATGGACA
 H P F Y L D T R Y Y T K G A N G S Y S L

Fig. 3A

781 GCATCCGTTCTACCTCGACACTCGATACTACACCAAAAGCGCGAATGGGTCCTACTCGCT
V N A D E A D L S E D H E S F S H G V F
841 TGTCAACGCCGACGAGCGGACTTGTCCGAGGATCATGAATCATTCTCCACGGTGTCTT
L R N A H G Q E V L L Q P R N I T W R T
901 TCTGAGAAACGCTCATGCTCAGGAAGTTCCTGTCAGCCCGCAACATFACCTGGCGCAC
I G G S I D L T F Y S G P T Q A D V T K
961 AATTGGTGGTAGCATCGATCTGACTTCTACTCCGGTCCCACGCAAGCGGACGTCACAAA
S Y Q L S T I G L P A M Q Q Y S A L G Y
1021 GAGTACCAGCTCTCCACTATGGACTTCCYGAATGCAGCAGTACAGCGCCCTTGGATA
H Q C R W G Y Q N W S Q L E E V V N N F
1081 CCACCAATGCCGCTGGGGCTACCAGAAATGGTCTCAGCTCGAGGAGTAGTCAACAACCTT
E R F E I P L E Y I M
1141 TGAGCGAATTTGAGATTCCTCTGGAATACATCTGCTCAGTCGGGTTTCTGAGTTTCTACAT
S D I D Y M L G
1201 APTGTCCTAGTTTCTTTTATTACCTTCTTCCAGGAGCGACATCGATTACATGCTTGGC
Y R D F E N D P E R F S Y D E G E E F L
1261 TACCGGACTTTGAGAAATGATCCCGAACGGTCTCTCFACGATGAAGCGGAGGAATTTCTG
N K L H K S G R H W V P I V D S A I Y I
1321 AACAACTGCACAAGTCCGGGACGACACTGGGTTCTCTATCTGTTGACTCAGCAATCTAJATT
P N P D N A L D A
1381 CCCAACCCGACAAATGCATTGGATGCGTAAGTCTTATTAATCTTATCTTCTCTTGTGAGAT
Y E P Y A R G
1441 GGTCAAAGTTCAAGTTCTCACGAAAGTGTGAACCTCCAGGTACGAGCCTTAAGCTCGCGGGG
A K D D V F I K N P D G T L Y I G A V W

Fig. 3B

1501 CAAAGGATGACGTTTTTATCAAGAACCCTGATGGCACCCCTCTACATCGGTGCAGTGTGGC
P G F T V F P D W H N P K A F D Y W A N
1561 CGGGCTTTACTGTCTTCCCGATGGCCACAACCCCAAGCCATTTGACTACTGGGCCAAAG
E L V I W S K K V A F D G I W I D M S E
1621 AACTCGTCATCTGGTCAAAGAAGTTGCGTTGATGGCATCTGGATGGATGATGAGCGAAG
V S S F C V G S C G T G K L H L N P V H
1681 TATCCTCTTTCGTGGGAGCTGTGGAACAGAAAGCTACATCTGAATCCGGTTCACC
P P F Q L P G E P G N V G Y D Y P E A F
1741 CACCATTCCAGCTTCCCGTGAACCTGGCAATGTGGCTACGACTACCCCGAGGCCTCA
N V T N S T E A A S A S A A S A S Q A S
1801 ACGTGAGAACTCTACCGAAGGGCCTTGGCTCCGCCCTCIGCCAGTCAAGGCTTCGG
A A S A T Q A A T T S T S T S Y L R T T
1861 CTGCTTCTGCTACCCCAAGCCGCCAGCAGTCAACATCTACATCGTATCTGCGGACGACGC
P T P G V R D V N Y P P Y V I N H V Q E
1921 CCACGCCGGGCTCCCGACGTCAACTACCCCTCCATATGTGATTAATCATGTTFCAGGAGG
G H D L A V H A I S P N S T H V D G V Q
1981 GCCATGACCTTGGCGTGCACGCCATTCTCCCAACTCCACCATGTGGACGGCGTCCAGG
E Y D V H S L W G H Q I L N A T Y Y G L
2041 AATACGATGTTACAGTCTGTGGGCCACCAGATCTCAATGCTACCTACTACGGACTGC
R Q V F T E K R P F I I G R S T F A G S
2101 . GCCAGGCTTCACTGAGAAGGACCTTTCATCATTTGGCCGGTCTACCTTTGCTGGCTCGG
G K W A G H W G G D N N S K W G S M F L
2161 GCAAGTGGCCGTTCACTGGGGCGGTGATAACAACCTCCAAATGGGGTCCAATGTTCTGT
S I S Q G L S F S L F G I P M F G V D T
2221 CCACTCGCAGGTCGTCTGCTCGTATTGGTATTCCCAATTTCCGGCGTGGATAACAT
C G F N G N T D E E L C S R W M Q L S A

Fig. 3C

2281 GCGGTTTCAACGGCCAACACTGACGAGGAGCTTTGCAGCCCGTGGATGCAGCTGTCCGGCCT
 F P F Y R N H N V L A A I P Q E P Y R
 2341 TCTTCCCTTCTACCGCAACCACAATGTCCITGGGGCTATCCCCCAGGAACCTACCGCT
 W A S V A Q A S K A A M K I R Y S L L P
 2401 GGGCCTCTGTGGCCCAAGCCTCCAAGCCCGCTATGAAATCCGGTATTCCTTCCCTACCTT
 Y F Y T L F H Q A H T T G S T V M R A L
 2461 ACTTCTACACTCTTTCCACCAGGCCACACCACCGGCTCTACCGTCAATGGCGGCTCTCG
 A W E F P T D P S L A A V D T Q F M V G
 2521 CCTGGGAGTTCCCCACGGACCCGTCCTCGCCGCGTCCGACACTCAGTTCATGGTCCGGCC
 P S I M V V P V L E P L A D T V K G V F
 2581 CTTCCATCATGGTCCCGTCCCGTGTGAGCCCTCCGCGATACCGTCAAGGGCGTGTCC
 P G V G K G E V W Y D W Y T Q T A V D A
 2641 CAGGCGTCCGCAAGGCGAAGTCTGGTACGACTGGTACACCCAGACCCGCGTGGACGCCA
 K P G V N A T I P A P L G H I P V Y V R
 2701 AACCCGGCTCAACGCCACCATTCCTCCGACCCGCTGGGCCACATTCCTCCGTCATGTCCGTG
 G G S I L P M Q E P A L T T R D A R N T
 2761 GAGGCAGCATCCTGCCCATGACGAGGCCCGCTCACGACCAGAGACGCCCGTAACACTC
 P W S L L V A L S G N Q T A L G S L Y L
 2821 CCTGGTCTCTACTCGTCCGCTCTGAGTGGCAACCAGACTGCCCTTGGGCTCGCTGTATCTTG
 D D G S S L N P S R T L D V D F Q A T A
 2881 ACGACGGAAGCAGCCTCAACCCGTCCTCCGACTCTCGATGTCGACTTCCAGGCTACAGCCT
 S S I K V S V K G T W E E K N R L D K V
 2941 CGAGCATCAAGGTCTCGGTCAAGGTACTCTGGGAGGAGAAAGAACCCGCTGGATAAGGTGA
 T V L G V T E K P S A V T F N G R N V H

Fig. 3D

3001 CTGTCCTCGGCGTGACTGAGAAGCCTTCTGCTGTGACGGTTCAACGGCGCGCAACGTCACCC
P G S V H Y N T T T K V L S V Q G L H S
3061 CTGGCTCAGTGCCTACAATACTACCACCAAGGTGCTGTCTGTGCAGGGGATGCACAGCA
M T P H G A W A G H W I L K W *
3121 TGACTCCCCAATGGCGCCTGGGCTGGACACTGGATCTGAAAATGGTAG

Fig. 3E

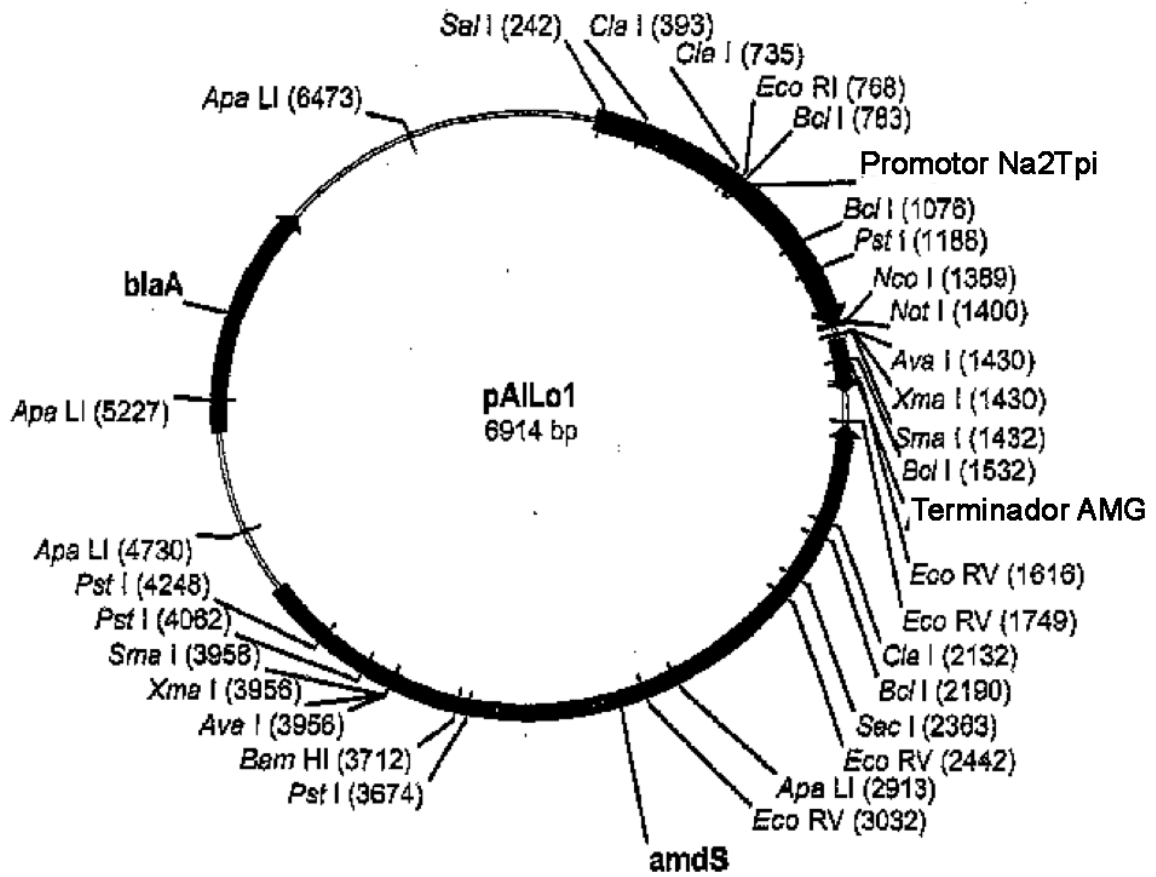


Fig. 4

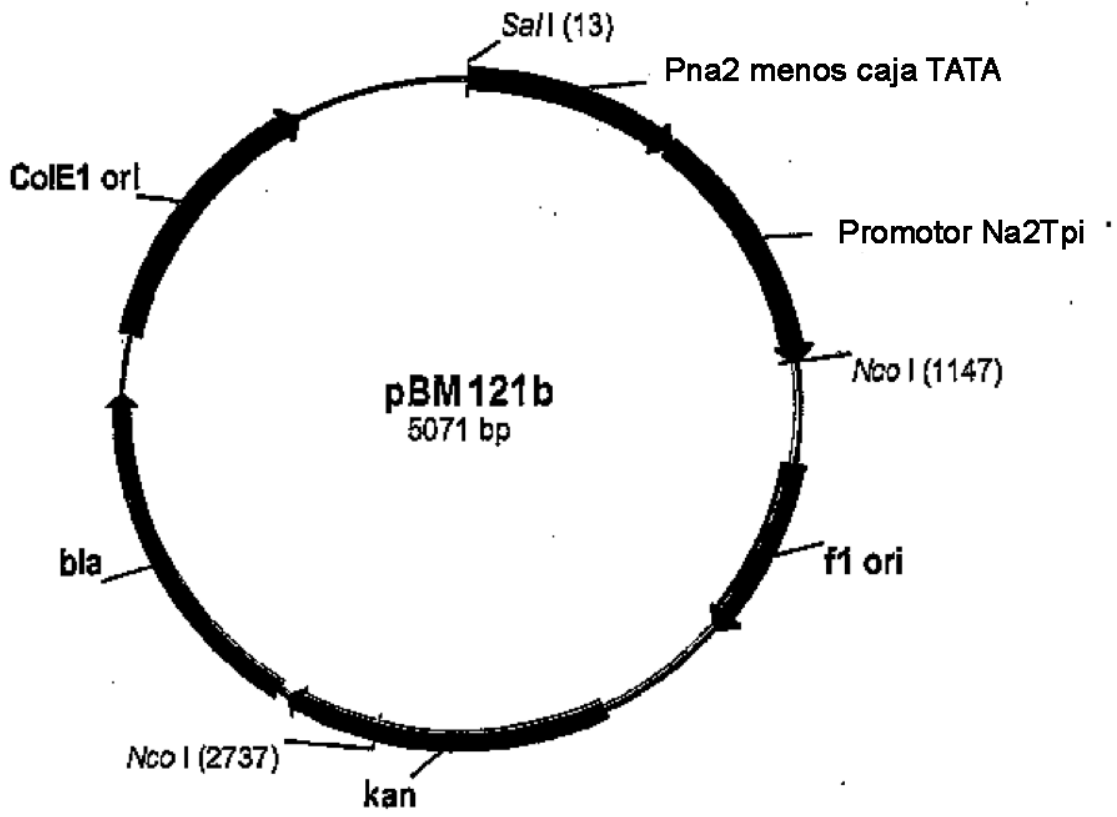


Fig. 5

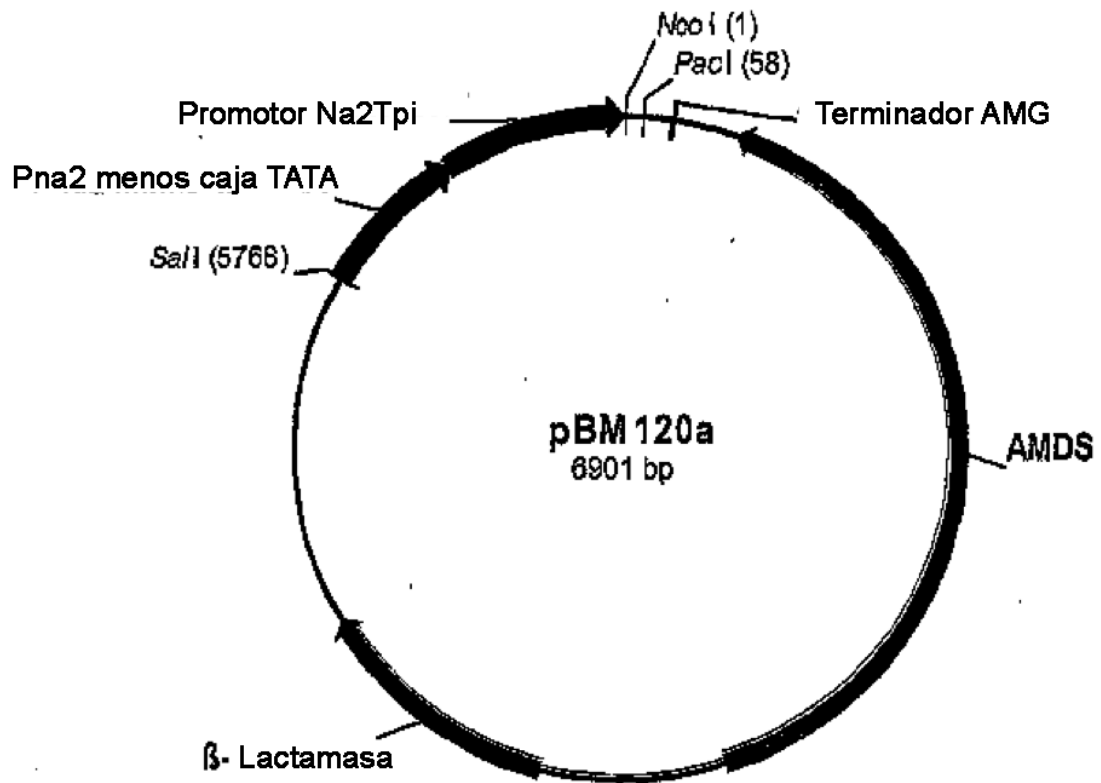


Fig. 6

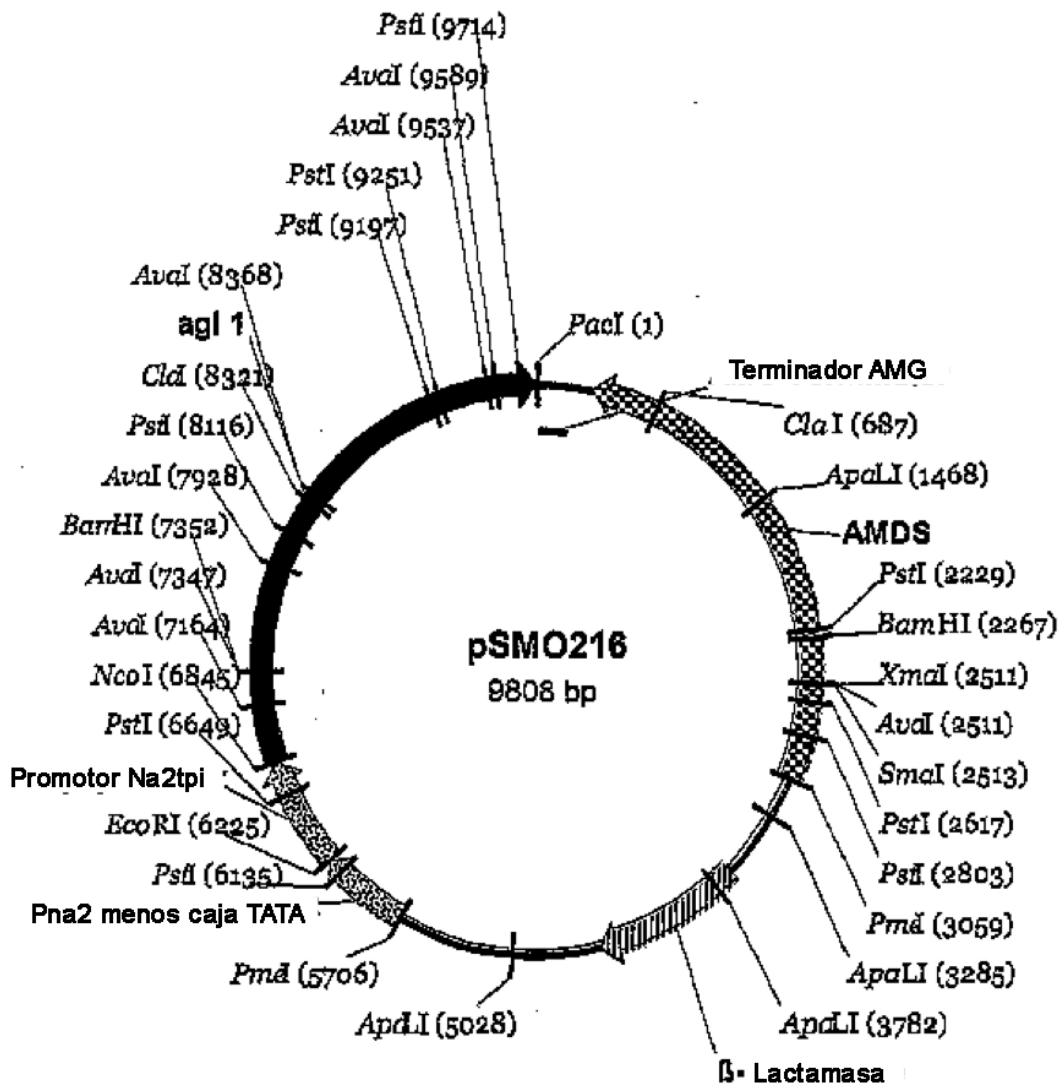


Fig. 7

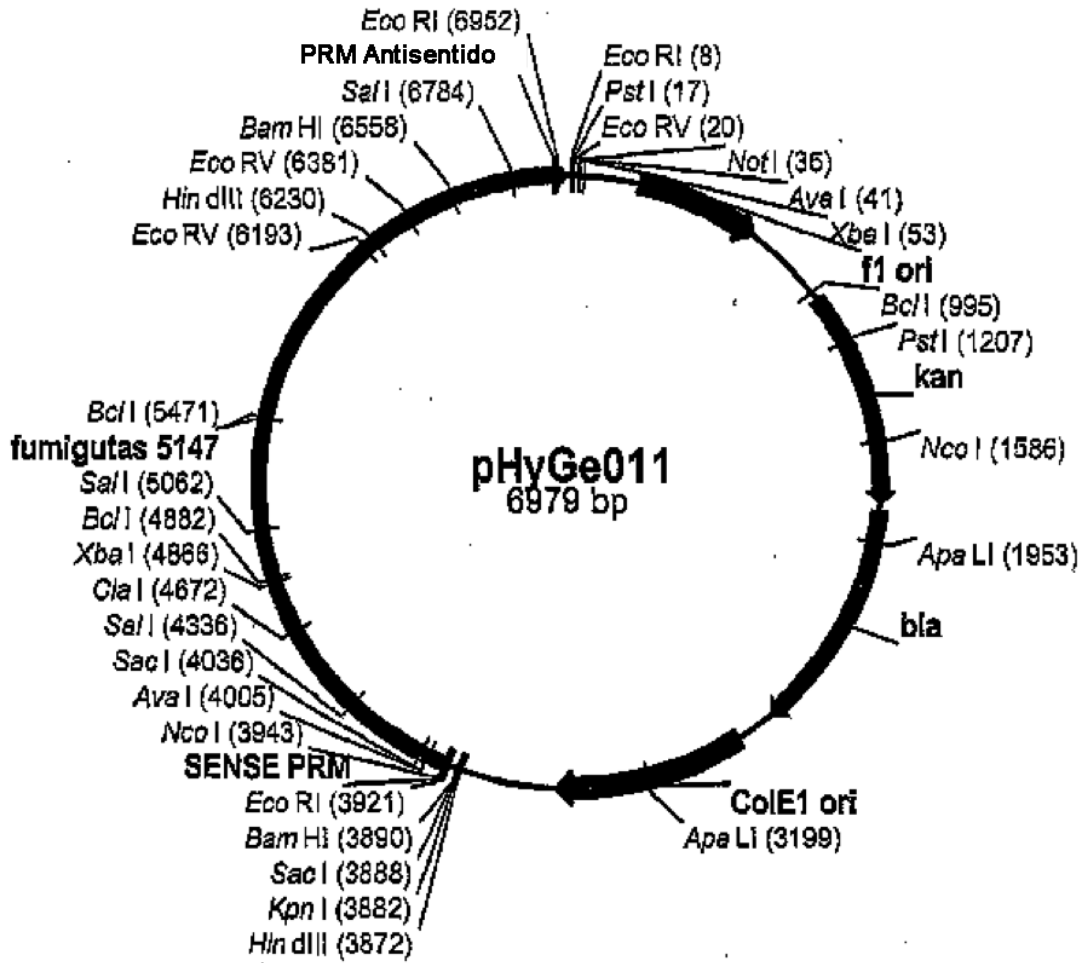


Fig. 8

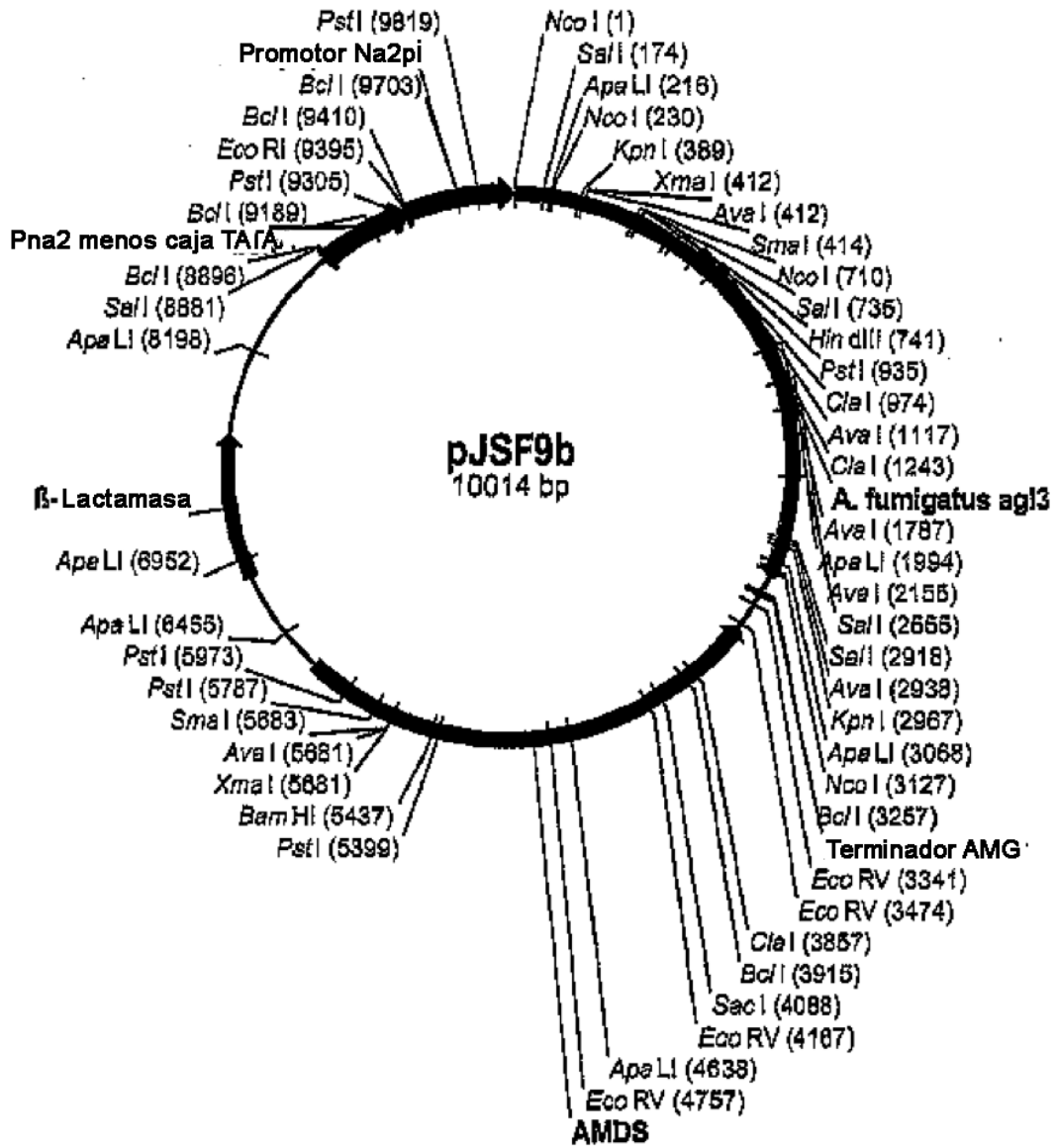


Fig. 9

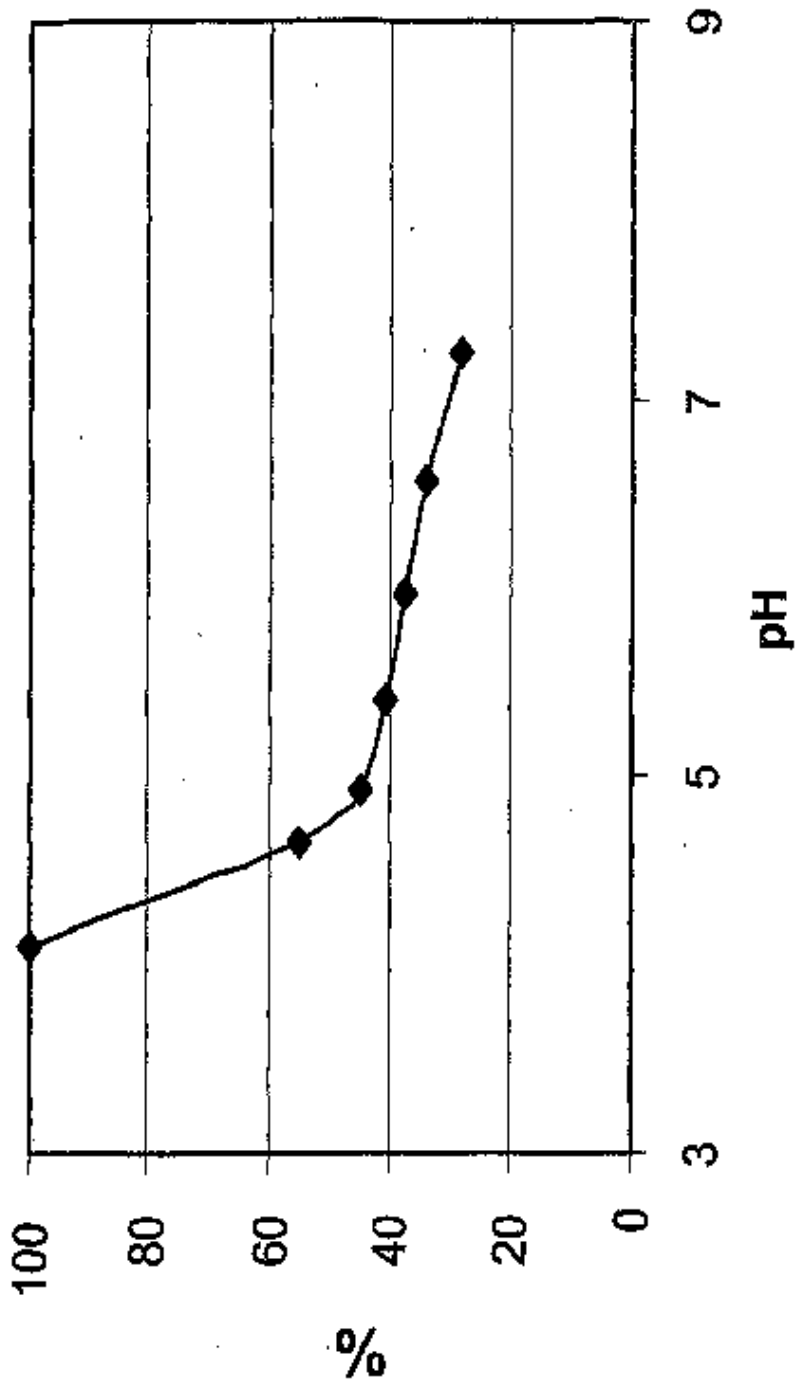


Fig. 10

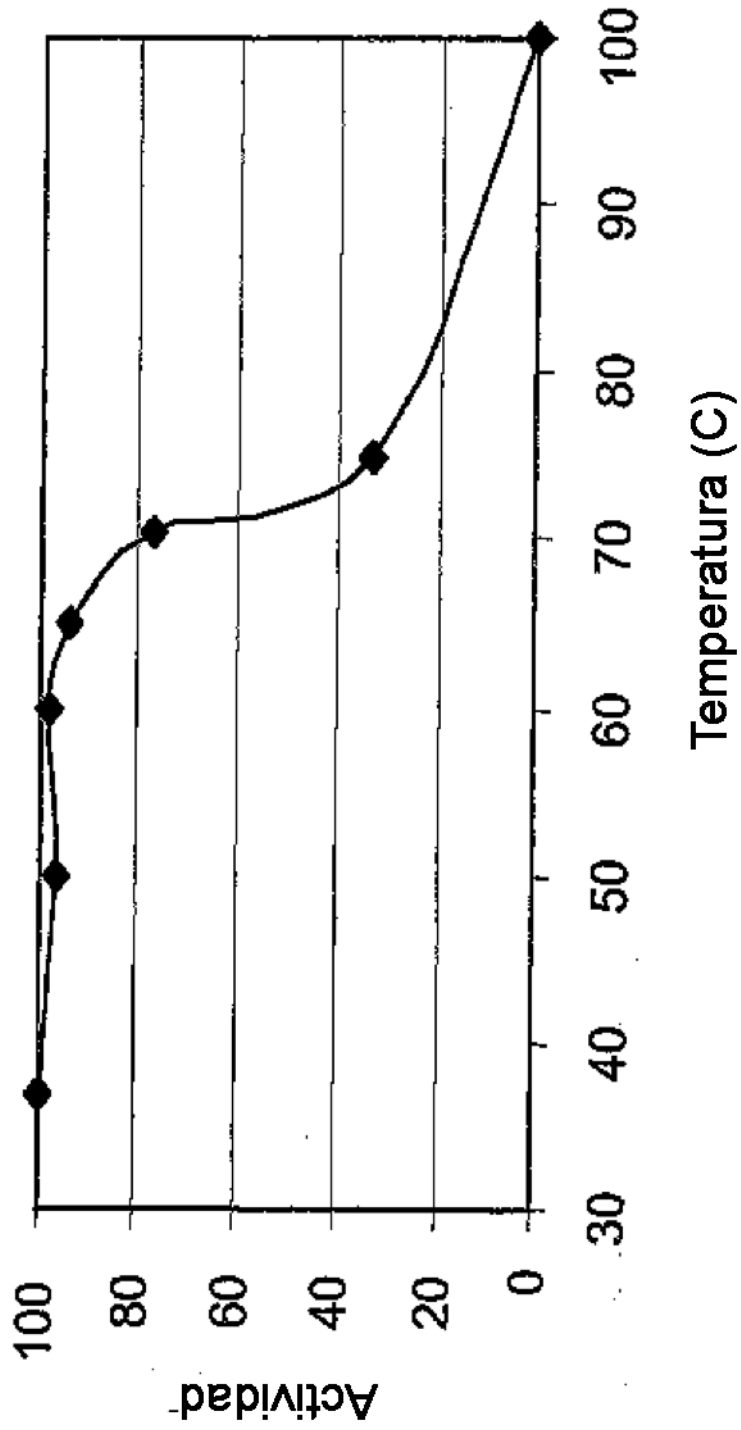


Fig. 11

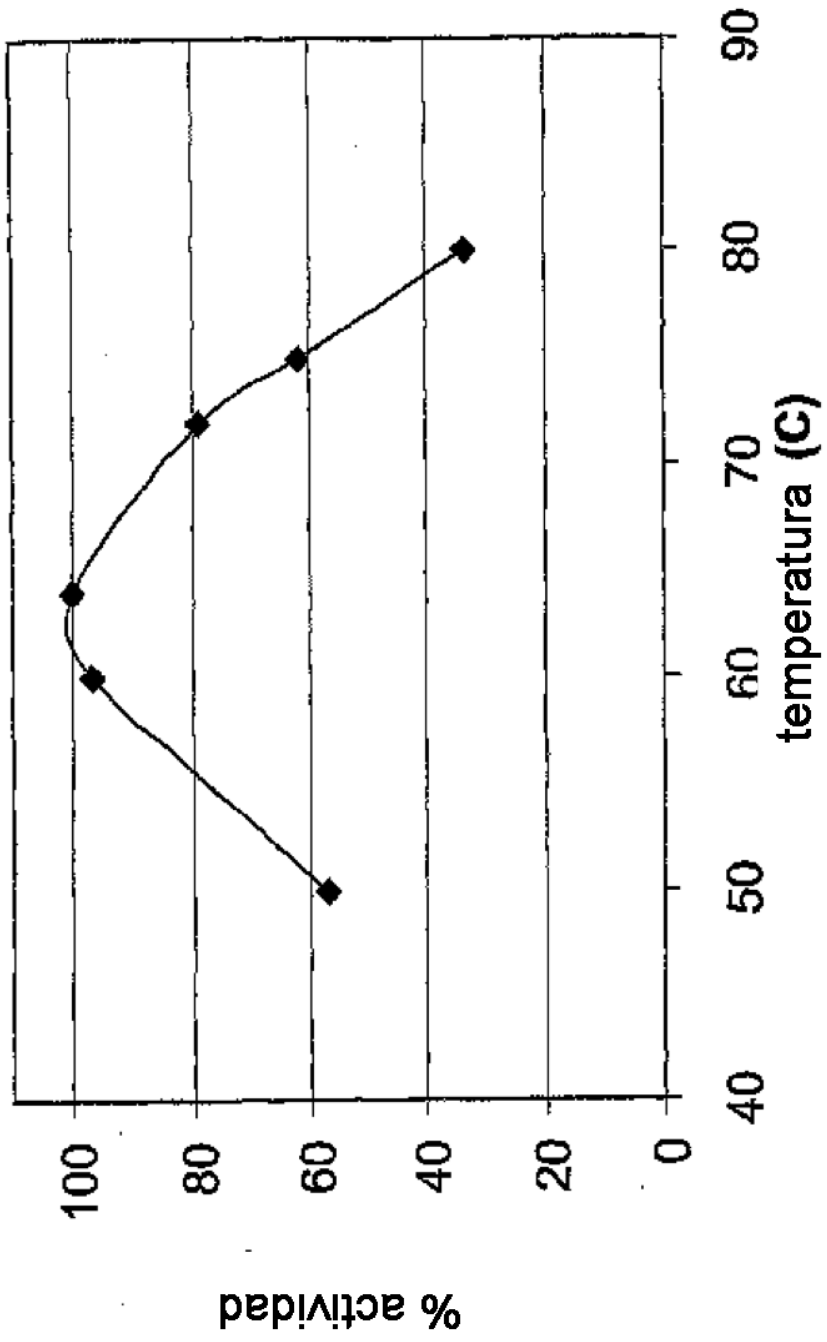


Fig. 12

A. fumigatus α -glucosidasa (agl1) parámetros cinéticos

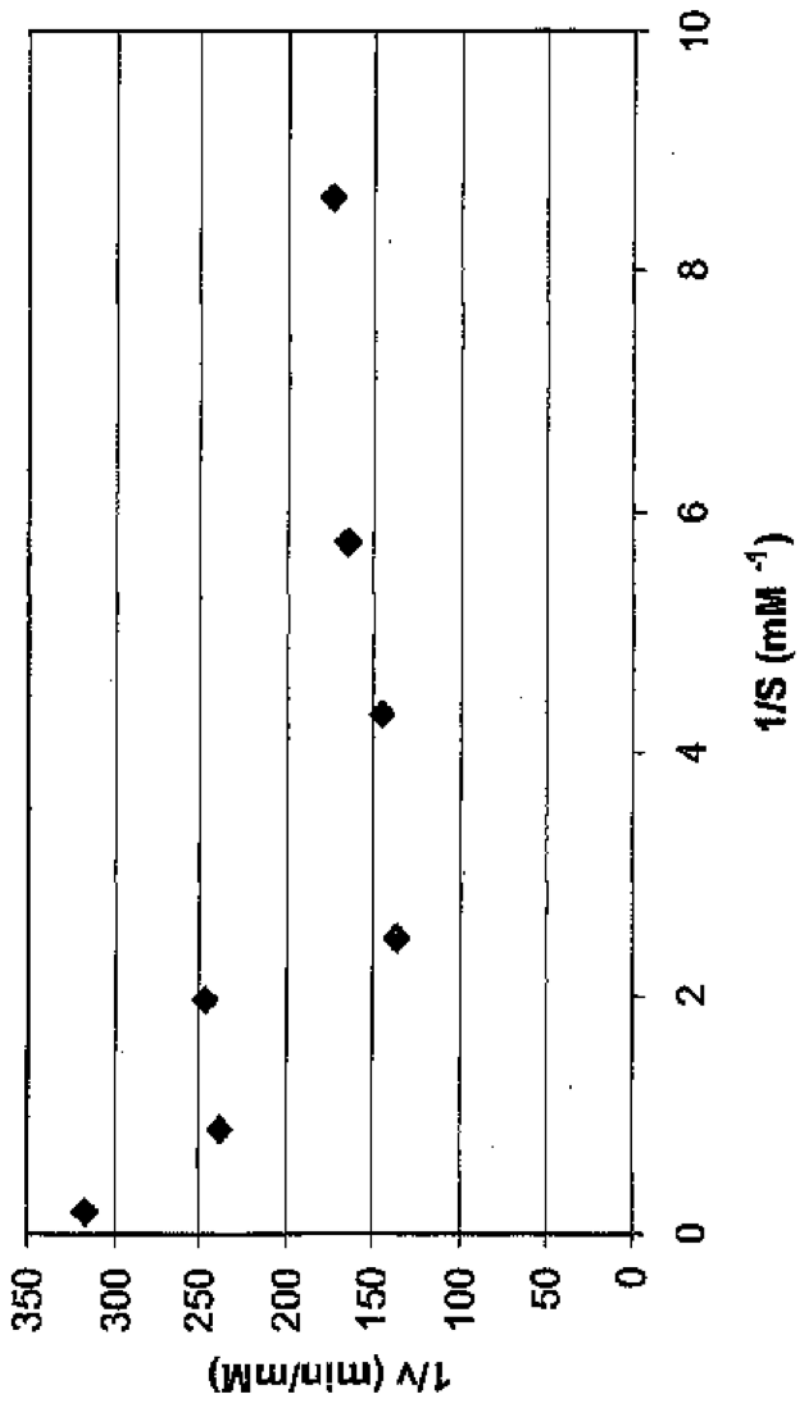


Fig. 13

A. fumigatus α -glucosidasa (agl3) Parámetros cinéticos

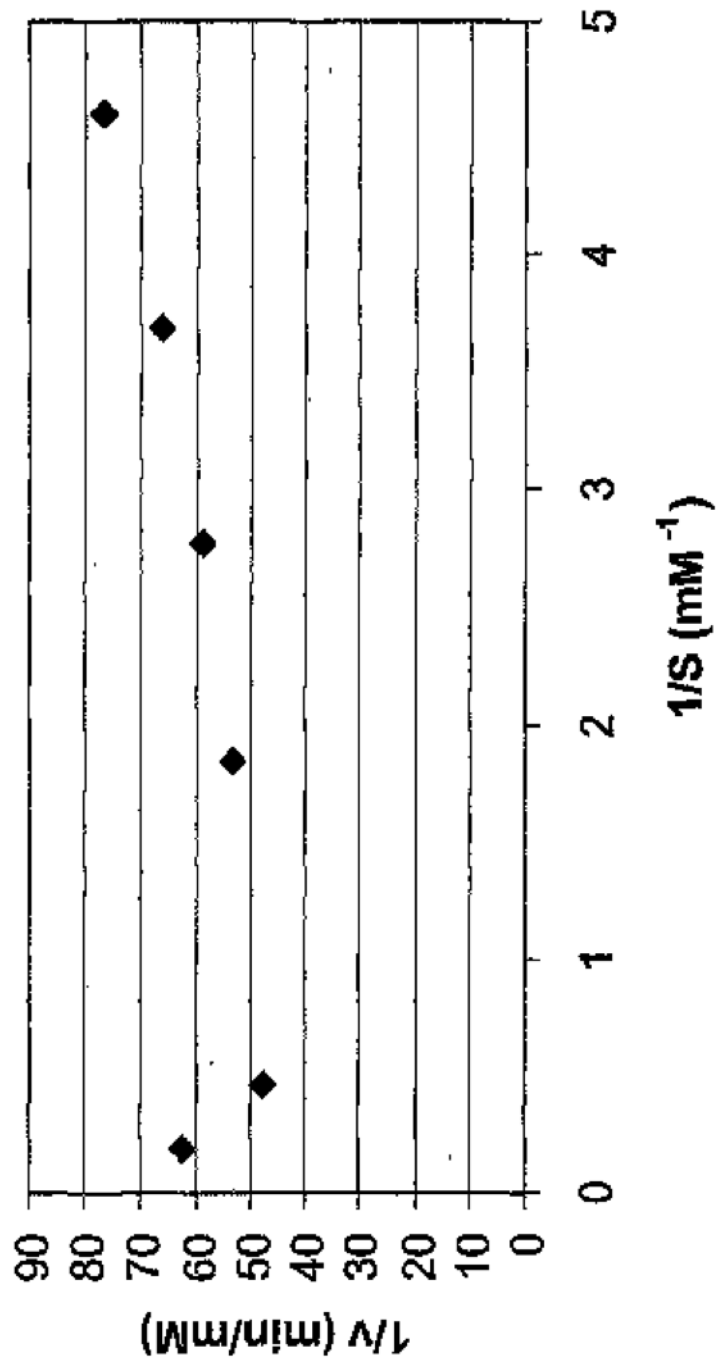


Fig. 14

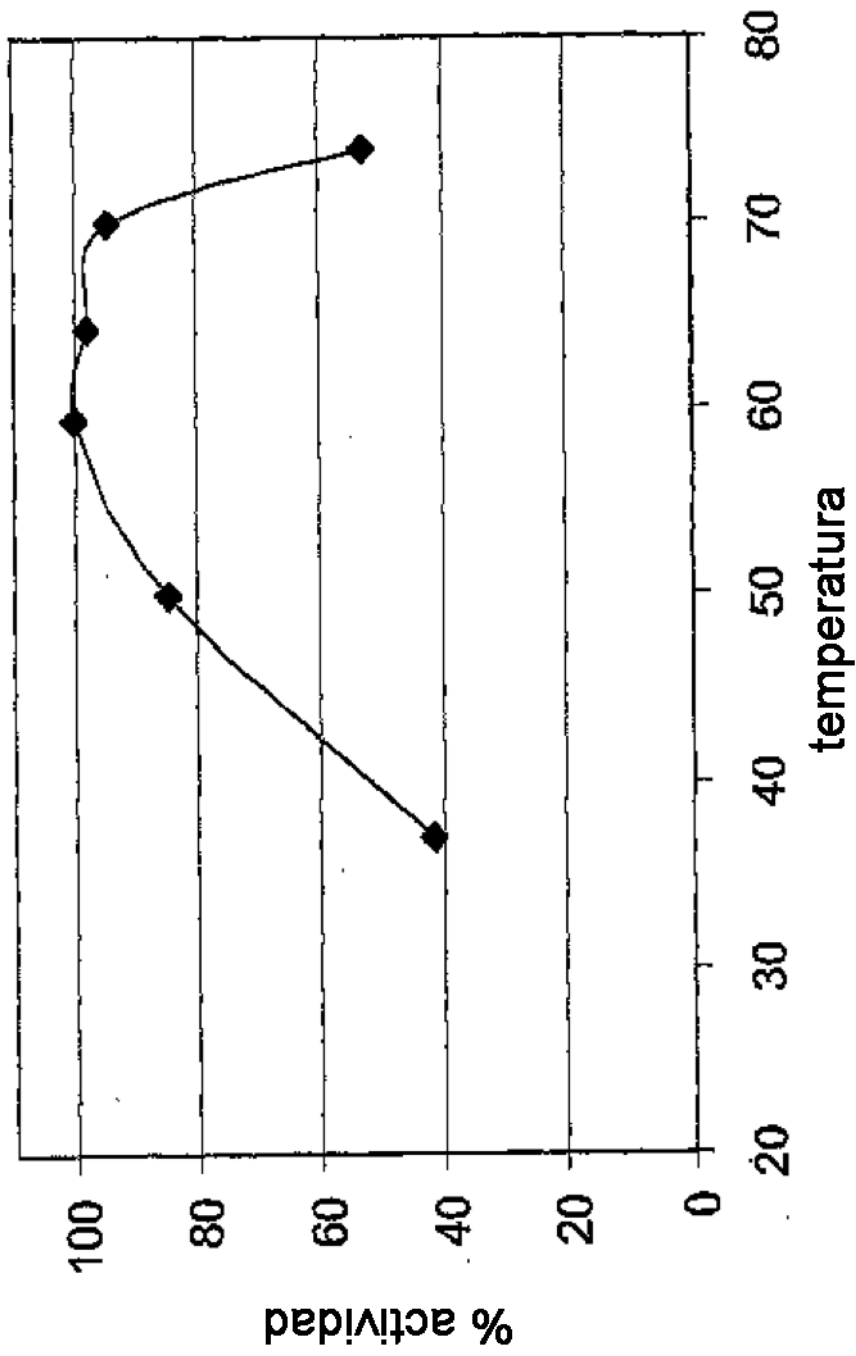


Fig. 15