

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 547 118**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/09** (2006.01)

**C12N 1/15** (2006.01)

**C12N 9/08** (2006.01)

**C12R 1/645** (2006.01)

**C12R 1/80** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.02.2009 E 09711878 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.07.2015 EP 2256192**

54 Título: **Catalasa termoestable**

30 Prioridad:

**18.02.2008 JP 2008036171**

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

**01.10.2015**

73 Titular/es:

**MEIJI SEIKA PHARMA CO., LTD. (100.0%)  
4-16, Kyobashi 2-chome, chuo-ku  
Tokyo 104-8002, JP**

72 Inventor/es:

**OKAKURA, KAORU;  
MAZUKA, FUSUKE;  
FUKUSHIMA, TAKAYOSHI y  
MURASHIMA, KOICHIRO**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 547 118 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

Catalasa termoestable

**Campo técnico**

5 La presente invención se refiere a catalasas termoestables, más en particular, a catalasas termoestables derivadas de *Penicillium pinophilum*, a proteínas que tienen una actividad catalasa termoestable, a los ADN que codifican las proteínas y a un procedimiento para producir las catalasas termoestables.

**Técnica anterior**

10 La catalasa es una enzima que cataliza una reacción en la que el peróxido de hidrógeno se descompone en agua y oxígeno. La solución acuosa de peróxido de hidrógeno se usa ampliamente como antiséptico o desinfectante. Después de completar la desinfección, la solución de peróxido de hidrógeno se puede retirar fácilmente con agua y se descompone espontáneamente a medida que avanza el tiempo y, por lo tanto, se usa ampliamente como desinfectante para alimentos. Sin embargo, se desea que el peróxido de hidrógeno se descomponga por completo y se retire después de su uso, porque las especies reactivas del oxígeno generadas a partir del peróxido de hidrógeno  
15 restante pueden provocar envejecimiento celular o cáncer. La catalasa es extremadamente útil para la descomposición del peróxido de hidrógeno, porque no se necesitan sustancias químicas adicionales para la descomposición. De hecho, la catalasa se usa para la descomposición y la retirada de la peroxidasa de hidrógeno restante después del blanqueamiento del algodón o en los alimentos. Se conocen catalasas derivadas de microorganismos (referencias de patente 1 a 5) y catalasas derivadas de animales, tales como la catalasa hepática porcina o bovina.

20 Entre estas catalasas conocidas, la catalasa producida por un hongo filamentoso *Aspergillus niger* o la catalasa hepática porcina se usan ampliamente para usos industriales. Sin embargo, se sabe que estas catalasas presentan una termoestabilidad baja y que la actividad restante de las mismas después del tratamiento a 70 °C durante 30 minutos era de aproximadamente el 10 % (referencia de patente 6). En particular, para el uso del procesamiento textil, el procesamiento de alimentos o similares, se desea que la catalasa tenga una termoestabilidad superior a la  
25 de esas catalasas convencionales, porque el peróxido de hidrógeno se tiene que descomponer a una temperatura superior. Como catalasas termoestables, se ha informado de las catalasas producidas por *Aspergillus terreus* (referencia de patente 6), *Acremonium alabamensis* (referencia de patente 6), *Thermoascus aurantiacus* (referencia de patente 6), *Scytalidium thermophilum* (referencia de patente 7), *Humicola insolens* (referencia de patente 7) y el género *Thermomyces* (referencia de patente 8).

30 Se sabe que los hongos filamentosos tienen una actividad secretora de proteínas extremadamente alta y que son adecuados como huéspedes para producir una proteína recombinante tal como las enzimas. Por lo tanto, si se puede introducir un gen de catalasa termoestable en un hongo filamentoso y se puede expresar altamente la catalasa termoestable como proteína recombinante, se espera poder producir la catalasa termoestable con una productividad extremadamente alta en comparación con una de tipo natural. Con respecto a la producción de  
35 proteínas recombinantes, se ha informado de que las proteínas recombinantes se podrían producir en hongos filamentosos clasificados en los géneros *Aspergillus* (referencia de patente 9), *Penicillium* (referencia de patente 10), *Humicola* (referencia de patente 11), *Trichoderma* (referencia de patente 12) o *Acremonium* (referencia de patente 13).

40 Cuando se expresa una proteína recombinante en estos hongos filamentosos como huésped, no todos los genes exógenos introducidos en el huésped se expresan necesariamente. En general, se considera preferente que el origen de un gen exógeno que se va a introducir tenga una relación lo más estrecha posible con el del huésped, con vista al uso de codones. Por ejemplo, en el caso en que se utilizó *Humicola insolens* como huésped para expresar endoglucanasa como proteína recombinante, se expresó una cantidad significativa de endoglucanasa al introducir un gen NCE4 o NCE5 derivado de *Humicola insolens* en *Humicola insolens* (referencias de patente 14 y 15). En  
45 contraste, se expresó una cantidad pequeña de endoglucanasa al introducir un gen RCE I, derivado de *Rhizopus oryzae* y que tenía una secuencia de aminoácidos que mostraba una identidad alta con las de NCE4 y NCE5, en *Humicola insolens* (referencia de patente 16). Además, en el caso en que se usó *Aspergillus awamori* como huésped para expresar glucoamilasa como proteína recombinante, la introducción de un gen de glucoamilasa derivado de *Aspergillus niger* dio lugar a una productividad alta (4,6 g/l), pero la introducción de un gen de glucoamilasa derivado  
50 de *Humicola grisea* dio lugar a una productividad baja (0,66 g/l) (referencia que no es una patente 1). Por otra parte, en el caso en el que se expresó  $\alpha$ -amilasa como proteína recombinante, la introducción de un gen de  $\alpha$ -amilasa derivado de *Aspergillus oryzae* en *Aspergillus oryzae* como huésped dio lugar a una productividad alta (12 g/l), pero la introducción del gen de  $\alpha$ -amilasa derivado de *Aspergillus oryzae* en *Trichoderma viride* dio lugar a una productividad de tan solo 1 g/l (referencia que no es una patente 1). Estos resultados demuestran que, cuando se va  
55 a expresar una cantidad significativa de proteína recombinante, es preferente introducir un gen derivado de un hongo filamentoso que es de la misma especie que el huésped o de una relacionada.

Cuando se usa un hongo filamentoso como huésped para expresar una gran cantidad de catalasa termoestable como proteína recombinante, se considera preferente que el origen de un gen de catalasa que se va a introducir esté

estrechamente relacionado con el del hongo filamentoso usado como huésped, como se describe anteriormente. Sin embargo, con respecto al aislamiento de genes de catalasa termoestable, solo se ha informado de un gen de catalasa derivado de *Thermoascus aurantiacus* (referencia de patente 17) y un gen de catalasa derivado de *Scytalidium thermophilum* (referencia de patente 18). No se han aislado genes de catalasa termoestable de hongos filamentosos desarrollados como huéspedes para la producción de proteínas, tales como los de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Humicola*, *Trichoderma* o *Acremonium*, y, por lo tanto, era muy difícil expresar la catalasa termoestable como proteína recombinante con productividad alta.

- [referencia de patente 1] Publicación de patente japonesa pendiente de examen (kokai) N.º 55-135588  
 [referencia de patente 2] Publicación de patente japonesa pendiente de examen (kokai) N.º 60-083579  
 [referencia de patente 3] Publicación de patente japonesa pendiente de examen (kokai) N.º 63-003788  
 [referencia de patente 4] Publicación de patente japonesa examinada (kokoku) N.º 49-004956  
 [referencia de patente 5] Publicación de patente japonesa pendiente de examen (kokai) N.º 2-076579  
 [referencia de patente 6] Publicación de patente japonesa pendiente de examen (kokai) N.º 5-153975  
 [referencia de patente 7] Publicación de traducción japonesa (Kohyo) N.º 6-506347  
 [referencia de patente 8] Publicación de patente japonesa pendiente de examen (kokai) N.º 10-257883  
 [referencia de patente 9] Publicación internacional WO 97/034004  
 [referencia de patente 10] Publicación internacional WO 2000/068401  
 [referencia de patente 11] Publicación internacional WO 98/003667  
 [referencia de patente 12] Publicación internacional WO 98/011239  
 [referencia de patente 13] Publicación de patente japonesa pendiente de examen (kokai) N.º 2001/017180  
 [referencia de patente 14] Publicación internacional WO 98/003640  
 [referencia de patente 15] Publicación internacional WO 2001/090375  
 [referencia de patente 16] Publicación internacional WO 2000/024879  
 [referencia de patente 17] Publicación de patente japonesa pendiente de examen (kokai) N.º 2004-261137  
 [referencia de patente 18] Patente de Estados Unidos N.º 5646025 [referencia que no es una patente 1] Norihiro TSUKAGOSHI, Kumikae Tanpakushitsu Seisan-hou (Production of recombinant proteins), Japan Scientific Societies Press, págs. 94-95

### **Divulgación de la invención**

#### **Problemas que debe solucionar la invención**

- En determinadas circunstancias se desea la expresión de una gran cantidad de catalasa termoestable como proteína recombinante. Un objetivo que deben resolver los presentes inventores es la búsqueda de hongos filamentosos pertenecientes a los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma* y *Acremonium*, que se desarrollaron como huéspedes para producir proteínas recombinantes, para catalasas termoestables; aislar genes que codifican las catalasas termoestables; y expresar las catalasas termoestables en grandes cantidades.

#### **Medios para resolver los problemas**

- Para resolver el objetivo, los presentes inventores cultivaron una serie de hongos filamentosos pertenecientes a los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma* y *Acremonium*, que se habían desarrollado como huéspedes para producir proteínas recombinantes; evaluaron la termoestabilidad de la catalasa contenida en cada líquido de cultivo obtenido; e intentaron descubrir una catalasa termoestable a partir de los hongos filamentosos. Como consecuencia, los presentes inventores descubrieron que *Penicillium pinophilum* producía catalasas termoestables.

A continuación, los presentes inventores purificaron la catalasa termoestable del líquido de cultivo de *Penicillium pinophilum* y obtuvieron una catalasa termoestable en la que se observaba una sola banda en la posición de aproximadamente 80 kDa por SDS-PAGE y la secuencia de aminoácidos N-terminal era DDSNASSETAEFLSEFYLNNDNDAYLTTDVG (SEC ID N.º: 5).

- Además, los presentes inventores lograron con éxito clonar genes que codifican las catalasas termoestables anteriores a partir de ADN genómicos de *Penicillium pinophilum* y determinar las secuencias de nucleótidos de los genes y se completó la presente invención.

La presente invención se refiere a:

1) una proteína seleccionada del grupo que consiste en:

- (i) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos 1-692 de la SEC ID N.º: 2,  
 (ii) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos en la que se eliminaron, sustituyeron o añadieron de 1 a 50 aminoácidos de la secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos 1-692 de la SEC ID N.º: 2, y que tiene una actividad catalasa termoestable, y  
 (iii) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad del 80 % o más con la que consiste en los aminoácidos 1-692 de la SEC ID N.º: 2, y que tiene una actividad catalasa termoestable;

2) una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos 1-692 de la SEC ID N°: 2, y que tiene una actividad catalasa termoestable;

3) la proteína de 1) o 2), que tiene la secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos -1 a -42 de la SEC ID N°: 2, en el lado N-terminal de la proteína;

4) un ADN seleccionado del grupo que consiste en:

(i) un ADN que codifica la proteína de 1),

(ii) un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos 1-2403 de la SEC ID N°: 1, y

(iii) un ADN que hibrida en condiciones rigurosas con un ADN que consiste en la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos 1-2403 de la SEC ID N°: 1, y que codifica una proteína que tiene una actividad catalasa termoestable;

5) un ADN que consiste en la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos 1-2403 de la SEC ID N°: 1;

6) un ADN en el que se escinde una secuencia intrónica del ADN de 4) o 5);

7) el ADN de 6), en el que la secuencia intrónica es una o más secuencias seleccionadas de la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos 322-372, 599-651, 1068-1113 o 1279-1326 de SEC ID N°: 1;

8) un ADN en el que se escinde una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia señal del ADN de 4) a 7).

9) el ADN de 8), en el que la secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia señal es la que consiste en en los nucleótidos 1-126 de la SEC ID N°: 1;

10) un vector de expresión que comprende el ADN de 4) a 9);

11) un microorganismo huésped transformado con el vector de expresión de 10);

Preferentemente, el microorganismo huésped de 11) es un hongo filamentoso;

El hongo filamentoso es un hongo filamentoso perteneciente a los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma* o *Acremonium*.

En el presente documento se describe un procedimiento para producir una catalasa termoestable, caracterizado por el cultivo del microorganismo huésped y la recogida de la catalasa termoestable del cultivo obtenido.

### **Efectos de la invención**

Según la presente invención, se pueden obtener ADN necesarios para producir eficazmente catalasa termoestable como proteína recombinante y se pueden obtener microorganismos recombinantes que expresan eficazmente catalasa termoestable. Además, se puede producir eficazmente catalasa termoestable a bajo coste mediante el cultivo del microorganismo obtenido. El peróxido de hidrógeno se puede descomponer eficazmente a bajo coste, incluso a temperatura elevada, por el tratamiento de una solución que contiene peróxido de hidrógeno con la catalasa termoestable de la presente invención.

### **Breve descripción de los dibujos**

La figura 1 es un mapa de restricción del plásmido pPCN.

La figura 2 es un mapa de restricción del plásmido pHCN.

La figura 3 es un mapa de restricción del plásmido pPTPCN.

### **Mejor modo de llevar a cabo la invención**

Tal como se usa en el presente documento, el término "catalasa termoestable" significa una catalasa en la que el porcentaje de actividad que queda después de incubarla a 70 °C durante 30 minutos es del 50 % o más, determinado con la medida de la termoestabilidad según el procedimiento descrito en el ejemplo 4 de la referencia de patente 6.

Se puede obtener catalasa termoestable producida por *Penicillium pinophilum* en un líquido de cultivo, por ejemplo, por un procedimiento desvelado en la referencia de patente 6. Se puede evaluar la actividad catalasa por la adición de catalasa a una solución que contiene peróxido de hidrógeno y la cuantificación de la disminución del peróxido de hidrógeno durante un periodo de tiempo predeterminado, por ejemplo, según un procedimiento desvelado en la referencia de patente 6. Se puede valorar si una catalasa es termoestable o no, según un procedimiento desvelado en la referencia de patente 6, por tratamiento térmico de un sobrenadante de cultivo que se ha diluido previamente a una concentración apropiada a 70 °C durante 30 minutos y cuantificando las actividades catalasa antes y después del tratamiento térmico. Según la definición anterior tal como se usa en el presente documento, una catalasa que tiene una actividad restante del 50 % o más después del tratamiento térmico se considera una "catalasa termoestable".

Se obtuvieron sobrenadantes de cultivo de *Penicillium pinophilum* por el procedimiento anterior y se determinó la termoestabilidad de la catalasa contenida en cada sobrenadante. Como consecuencia, la actividades restante después del tratamiento térmico a 70 °C durante 30 minutos fueron del 50 % y del 57 % con respecto a las catalasas producidas por *Penicillium pinophilum* y las catalasas termoestables producidas por *Penicillium pinophilum*,

respectivamente.

Las catalasas termoestables se pueden purificar a partir de los sobrenadantes de cultivo que contienen catalasas termoestables obtenidos por el procedimiento anterior según uno o más procedimientos convencionales de purificación de proteínas. En cuanto a los procedimientos, se pueden aplicar diversos procedimientos conocidos comúnmente: por ejemplo, se puede usar una combinación de cromatografía hidrófoba y cromatografía de intercambio aniónico. El peso molecular de cada catalasa termoestable purificada se puede determinar por SDS-PAGE.

Según los procedimientos anteriores, se purificaron las catalasas termoestables producidas por *Penicillium pinophilum* y se determinó el peso molecular de cada catalasa termoestable. Se obtuvieron catalasas termoestables con un peso molecular de aproximadamente 80 kDa a partir de *Penicillium pinophilum*.

Tal como se usa en el presente documento, el término "una secuencia de aminoácidos en la que se han eliminado, sustituido o añadido uno o varios aminoácidos de la secuencia de aminoácidos" significa que la secuencia de aminoácidos original se modifica por sustitución o similar de varios aminoácidos de forma natural o según un procedimiento bien conocido, tal como la mutagénesis dirigida a sitio. El número de aminoácidos modificados es de 1 a 50, más preferentemente de 1 a 30, aún más preferentemente de 1 a 10, aún más preferentemente de 1 a 5, lo más preferentemente de 1 a 2.

Los ejemplos preferentes de una secuencia de aminoácidos modificada en la proteína según la presente invención pueden incluir una secuencia de aminoácidos en la que uno o más aminoácidos (preferentemente uno o varios aminoácidos, o uno, dos, tres o cuatro aminoácidos) se han sustituido de forma conservadora.

Tal como se usa en el presente documento, el término "sustitución conservadora" significa que se han reemplazado uno o más restos de aminoácido con aminoácidos diferentes que tienen propiedades químicas similares. Los ejemplos de la sustitución conservadora incluyen una sustitución de un resto hidrófobo por otro resto hidrófobo y una sustitución de un resto polar por otro resto polar que tiene la misma carga. Los aminoácidos que tienen propiedades químicas similares y pueden sustituirse de forma conservadora entre sí son conocidos por los expertos en la técnica. Más en particular, los ejemplos de aminoácidos no polares (hidrófobos) incluyen alanina, valina, isoleucina, leucina, prolina, triptófano, fenilalanina y metionina. Los ejemplos de aminoácidos polares (neutros) incluyen glicina, serina, treonina, tirosina, glutamina, asparagina y cisteína. Los ejemplos de aminoácidos básicos que tienen una carga positiva incluyen arginina, histidina y lisina. Los ejemplos de aminoácidos ácidos que tienen una carga negativa incluyen ácido aspártico y ácido glutámico.

Tal como se usa en el presente documento, el término "en condiciones rigurosas" significa que, después de la hibridación, se lava la membrana a temperatura elevada en una solución de concentración salina baja, por ejemplo, a 60 °C durante 15 minutos en una solución de SSC de concentración 0,5x (SSC 1x: citrato trisódico 15 mmol/l y cloruro de sodio 150 mmol/l), preferentemente, a 60 °C durante 15 minutos en una solución de SSC a concentración 0,5x con SDS al 0,1 %.

La hibridación se lleva a cabo según un procedimiento conocido. Cuando una colección disponible comercialmente, la hibridación se lleva a cabo según un procedimiento descrito en un protocolo adjunto a la colección.

Tal como se usa en el presente documento, el término "identidad" en relación con secuencias de nucleótidos o secuencias de aminoácidos significa el grado de similitud entre los nucleótidos o los restos de aminoácido que constituyen las secuencias que se quieren comparar. Tal como se usa en el presente documento, la "identidad" se puede representar mediante un valor calculado con un programa de búsqueda de homologías conocido. Por ejemplo, los valores se pueden calcular fácilmente con los parámetros por defecto de FASTA o similar.

La secuencia de aminoácidos que tiene una identidad del 80 % o más con la que consiste en los aminoácidos 1-692 de la SEC ID N°: 2 puede ser una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad preferentemente del 85 % o más, aún más preferentemente del 90 % o más, aún más preferentemente del 95 % o más, aún más preferentemente del 98 % o más, lo más preferentemente del 99 % o más.

En la presente invención, dada la secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos 1-692 de la SEC ID N°: 2, se pueden determinar y seleccionar fácilmente diversas secuencias de nucleótidos que codifican la secuencia de aminoácidos.

En la presente invención, el ADN que codifica una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos 1-692 de la SEC ID N°: 2 no solo significa parte o la totalidad de la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos 1-2403 de la SEC ID N°: 1, sino también la secuencias de nucleótidos que contienen codones degenerados que codifican los mismos aminoácidos. La presente invención incluye secuencias de ARN correspondientes a estas secuencias de nucleótidos.

Los ejemplos del ADN que codifica una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos 1-692 de la SEC ID N°: 2 incluyen un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos 1-2403 de la SEC ID N°: 1.

Los genes que codifican las catalasas termoestables producidas por *Penicillium pinophilum* se pueden aislar mediante la preparación de colecciones de fagos genómicos a partir de *Penicillium pinophilum* y la obtención de clones positivos de fagos que contienen los genes de catalasa termoestable. Como sondas para cribar las colecciones de fagos genómicos para detectar clones positivos se pueden usar fragmentos de los genes de catalasa termoestable. Cada uno de los fragmentos de los genes de catalasa termoestable que se van a usar como sondas se puede amplificar por PCR usando cada ADN genómico como molde. Se puede diseñar un juego de cebadores para la PCR en base a las secuencias conservadas entre los genes de catalasa conocidos derivados de hongos filamentosos. Se puede determinar la secuencia de nucleótidos de cada gen de catalasa termoestable al subclonar el gen de catalasa termoestable a partir de un clon positivo obtenido en un vector de *Escherichia coli* y analizar la secuencia de nucleótidos del vector obtenido. Se pueden deducir las secuencias intrónicas de la secuencia de nucleótidos determinada sobre la base de la comparación de la secuencia de aminoácidos deducida a partir de la secuencia de nucleótidos con las de las catalasas conocidas y las secuencias conservadas de intrones. Además, se puede deducir como una secuencia que codifica una secuencia señal una secuencia desde el codón de iniciación de la traducción del gen hasta el codón inmediatamente corriente arriba de la secuencia que codifica la secuencia de aminoácidos N-terminal de una catalasa termoestable purificada.

El gen de catalasa termoestable de longitud completa PCN, que se aisló a partir del ADN genómico de *Penicillium pinophilum* por el procedimiento descrito anteriormente, consistía en la secuencia de nucleótidos de 2403 pb de la SEC ID N°: 1 y se dedujo que el gen incluía cuatro intrones con secuencias de nucleótidos que consistían en los nucleótidos 322-372, 599-651, 1068-1113 y 1279-1326 de la SEC ID N°: 1. La secuencia de aminoácidos de la catalasa termoestable, deducida a partir de la secuencia del gen, era la de la SEC ID N°: 2. La secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos 1-31 de la SEC ID N°: 2 era completamente idéntica a la secuencia de aminoácidos N-terminal de la catalasa termoestable purificada a partir de *Penicillium pinophilum* y, por tanto, se dedujo que la secuencia de aminoácidos que consistía en -1 a -42 de la SEC ID N°: 2 era una secuencia señal y que la secuencias de nucleótidos que consistía en los nucleótidos 1-126 de la SEC ID N°: 1 era una secuencia de nucleótidos que codificaba la secuencia señal.

En base a la secuencia de nucleótidos del gen de catalasa PCN derivado de *Penicillium pinophilum*, se pueden diseñar cebadores para amplificar el gen de interés, se puede llevar a cabo una PCR con ADN genómico de *Penicillium pinophilum* como molde, se puede construir un vector de expresión ligando el fragmento de ADN amplificado en un vector apropiado y se puede aislar el gen de interés. El ADN de la presente invención derivado de *Penicillium pinophilum* está contenido en el plásmido pPCN y, por tanto, se puede usar el ADN o el plásmido como molde de ADN para la PCR. Se puede usar una enzima de restricción apropiada para preparar un fragmento de ADN deseado a partir del plásmido.

Según la presente invención, se proporciona *Escherichia coli* transformada con el pPCN. Esta cepa de *Escherichia coli* transformada se depositó con efectos nacionales en el International Patent Organism Depository National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (dirección: AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-chome Tukuba-shi, Ibarakiken 305-8566 Japón) el 7 de febrero de 2008 (número de depósito nacional: FERM P-21504) y se transformó en un depósito internacional el 11 de diciembre de 2008 (número de depósito internacional: FERM BP-11074).

Según la presente invención, se proporciona *Escherichia coli* transformada con el pHCN. Esta cepa de *Escherichia coli* transformada se depositó con efectos nacionales en el International Patent Organism Depository National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (dirección: AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-chome Tukuba-shi, Ibarakiken 305-8566 Japón) el 7 de febrero de 2008 (número de depósito nacional: FERM P-21503) y se transformó en un depósito internacional el 11 de diciembre de 2008 (número de depósito internacional: FERM BP-11073).

Se puede introducir cada uno de los genes de catalasa termoestable aislados como se describe anteriormente en un huésped y se puede producir una catalasa termoestable deseada al expresarla en el huésped. El ADN que se va a introducir en el huésped puede ser el de longitud completa de un gen de catalasa termoestable, un ADN obtenido por la escisión de parte o de todas las secuencias intrónicas del ADN de longitud completa o un ADN obtenido por escisión de la secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia señal.

Según la presente invención, se proporciona un vector de expresión que comprende el ADN de la presente invención, en la que se puede replicar el ADN en un microorganismo huésped y se puede expresar una proteína codificada por el ADN. Además, según la presente invención, se proporciona un microorganismo transformado con este vector de expresión.

El sistema de huésped-vector no está particularmente limitado. Por ejemplo, se puede usar un sistema que emplee *Escherichia coli*, actinomicetos, levaduras u hongos o un sistema de expresión de proteínas de fusión que lo use. Los ejemplos de un microorganismo huésped preferente usado en la presente invención incluyen hongos filamentosos, más preferentemente del género *Trichoderma*, el género *Aspergillus*, el género *Penicillium* (más preferentemente *Penicillium pinophilum*) y el género *Acremonium*. Como vector de expresión se pueden usar los vectores de expresión desvelados en las referencias de patente 9 a 13.

El vector de expresión de la presente invención se puede construir según procedimientos de uso extendido en el campo de la ingeniería genética.

5 El vector de expresión de la presente invención puede incluir, además del ADN de la presente invención, un ADN que pueda regular la expresión del ADN, un marcador genético para seleccionar un transformante, o similar, para expresar una proteína deseada por la incorporación del vector de expresión en un microorganismo huésped.

Se puede cultivar el transformante obtenido en un medio apropiado y se puede obtener la proteína de la presente invención al aislarla del cultivo. El cultivo del transformante y las condiciones del mismo se pueden seleccionar de forma apropiada según el microorganismo usado. Se puede recoger y purificar la proteína de interés del líquido de cultivo según los procedimientos convencionales.

## 10 Ejemplos

La presente invención se ilustrará ahora adicionalmente, pero en modo alguno se limitará, por los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1: medida de la actividad catalasa (termoestabilidad) en líquido de cultivo de *Penicillium pinophilum*

15 Se inoculó *Penicillium pinophilum* cultivado en agar de dextrosa de patata en un matraz cónico de 200 ml que contenía 30 ml de un medio (50 g/l de sacarosa, 20 g/l de extracto de malta y 5 g/l de extracto de levadura) y se cultivó a 26 °C durante 5 días con agitación. Las células del líquido se retiraron de cultivo resultante por centrifugación para obtener el sobrenadante de cultivo. Se midió la actividad catalasa (termoestabilidad) de la catalasa contenida en el sobrenadante de cultivo resultante por el procedimiento descrito en el ejemplo 4 de la referencia de patente 6. El porcentaje de actividad restante después de la incubación a 70 °C durante 30 minutos fue del 50 %. A partir del resultado se llegó a la conclusión de que *Penicillium pinophilum* producía catalasa termoestable.

Ejemplo 2: aislamiento y purificación de catalasa termoestable en líquido de cultivo de *Penicillium pinophilum*

25 Se disolvió sulfato de amonio en el sobrenadante de cultivo de *Penicillium pinophilum* obtenido en el procedimiento descrito en el ejemplo 1 a una concentración final de 1 mol/l. Se sometió y se adsorbió la solución resultante en una columna hidrófoba de fenilsefarsa HP 26/10 (fabricada por GE Healthcare bioScience) que se había equilibrado previamente con un tampón fosfato 50 mmol/l (pH 7,0) que contenía 1 mol/l de sulfato de amonio. Se eluyeron las proteínas adsorbidas en la columna hidrófoba y se fraccionaron con un procedimiento de elución en gradiente lineal desde un tampón fosfato 50 mmol/l (pH 7,0) que contenía 1 mol/l de sulfato de amonio a un tampón fosfato 50 mmol/l (pH 7,0). Se midió la actividad catalasa de cada eluato fraccionado por el procedimiento descrito en el ejemplo 1 y se recogieron las fracciones que tenían actividad. Se añadió sulfato de amonio a la fracción activa recogida a una concentración final de 1 mol/l y se repitió el procedimiento anterior para llevar a cabo una nueva cromatografía con la columna hidrófoba. Se concentró la fracción activa resultante, se desaló por ultrafiltración y se ajustó a una concentración final de 50 mmol/l con un tampón fosfato (pH 8,0). Esta solución se sometió a una columna de intercambio aniónico MonoQ (fabricada por GE healthcare Bioscience), que se había equilibrado previamente con un tampón fosfato 50 mmol/l (pH 8,0) que contenía 1 mol/l de sulfato de amonio, y se adsorbieron las proteínas en la columna. Se eluyeron las proteínas adsorbidas y se fraccionaron con un procedimiento de elución en gradiente lineal desde un tampón fosfato 50 mmol/l (pH 8,0) a un tampón fosfato 50 mmol/l (pH 8,0) que contenía 1 mol/l de NaCl. Se midió la actividad catalasa (termoestabilidad) de cada eluato fraccionado por el procedimiento descrito en el ejemplo 1 y se recogieron las fracciones que tenían actividad. Se analizó la fracción activa recogida por SDS-PAGE para detectar una única banda de aproximadamente 80 kDa y se consideró que la proteína detectada como la banda era una catalasa termoestable. Se separó la catalasa termoestable por SDS-PAGE y se transfirió a una membrana de poli(difluoruro de vinilideno) (PVDF). Se analizó la secuencia de aminoácidos N-terminal para obtener la siguiente secuencia:

DDSNASSETAEFLSEFYLNNDNDAYLTTDVGG (SEC ID N°: 5)

45 Ejemplo 3: clonación del gen de catalasa termoestable PCN de *Penicillium pinophilum*

3-1) Preparación de la colección de ADN genómico

50 Se aisló y se purificó ADN genómico a partir de células de *Penicillium pinophilum* según el procedimiento de Horiuchi y col. [H. Horiuchi y col., J. Bacteriol., 170, 272-278, (1988)]. Se digirió parcialmente el ADN genómico aislado con la enzima de restricción *Sau3AI*. Se ligaron los fragmentos de ADN resultantes con brazos *Bam*HI de un kit de clonación de fago vector EMBL3 (fabricado por Stratagene) con un kit de ligación Ver. 2 (fabricación por Takara Bio). Se precipitó la mezcla con etanol y se disolvió en un tampón TE. Se usó toda la cantidad de mezcla ligada y un kit de envasado MaxPlaxλ (fabricado por Epicenter Technologies) para formar partículas de fago y se infectó una cepa de *Escherichia coli* XL1-blue MRA (P2) con las partículas de fago. Como consecuencia, se obtuvo una colección de ADN genómico compuesta por  $1,1 \times 10^4$  fagos.

55 3-2) Preparación de la sonda

Se prepararon los siguientes cebadores en base a las secuencias conservadas entre las catalasas conocidas:

P catalasa F: GAGGCCGGCAACTACCCNGARTGGRA (SEC ID N°: 6)

P catalasa R: CCTGCTCGGTCTCGGCRAARWARTT (SEC ID N°: 7)

5 Se usaron los cebadores F de catalasa P y R de catalasa P y el ADN genómico como cebadores y molde, respectivamente, para llevar a cabo una PCR. En la PCR se usó la polimerasa LA Taq (fabricada por Takara Bio). En la PCR, se repitió 40 veces un ciclo compuesto por una reacción a 94 °C durante 30 segundos, alineación 30 segundos y una reacción de elongación a 72 °C durante 1 minuto. A este respecto, se redujo gradualmente la temperatura de alineación de los 20 primeros ciclos de 63 °C a 53 °C y la temperatura de alineación de los 20 ciclos siguientes fue de 53 °C. El fragmento de ADN amplificado de 250 pb se insertó en un vector plasmídico pCR2.1-TOPO, con un kit de clonación TOPO TA (fabricado por Invitrogen) según un protocolo adjunto al kit, para obtener el plásmido TOPO-catalasa P.

10 El fragmento de ADN clonado insertado en el plásmido TOPO-catalasa P se secuenció con el kit BigDye(R) Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (fabricado por Applied Biosystems) y un analizador genético ABI PRISM (fabricado por Applied Biosystems) según los protocolos adjuntos a los mismos. La secuencia de nucleótidos determinada se usó para llevar a cabo una búsqueda de homología. Como consecuencia, la secuencia de nucleótidos mostró una identidad del 71 % con la de una catalasa derivada de *Aspergillus clavatus* y, por tanto, se consideró que el fragmento de ADN formaba parte de un gen de catalasa. Se amplificó el fragmento de ADN por PCR usando el plásmido TOPO-catalasa P de manera sustancialmente similar a la descrita anteriormente y se marcó el producto de PCR obtenido con un sistema ECL Direct (fabricado por Amersham Pharmacia Biotech) como sonda.

### 20 3-3) Exploración por hibridación en placa

Se transfirieron placas de fagos preparadas en el ejemplo 3-1 a una membrana de transferencia de nailon Hybond N+ (fabricada por Amersham). Se desnaturalizó la membrana con álcali, se lavó con SSC 5x (SSC: 15 mmol/l de citrato trisódico y 150 mmol/l de cloruro de sodio) y se secó para inmovilizar los ADN. Después de una prehibridación a 42 °C durante 1 hora, se añadió la sonda marcada con peroxidasa de rábano picante (HRP) y se llevó a cabo una hibridación a 42 °C durante 4 horas. Se lavó la sonda dos veces con SSC 0,5x que contenía 6 mol/l de urea y SDS al 0,4 % y se lavó dos veces con SSC 2x.

30 Después de lavar la sonda, se sumergió la membrana de nailon en una solución de detección durante 1 minuto y se expuso a Hyperfilm ECL (fabricado por Amersham) para obtener un clon positivo. La preparación de ADN a partir del clon positivo se llevó a cabo usando LE392 como huésped de *Escherichia coli* según el procedimiento de Maniatis y col. (J. Sambrook, E. F. Fritsch y T. Maniatis, "Molecular Cloning", Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989). Se cultivó LE392 en un medio LB-MM (peptona al 1 %, extracto de levadura al 0,5 %, cloruro de sodio al 0,5 %, 10 mmol/l de sulfato de magnesio y maltosa al 0,2 %) durante la noche. Se infectó el cultivo con una solución de fago derivada de una sola placa y se cultivó en medio LB-MM durante la noche. Se añadieron cloruro de sodio y cloroformo al cultivo a concentraciones finales de 1 mol/l y 0,8 %, respectivamente, para promover la lisis de *Escherichia coli*. Se retiraron los desechos de células de *Escherichia coli* por centrifugación y se recogieron las partículas de fago de un precipitado de polietilenglicol (PEG) (PEG6000 al 10 %). Se digirieron las partículas de fago con proteinasa K en presencia de SDS, se trataron con fenol y se precipitaron con etanol para recoger el ADN de fago.

40 Se usó el ADN obtenido y el sistema ECL Direct para llevar a cabo la transferencia de bandas de Southern. Se llevó a cabo una hibridación con el fragmento amplificado por PCR descrito en el ejemplo 3-2 como sonda. Como consecuencia, el fragmento *Pst*I de aproximadamente 7 kb mostró patrones de hibridación comunes a los del ADN cromosómico.

45 Se clonó el fragmento *Pst*I en pUC118 para obtener el plásmido pUC-PCN. Se determinó la secuencia de nucleótidos del plásmido obtenido por el procedimiento descrito en el ejemplo 3-2. Para subclonar el gen de catalasa PCN derivado de *Penicillium pinophilum*, se llevó a cabo una PCR con el pUC-PCN como molde y el siguiente juego de cebadores (PCNF y PCNR) para amplificar el gen PCN.

PCNF: ATGCGAGGATTATACTCCCTC (SEC ID N°: 8)

PCNR: CTACTCATCCACAGCGAATCG (SEC ID N°: 9)

50 Se insertó el ADN amplificado en un vector plasmídico pCR2.1-TOPO con un kit de clonación TOPO TA (fabricado por Invitrogen) para obtener el plásmido pPCN. Se transformó una cepa TOP10 de *Escherichia coli* (Invitrogen) con plásmido pPCN para obtener *Escherichia coli* TOP10/pPCN.

### 3-4) Deducción de la secuencia de aminoácidos de la catalasa termoestable

55 El gen de catalasa termoestable de longitud completa PCN, que se aisló a partir del ADN genómico de *Penicillium pinophilum* por el procedimiento descrito anteriormente, consistía en la secuencia de nucleótidos de 2403 pb de la SEC ID N°: 1. Sobre la base de la comparación de la secuencia de aminoácidos deducida a partir de la secuencia



de nucleótidos con la de las catalasas conocidas, y las secuencias intrónicas conservadas, se dedujo que el gen incluía cuatro intrones con secuencias de nucleótidos que consistían en los nucleótidos 322-372, 599-651, 1068-1113 y 1279-1326 de la SEC ID N°: 1. La secuencia de aminoácidos de la catalasa termoestable, deducida a partir de la secuencia de nucleótidos, era la de la SEC ID N°: 2. La secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos 1-31 de la SEC ID N°: 2 era completamente idéntica a la secuencia de aminoácidos N-terminal (mostrada en el ejemplo 2) de la catalasa termoestable purificada a partir de *Penicillium pinophilum* y, por tanto, se dedujo que la secuencia de aminoácidos que consistía en -1 a -42 de la SEC ID N°: 2 era una secuencia señal y que la secuencia de nucleótidos que consistía en los nucleótidos 1-126 (que codifica los aminoácidos 1-a -42) de la SEC ID N°: 2) de la SEC ID N°: 1 era una secuencia de nucleótidos que codificaba la secuencia señal.

5 Ejemplo 4: medida de la actividad catalasa (termoestabilidad) en líquido de cultivo de *Humicola grisea*

Se preparó un sobrenadante de cultivo de *Humicola grisea* de manera sustancialmente similar a la descrita en el ejemplo 1. Se midió la actividad catalasa (termoestabilidad) de la catalasa contenida en el sobrenadante de cultivo resultante por el procedimiento descrito en el ejemplo 1. El porcentaje de actividad restante después de la incubación a 70 °C durante 30 minutos fue del 57 %. A partir del resultado se llegó a la conclusión de que *Humicola grisea* producía catalasa termoestable.

15 Ejemplo 5 (ejemplo de referencia): aislamiento y purificación de catalasa termoestable en líquido de cultivo de *Humicola grisea*

Se disolvió sulfato de amonio en el sobrenadante de cultivo de *Humicola grisea* obtenido en el procedimiento descrito en el ejemplo 4 a una concentración final de 1 mol/l. Se sometió y se adsorbió la solución resultante en una columna hidrófoba de fenilsefarsa HP 26/10 (fabricada por GE Healthcare bioScience) que se había equilibrado previamente con un tampón fosfato 50 mmol/l (pH 7,0) que contenía 1 mol/l de sulfato de amonio. Se eluyeron las proteínas adsorbidas en la columna hidrófoba y se fraccionaron con un procedimiento de elución en gradiente lineal desde un tampón fosfato 50 mmol/l (pH 7,0) que contenía 1 mol/l de sulfato de amonio a un tampón fosfato 50 mmol/l (pH 7,0). Se midió la actividad catalasa de cada eluato fraccionado por el procedimiento descrito en el ejemplo 1 y se recogieron las fracciones que tenían actividad. Se añadió sulfato de amonio a la fracción activa recogida a una concentración final de 1 mol/l y se repitió el procedimiento anterior para llevar a cabo una nueva cromatografía con la columna hidrófoba. Se concentró la fracción activa resultante, se desaló por ultrafiltración y se ajustó a una concentración final de 50 mmol/l con un tampón acetato (pH 4,0). Se sometió esta solución a una columna de intercambio catiónico MonoS (fabricada por GE healthcare Bioscience), que se había equilibrado previamente con un tampón acetato 50 mmol/l (pH 4,0). Se detectó la actividad catalasa en la fracción no adsorbida y, por tanto, se recogió la fracción no adsorbida como la fracción activa. Se analizó la fracción activa recogida por SDS-PAGE para detectar una única banda de aproximadamente 80 kDa y se consideró que la proteína detectada como la banda era una catalasa termoestable. Se separó la catalasa termoestable por SDS-PAGE y se transfirió a una membrana de PVDF. Se analizó la secuencia de aminoácidos N-terminal para obtener la siguiente secuencia:

35 QDTTSGQSPLAAYEVDSTG (SEC ID N°: 10)

Ejemplo 6 (ejemplo de referencia): clonación del gen de catalasa termoestable HCN de *Humicola grisea*

6-1) Preparación de la colección de ADN genómico

Se preparó una colección de ADN genómico de *Humicola grisea* por el procedimiento descrito en el ejemplo 3-1.

6-2) Preparación de la sonda

40 Se prepararon los siguientes cebadores en base a las secuencias conservadas entre las catalasas derivadas de hongos filamentosos y levaduras:

F de catalasa H: GTNCGNTTYTCNACTGT (SEC ID N°: 11)

R de catalasa H: AARAANACNGGNTTRTTGTT (SEC ID N°: 12)

[La abreviatura subrayada "N" en la 12ª posición de la SEC ID N°: 12 significa desoxiinosina.]

45 Se usaron los cebadores F de catalasa H y R de catalasa H y el ADN genómico como cebadores y molde, respectivamente, para llevar a cabo una PCR. En la PCR se usó la polimerasa Ex Taq (fabricada por Takara Bio). En la PCR, se repitió 30 veces un ciclo compuesto por una reacción a 98 °C durante 10 segundos, alineación a 55 °C durante 30 segundos y una reacción de elongación a 72 °C durante 15 segundos. Se insertó el fragmento de ADN amplificado de 300 pb en un vector plasmídico pCR2.1-TOPO, utilizando un kit de clonación TOPO TA (fabricado por Invitrogen) según un protocolo adjunto al kit, para obtener el plásmido TOPO-catalasa H.

50 Se secuenció el fragmento de ADN clonado insertado en el plásmido TOPO-catalasa H y se usó la secuencia de nucleótidos determinada para llevar a cabo una búsqueda de homología. Como consecuencia, la secuencia de nucleótidos mostró una identidad del 97 % con la de una catalasa derivada de *Sclerotinia sclerotiorum* y, por tanto, se consideró que el fragmento de ADN formaba parte de un gen de catalasa. Se amplificó el fragmento de ADN por

PCR usando el plásmido TOPO-catalasa H de manera sustancialmente similar a la descrita anteriormente y se marcó el producto de PCR obtenido con un sistema ECL Direct (fabricado por Amersham Pharmacia Biotech) como sonda.

#### 6-3) Exploración por hibridación en placa

5 Se cribó la colección de ADN genómico según el procedimiento descrito en el ejemplo 3-3 y se obtuvo un clon positivo. El clon positivo obtenido se analizó por transferencia de bandas de Southern. Como consecuencia, un fragmento *Xho*I de aproximadamente 7 kb y un fragmento *Bam*HI de aproximadamente 4 kb mostraron patrones de hibridación comunes con los del ADN cromosómico. El fragmento *Xho*I y el fragmento *Bam*HI se clonaron por separado en pUC118 para obtener el plásmido pUC-HCN-*Xho*I y el plásmido pUC-HCN-*Bam*HI, respectivamente.

10 Se determinaron las secuencias de nucleótidos de estos plásmidos. Como consecuencia, el fragmento *Xho*I contenía la secuencia desde el nucleótido 616 hasta el extremo 3' de la SEC ID N.º: 3 y el fragmento *Bam*HI contenía la secuencia desde el extremo 5' hasta el nucleótido 1675 de la SEC ID N.º: 3 y, por tanto, estos fragmentos contenían fragmentos de genes de catalasa termoestable. Se unieron estas secuencias de nucleótidos para determinar la de un gen de catalasa termoestable de longitud completa. Para subclonar el gen de catalasa HCN derivado de

15 *Humicola grisea*, se llevó a cabo una PCR con ADN genómico de *Humicola grisea* como molde y el siguiente juego de cebadores (HCNF y HCNR) para amplificar el gen HCN.

HCNF: ATGAACAGAGTCACGAATCTC (SEC ID N.º: 13)  
HCNR: TCAAAAAACAAAGGCACCAAG (SEC ID N.º: 14)

20 Se insertó el ADN amplificado en un vector plasmídico pCR2.1-TOPO con un kit de clonación TOPO TA (fabricado por Invitrogen) para obtener el plásmido pHCN. Se transformó una cepa TOP10 de *Escherichia coli* (Invitrogen) con plásmido pHCN para obtener *Escherichia coli* TOP10/pHCN.

#### 6-4) Deducción de la secuencia de aminoácidos de la catalasa termoestable

25 El gen de catalasa termoestable de longitud completa HCN, que se aisló a partir del ADN genómico de *Humicola grisea* por el procedimiento descrito anteriormente, consistía en la secuencia de nucleótidos de 2749 pb de la SEC ID N.º: 3. Sobre la base de la comparación de la secuencia de aminoácidos deducida a partir de la secuencia de nucleótidos con la de las catalasas conocidas, y las secuencias intrónicas conservadas, se dedujo que el gen incluía seis intrones con secuencias de nucleótidos que consistían en los nucleótidos 283-463, 667-747, 771-846, 1008-1160, 1218-1270 y 1842-1895 de la SEC ID N.º: 3. La secuencia de aminoácidos de la catalasa termoestable, deducida a partir de la secuencia de nucleótidos, era la de la SEC ID N.º: 4. La secuencia de aminoácidos que

30 consiste en los aminoácidos 1-20 de la SEC ID N.º: 4 era completamente idéntica a la secuencia de aminoácidos N-terminal (mostrada en el ejemplo 5) de la catalasa termoestable purificada a partir de *Humicola grisea* y, por tanto, se dedujo que la secuencia de aminoácidos que consistía en -1 a -32 de la SEC ID N.º: 4 era una secuencia señal y que la secuencia de nucleótidos que consistía en los nucleótidos 1-96 (que codifica los aminoácidos -1 a -32) de la SEC ID N.º: 4) de la SEC ID N.º: 3 era una secuencia de nucleótidos que codificaba la secuencia señal.

#### 35 Ejemplo 7: Preparación de un vector de expresión para PCN recombinante

Se llevó a cabo la expresión de PCN recombinante con *Aspergillus niger* var. *macrosporus* como huésped usando un vector de expresión en el que se insertó el gen PCN entre el promotor y el terminador de un gen de proctasa B, que se expresó considerablemente en *Aspergillus niger* var. *macrosporus*. El vector de expresión se preparó según los siguientes procedimientos.

#### 40 7-1) Preparación de la colección de ADN genómico

Se aisló y se purificó ADN genómico a partir de células de *Aspergillus niger* var. *macrosporus* según el procedimiento de Horiuchi et al. [H. Horiuchi y col., J. Bacteriol., 170, 272-278, (1988)]. Se digirió parcialmente el ADN genómico aislado con la enzima de restricción *Sau*3AI. Se ligaron los fragmentos de ADN resultantes con brazos *Bam*HI de un kit de clonación de fago vector  $\lambda$ EMBL3 (fabricado por Stratagene) con un kit de ligación Ver. 2

45 (fabricación por Takara Bio). Se precipitó la mezcla con etanol y se disolvió en un tampón TE. Se usó toda la cantidad de mezcla ligada y un kit de envasado MaxPlax $\lambda$  (fabricado por Epicenter Technologies) para formar partículas de fago y se infectó una cepa de *Escherichia coli* XL1-blue MRA (P2) con las partículas de fago. Como consecuencia, se obtuvo una colección de ADN genómico compuesta por  $1,25 \times 10^5$  fagos.

#### 7-2) Preparación de la sonda

50 Con respecto a la colección de ADN genómico de *Aspergillus niger* var. *macrosporus*, se llevó a cabo la transferencia de bandas de Southern usando la región codificante del gen de proctasa B como sonda para aislar un clon que contuviera las regiones promotora y terminadora del gen de proctasa B. Se amplificó la región codificante de la proctasa B por PCR usando un ADN genómico de *Aspergillus niger* var. *macrosporus* como molde y los siguientes cebadores (proctasaB-N y proctasaB-C), que se diseñaron en base a los extremos 5' y 3' de la región codificante de la proctasa B desvelada en la publicación de patente japonesa pendiente de examen (kokai) N.º 5-68570.

proctasaB-N: ATGGTCGTCTTCAGCAAAACC (SEC ID N°.: 15)  
 proctasaB-C: CTAAGCCTGAGCGGCGAATCC (SEC ID N°.: 16)

Se llevó a cabo la PCR usando un kit LA PCR™ KIT Ver2.1 (fabricado por Takara Bio). En la PCR, después de una incubación a 94 °C durante 1 minuto, se repitió 30 veces un ciclo compuesto por una reacción a 94 °C durante 30 segundos, una reacción a 52 °C durante 30 segundos y una reacción a 72 °C durante 90 segundos y se llevó a cabo una reacción a 72 °C durante 7 minutos para completar la PCR. Como consecuencia, se amplificó un ADN de aproximadamente 1,2 kb. Se insertó el fragmento de ADN amplificado de 1,2 kb en un vector plasmídico pCR2.1-TOPO, utilizando un kit de clonación TOPO TA (fabricado por Invitrogen) según un protocolo adjunto al kit, para obtener el plásmido TOPO-ProB. El fragmento de ADN clonado insertado en el plásmido TOPO-ProB se secuenció con el kit BigDye(R) Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (fabricado por Applied Biosystems) y un analizador genético ABI PRISM (fabricado por Applied Biosystems) según los protocolos adjuntos a los mismos. La secuencia de nucleótidos determinada concordaba con la del gen de proctasa B desvelada en la publicación de patente japonesa pendiente de examen (kokai) N.º 5-68570 y, por tanto, se consideró que el fragmento de ADN era la región codificante del gen de proctasa B. Se marcó el fragmento de ADN usando un sistema ECL Direct (fabricado por Amersham Pharmacia Biotech) como sonda.

7-3) Exploración de clones que contienen las regiones promotora y terminadora del gen de proctasa por hibridación en placa

Se transfirieron placas de fagos preparadas en el ejemplo 7-1 a una membrana de transferencia de nailon Hybond N+ (fabricada por Amersham). Se desnaturalizó la membrana con álcali, se lavó con SSC 5x (SSC: 15 mmol/l de citrato trisódico y 150 mmol/l de cloruro de sodio) y se secó para inmovilizar los ADN. Después de una prehibridación a 42 °C durante 1 hora, se añadió la sonda preparada por el procedimiento descrito en el ejemplo 7-2 y se llevó a cabo una hibridación a 42 °C durante 20 horas. Se lavó la sonda dos veces con SSC 0,5x que contenía 6 mol/l de urea y SDS al 0,4 % y se lavó dos veces con SSC 2x. Después de lavar la sonda, se sumergió la membrana de nailon en una solución de detección durante 1 minuto y se expuso a Hyperfilm ECL (fabricado por Amersham) para obtener ocho clones positivos.

La preparación de ADN a partir de cada uno de los clones positivos se llevó a cabo usando LE392 como huésped de *Escherichia coli* según el procedimiento de Maniatis y col. (J. Sambrook, E. F. Fritsch y T. Maniatis, "Molecular Cloning", Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989). Se cultivó LE392 en un medio LB-MM (peptona al 1 %, extracto de levadura al 0,5 %, cloruro de sodio al 0,5 %, 10 mmol/l de sulfato de magnesio y maltosa al 0,2 %) durante la noche. Se infectó el cultivo con una solución de fago derivada de una sola placa y se cultivó en medio LB-MM durante la noche. Se añadieron cloruro de sodio y cloroformo al cultivo a concentraciones finales de 1 mol/l y 0,8 %, respectivamente, para promover la lisis de *Escherichia coli*. Se retiraron los desechos de células de *Escherichia coli* por centrifugación y se recogieron las partículas de fago de un precipitado de polietilenglicol (PEG) (PEG6000 al 10 %). Se digirieron las partículas de fago con proteinasa K en presencia de SDS, se trataron con fenol y se precipitaron con etanol para recoger el ADN de fago.

Se usó el ADN obtenido y el sistema ECL Direct para llevar a cabo la transferencia de bandas de Southern. Se llevó a cabo una hibridación con la sonda preparada por el procedimiento descrito en el ejemplo 7-2. Como consecuencia, el fragmento *XhoI-EcoRI* de aproximadamente 5,5 kb mostró patrones de hibridación comunes a los del ADN cromosómico. Se consideró que el fragmento de ADN contenía el gen de proctasa B y después se llevó a cabo la subclonación del fragmento de ADN. Se insertó el fragmento *XhoI-EcoRI* escindido del ADN de fago entre los sitios *SaI* y *EcoRI* del pUC119 para obtener el plásmido pPROB/119E.X. Se secuenció la secuencia de nucleótidos del plásmido obtenido para determinar las de las regiones promotora y terminadora del gen de proctasa B.

7-4) Construcción del vector recombinante pPTB-EX para expresión génica

Un vector en el que se escindió la región codificante del gen de proctasa B del plásmido pPROB/119E.X preparado por el procedimiento descrito en el ejemplo 7-3 y el extremo 3' de la región promotora del gen se ligó en el extremo 5' de la región terminadora del gen a través de la secuencia de reconocimiento de *XbaI*, se denominó vector de expresión pPTB-EX. El vector de expresión pPTB-EX se preparó por una PCR inversa usando pPROB/119E.X como molde y los siguientes cebadores (proctasaBNxba y proctasaBCxba) diseñados en base al extremo 3' del promotor y el extremo 5' del terminador del gen de proctasa B, respectivamente.

proctasaBNxba: GGTCTAGAATGTCAAGCAAGAGAGT (SEC ID N°.: 17)  
 proctasaBCxba: GGTCTAGAATCAACCACTGAAGTGGA (SEC ID N°.: 18)

A este respecto, se añadió la secuencia de reconocimiento de *XbaI* al extremo 5' de cada cebador. En la PCR inversa, en la que se usó POLIMERASA de ADN Primestar MAX (fabricada por Takara Bio), se repitió 30 veces un ciclo compuesto por una reacción a 98 °C durante 10 segundos, alineación a 55 °C durante 5 segundos y una reacción de elongación a 72 °C durante 60 segundos. Como consecuencia, se amplificó un fragmento de ADN de aproximadamente 7 kb. Para purificar el fragmento de ADN se usaron el líquido de la reacción de PCR resultante y un kit de purificación de PCR QIAQUICK (fabricado por Qiagen). Se disolvió el fragmento de ADN en 50 µl de un tampón TE, se digirió con la enzima de restricción *XbaI* y se ligó de nuevo con un kit de ligación Ver. 2 (fabricación

por Takara Bio) para obtener el vector de expresión pPTB-EX. Se analizó la secuencia de nucleótidos del plásmido obtenido y se confirmó que la PCR inversa no provocó mutaciones.

#### 7-5) Construcción del vector pPTPCN para la expresión de PCN recombinante

5 Se insertó el gen PCN aislado por el procedimiento descrito en el ejemplo 3 en el sitio *Xba*I del vector de expresión pPTB-EX para construir el vector pPTPCN para expresar PCN recombinante. Para añadir la secuencia de reconocimiento de *Xba*I en los extremos 5' y 3' de la región codificante del gen PCN, se llevó a cabo una PCR usando pPCN como molde y los siguientes cebadores (PCN-*Xba*I PtN y PCN-*Xba*I PtC) en los que se añadió la secuencia de reconocimiento de *Xba*I en los extremos 5' y 3' de la región codificante del gen PCN.

10 PCN-*Xba*I PtN: GGTCTAGAGGTCAAAATGCGAGGATTATACTCCCT (SEC ID N°.: 19)  
PCN-*Xba*I PtC: GGTCTAGACTACTCATCCACAGCGAATCGG (SEC ID N°.: 20)

15 En la PCR, en la que se usó POLIMERASA de ADN Primestar MAX (fabricada por Takara Bio), se repitió 30 veces un ciclo compuesto por una reacción a 98 °C durante 10 segundos, alineación a 55 °C durante 5 segundos y una reacción de elongación a 72 °C durante 60 segundos. Como consecuencia, se amplificó un fragmento de ADN de aproximadamente 2,3 kb. Para purificar el fragmento de ADN se usaron el líquido de la reacción de PCR resultante y un kit de purificación de PCR QIAQUICK (fabricado por Qiagen). Se disolvió el fragmento de ADN en 50 µl de un tampón TE y se digirió con la enzima de restricción *Xba*I. El fragmento digerido se ligó con un kit de ligación Ver. 2 (fabricación por Takara Bio) a pPTB-EX, que se había digerido con *Xba*I y desfosforilado, para obtener el plásmido pPTPCN (SEC ID N°.: 21, figura 3). Se analizó la secuencia de ADN del gen PCN insertado en el plásmido y se confirmó que la PCR no provocó mutaciones.

20 Ejemplo 8: transformación de *Aspergillus niger* var. *macrosporus* con PCN-vector de expresión pPTPCN y expresión de PCN recombinante

Se llevó a cabo una transformación de *Aspergillus niger* var. *macrosporus* con PCN-vector de expresión pPTPCN mediante la transformación de una cepa de *Aspergillus niger* var. *macrosporus* deficiente en *niaD* con un gen *niaD* como gen marcador selectivo.

25 8-1) Aislamiento de la cepa deficiente en *niaD* Nia2

30 Se aplicaron esporas de *Aspergillus niger* var. *macrosporus* en un medio de Czapek-N (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> al 0,1 %, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O al 0,05 %, KCl al 0,05 %, FeSO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O al 0,001 %, sacarosa al 3 %, agar purificado al 1,5 %, a pH 5,5-6,0) complementado con glutamato de sodio al 0,188 % y KClO<sub>3</sub> al 3 % y se incubaron a 30 °C durante de 5 a 7 días. Se replicaron las colonias en cada medio en el que la fuente de nitrógeno del medio de Czapek se reemplazó con NO<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub> o glutamato y se incubaron a 30 °C durante de 5 a 7 días. Entre las colonias replicadas, se aisló como una cepa Nia2 deficiente en *niaD* una cepa que se pudo cultivar en el medio que contenía NH<sub>4</sub> o glutamato como fuente de nitrógeno, pero que no se pudo cultivar en el medio que contenía NO<sub>3</sub> como fuente de nitrógeno.

8-2) Aislamiento del gen *niaD*, gen marcador de selección

35 Se llevó a cabo una PCR con los siguientes cebadores Nia-N y Nia-C, diseñados sobre la base de los extremos 5' y 3' de la región codificante de un gen *niaD* de *Aspergillus niger* comunicado por Uncle y col. [Uncle, S.E., Cambell, E.I., Punt, P.J., Hawker, K.I., Contreras, R., Hawkins, A.R., Van Den Hondel, C.A. and Kinghorn, J.R., "The *Aspergillus niger niaD* gene encoding nitrate reductase: upstream nucleotide and amino acid sequence comparisons", *Gene* 111(2), 149-155(1992)], para amplificar la región codificante de un gen *niaD* de *Aspergillus niger* var. *macrosporus*.

40 Nia-N: ATGGCGACTGTCACTGAGGTG (SEC ID N°.: 22)  
Nia-C: TTAGAAGAAATGAAGTCCGA (SEC ID N°.: 23)

45 La PCR se llevó a cabo usando ADN genómico de *Aspergillus niger* var. *macrosporus* y un kit LA PCR™ Ver2.1 (fabricado por Takara Bio). En la PCR, después de una reacción a 94 °C durante 1 minuto, se repitió 30 veces un ciclo compuesto por una reacción a 94 °C durante 30 segundos, una reacción a 55°C durante 30 segundos y una reacción a 72 °C durante 3 minutos y se llevó a cabo una reacción a 72 °C durante 7 minutos. Como consecuencia, se amplificó un fragmento de ADN de aproximadamente 3 kb. Se marcó el fragmento de ADN amplificado usando un sistema ECL Direct (fabricado por Amersham Pharmacia Biotech) como sonda.

50 Se usó la región codificante del gen *niaD* preparada por el procedimiento anterior como sonda para aislar un clon que contenía las regiones promotora y terminadora del gen *niaD* a partir de la colección de ADN genómico, que se preparó por el procedimiento descrito en el ejemplo 7-1, de *Aspergillus niger* var. *macrosporus*. De manera sustancialmente similar a la descrita en el ejemplo 7, se cribó la colección de ADN genómico para obtener un clon positivo. Se analizó el clon de fago obtenido por transferencia de bandas de Southern de manera sustancialmente similar a la descrita en el ejemplo 7. Como consecuencia, el fragmento digerido con *Xba*I de aproximadamente 6,5 kb mostró patrones de hibridación comunes a los del ADN cromosómico. Se clonó este fragmento *Xba*I en el sitio de la secuencia de reconocimiento de *Xba*I del pUC118 para obtener el plásmido pPTNial 18. Se analizó la secuencia de nucleótidos del plásmido obtenido para determinar la secuencia de nucleótidos de 6416 pb (SEC ID N°.: 24) que

contenía las regiones promotora y terminadora del gen niaD.

#### 8-3) Introducción del gen PCN en la cepa Nia2 de *Aspergillus niger* var. *macrosporus*

Se cultivó la cepa Nia2 de *Aspergillus niger* var. *macrosporus* en un medio S (glucosa al 3,0 %, polipeptona al 0,1 %, extracto de levadura 1 %, sulfato de amonio al 0,14 %, fosfato de potasio al 0,2 %, sulfato de magnesio al 0,03 %, a pH 6,8) a 30 °C durante 24 horas y se centrifugó a 3500 rpm durante 10 minutos para recoger las células. Se lavaron las células recogidas con sacarosa 0,5 mol/l y se suspendieron en una solución de enzima para preparar protoplastos (10 mg/ml de  $\beta$ -glucuronidasa, 3 mg/ml de quitinasa, 3 mg/ml de zimoliasa, 0,5 mol/l de sacarosa), que se había filtrado a través de un filtro de 0,45  $\mu$ m. Se incubaron los micelios suspendidos a 30 °C durante 60 minutos con agitación para preparar protoplastos. Se filtró la suspensión a través de algodón absorbente y se centrifugó a 2500 rpm durante 10 minutos para recoger los protoplastos. Se lavaron los protoplastos con un tampón SUTC (sacarosa al 17,1 %, 10 mmol/l de Tris-HCl a pH 7,5, 10 mmol/l de CaCl<sub>2</sub>) y se resuspendieron en 100  $\mu$ l del tampón SUTC. A la suspensión de protoplastos, se le añadieron 7,5  $\mu$ l de pPTPCN (1  $\mu$ g/ $\mu$ l) y 2,5  $\mu$ l de pPTnia118 (1  $\mu$ g/ $\mu$ l) y se dejó reposar la mezcla en hielo durante 5 minutos. Además, se añadieron 400  $\mu$ l de una solución de PEG (PEG4000 al 60 %, 10 mmol/l de Tris-HCl a pH 7,5, 10 mmol/l de CaCl<sub>2</sub>) y se dejó reposar en hielo durante 20 minutos. Después de añadir otros 10 ml de tampón SUTC se centrifugó el conjunto a 2500 rpm durante 10 minutos. Se suspendieron los protoplastos centrifugados en 1 ml del tampón SUTC, se centrifugaron a 4000 rpm durante 5 minutos y, por último, se suspendieron en 100  $\mu$ l del tampón SUTC.

Se cubrieron los protoplastos resultantes con agar blando sobre un medio de Czapek modificado (NaNO<sub>3</sub> al 0,085 %, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> al 0,1 %, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O al 0,05 %, KCl al 0,05 %, FeSO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O al 0,001 %, sacarosa al 17,1 %, agar purificado al 1,5 %, a pH 5,5-6,0) y se incubaron a 30 °C durante de 5 a 7 días. Las colonias formadas después de la incubación se consideraron transformantes.

#### 8-4) Expresión de PCN y medida de la actividad enzimática en transformantes de la cepa Nia2 de *Aspergillus niger* var. *macrosporus*

Se cultivaron los transformantes obtenidos en un medio P (almidón al 1,0 %, harina de soja al 6,0 %, licor de maíz fermentado al 1,0 %, sulfato de amonio al 0,3 % y carbonato de calcio al 1 %) a 28 °C durante 6 días. Se analizó el sobrenadante de cada cultivo por SDS-PAGE para obtener una cepa (N.º 16) en la que se observó la banda con un peso molecular de aproximadamente 80 kDa, correspondiente a PCN recombinante. Con respecto al sobrenadante de cultivo de la cepa N.º 16, y a un sobrenadante obtenido por el cultivo de forma similar de la cepa Nia2, se midió la actividad catalasa por el procedimiento descrito en el ejemplo 1. Como se muestra en la tabla 1, la actividad de la cepa N.º 16 era 77 veces o más la de la natural y se confirmó que se expresaba PCN recombinante en la cepa N.º 16.

Tabla 1

	Actividad catalasa (u/ml)
Natural	menos de 300 u/ml
Cepa N.º 16	23300 u/ml

A este respecto, se consideró "1 unidad" de actividad catalasa como la cantidad de la enzima capaz de descomponer 1 mmol de peróxido de hidrógeno por minuto. Además, la actividad catalasa del sobrenadante de cultivo de *Penicillium pinophilum* preparado por el procedimiento descrito en el ejemplo 1 fue de 385 U/ml. Este resultado demuestra que la productividad de PCN aumenta considerablemente al expresar PCN en *Aspergillus niger* var. *macrosporus* como huésped.

#### 8-5) Análisis de la secuencia de aminoácidos N-terminal

Se sometió el sobrenadante de cultivo de la cepa transformante N.º 16 obtenida en el ejemplo 8-4 a SDS-PAGE y se transfirieron las proteínas separadas a una membrana de PVDF Immobilon-PSQ (fabricada por Millipore). Se tiñó la membrana de PVDF con azul brillante de Coomassie. Se cortó de la membrana una porción en la que se transfirió la proteína de aproximadamente 80 kDa y se sometió a un secuenciador de aminoácidos modelo 492 para determinar la secuencia de aminoácidos de 11 restos del extremo aminoterminal. La secuencia aminoácidos era la siguiente:

45 DDSNASSETEA (aminoácidos 1-11 de la SEC ID N.º: 5)

Esta secuencia de aminoácidos era idéntica a los aminoácidos N-terminales de PCN derivada de *Penicillium pinophilum* y, por tanto, se confirmó que la proteína de aproximadamente 80 kDa era la PCN recombinante.

#### 8-6) Evaluación de la termoestabilidad en PCN recombinante

Como se describe en el ejemplo 1, la termoestabilidad de PCN natural producida por *Penicillium pinophilum* fue del 50 %. La termoestabilidad de PCN recombinante obtenida por el procedimiento descrito en el ejemplo 8-4 se evaluó por el procedimiento descrito en el ejemplo 1. Como consecuencia, la termoestabilidad fue del 71,3 %. Este

resultado reveló que la termoestabilidad de PCN recombinante mejoró considerablemente en comparación con la de PCN natural.

5 Aunque se ha descrito la presente invención con referencia a modos de realización específicos, se contemplan diversos cambios y modificaciones evidentes para los expertos en la técnica sin alejarse del ámbito de las reivindicaciones adjuntas.

#### TEXTO LIBRE EN LA LISTA DE SECUENCIAS

10 Las secuencias de nucleótidos de SEC ID Nos.: 6-9 y 11-14 son secuencias de cebadores sintetizados artificialmente, es decir, F de catalasa P (SEC ID N°.: 6), R de catalasa P (SEC ID N°.: 7), PCNF (SEC ID N°.: 8), PCNR (SEC ID N°.: 9), F de catalasa H (SEC ID N°.: 11), R de catalasa H (SEC ID N°.: 12), HCNF (SEC ID N°.: 13), HCNR (SEC ID N°.: 14), proctasaB-N (SEC ID N°.: 15), proctasaB-C (SEC ID N°.: 16), proctasaBNxba (SEC ID N°.: 17), proctasaBCxba (SEC ID N°.: 18), PCN-XbaIPtN (SEC ID N°.: 19), PCN-XbaIPtC (SEC ID N°.: 20) y Nia-N (SEC ID N°.: 22) y Nia-C (SEC ID N°.: 23), respectivamente.

La secuencia de nucleótidos de ID NO.: 21 es el plásmido pPTPCN.

15 Las abreviaturas "N" en la posición 18 de la SEC ID N°.: 6, las posiciones 3, 6 y 12 de la SEC ID N°.: 11 y las posiciones 6 y 9 de la SEC ID N°.: 12 significan un nucleótido arbitrario; y la abreviatura "N" en la posición 12 de la SEC ID N°.: 12 significa desoxiinosina.

#### LISTADO DE SECUENCIAS

20 <110> Meiji Seika Kaisha, Ltd.

<120> Catalasa termoestable

<130> MEJ-827

25 <150> JP 2008-036171

<151> 18-02-2008

<160> 24

30 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 2403

<212> ADN

35 <213> *Penicillium pinophilum*

<220>

<221> sig\_peptide

<222> (1)..(126)

40

<220>

<221> exón

<222> (1)..(321)

45

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(321)

50

<220>

<221> mat\_peptide

<222> (127)..(2403)

55

<220>

<221> intrón

<222> (322)..(372)

60

<220>

<221> exón

<222> (373)..(598)

<220>

<221> CDS  
<222> (373)..(598)

5 <220>  
<221> intrón  
<222> (599)..(651)

10 <220>  
<221> exón  
<222> (652)..(1067)

15 <220>  
<221> CDS  
<222> (652)..(1067)

20 <220>  
<221> intrón  
<222> (1068)..(1113)

25 <220>  
<221> exón  
<222> (1114)..(1278)

30 <220>  
<221> CDS  
<222> (1114)..(1278)

35 <220>  
<221> intrón  
<222> (1279)..(1326)

40 <220>  
<221> exón  
<222> (1327)..(2403)

<220>  
<221> CDS  
<222> (1327)..(2403)

<400> 1

ES 2 547 118 T3

atg cga gga tta tac tcc ctc ggc gcc ttc gcc agt ctc att. gcg gcg	48
Met Arg Gly Leu Tyr Ser Leu Gly Ala Phe Ala Ser Leu Ile Ala Ala	
-40 -35 -30	
gct tcg gct gca tgc cca atg ctg act ggc gaa atc cca gct ggt agt	96
Ala Ser Ala Ala Cys Pro Met Leu Thr Gly Glu Ile Pro Ala Gly Ser	
-25 -20 -15	
gtt gcc aat cct cat cat cac gga aag cgt gac gat tca aat gct tcc	144
Val Ala Asn Pro His His His Gly Lys Arg Asp Asp Ser Asn Ala Ser	
-10 -5 -1 1 5	
tcc gaa aca gaa gcc ttt ctg tcc gag ttc tac ctc aac gac aac gat	192
Ser Glu Thr Glu Ala Phe Leu Ser Glu Phe Tyr Leu Asn Asp Asn Asp	
10 15 20	
gcc tat ctc acc acc gat gta ggc ggt ccg atc gag gat caa aac agt	240
Ala Tyr Leu Thr Thr Asp Val Gly Gly Pro Ile Glu Asp Gln Asn Ser	
25 30 35	
ttg aag gcc ggc att cgt gga tcg acc ctc ttg gaa gac ttc atc ttc	288
Leu Lys Ala Gly Ile Arg Gly Ser Thr Leu Leu Glu Asp Phe Ile Phe	
40 45 50	
cgt cag aaa atc cag cat ttt gat cat gag cgt gtaggttacc cattctatca	341
Arg Gln Lys Ile Gln His Phe Asp His Glu Arg	
55 60 65	
cgtacttcag gggtagttct gacatgcccc g gtc ccg gaa cgt gcc gtg cat	393
Val Pro Glu Arg Ala Val His	
70	
gct cga ggt gca ggt gct cat ggt gta ttt act tca tat gcc gac tgg	441
Ala Arg Gly Ala Gly Ala His Gly Val Phe Thr Ser Tyr Ala Asp Trp	
75 80 85	



ES 2 547 118 T3

tcc aac atc act gct gct tca ttt ttg gga gct tcc gga aag gaa acg Ser Asn Ile Thr Ala Ala Ser Phe Leu Gly Ala Ser Gly Lys Glu Thr 90 95 100	489
ccc aca ttt gtc cgc ttc tcg act gtt gca ggc agc cga gga agt gcc Pro Thr Phe Val Arg Phe Ser Thr Val Ala Gly Ser Arg Gly Ser Ala 105 110 115 120	537
gac acc got cgt gac gtt cac gga ttt gct act cgc ttc tat act gac Asp Thr Ala Arg Asp Val His Gly Phe Ala Thr Arg Phe Tyr Thr Asp 125 130 135	585
gag gga aac tat g gtagcctttc tctttgactc gtccatagat agggatgtaa Glu Gly Asn Tyr 140	638
ctgacttcaa cag ac att gtt gga aac aac att cct gtc ttc ttc atc Asp Ile Val Gly Asn Asn Ile Pro Val Phe Phe Ile 145 150	686
caa gat gct atc tta ttc cca gat ctc atc cat agc gtt aag cca cag Gln Asp Ala Ile Leu Phe Pro Asp Leu Ile His Ser Val Lys Pro Gln 155 160 165	734
cca gcc aat gaa atc cca cag gct gct act gca cac gac acg gcc tat Pro Ala Asn Glu Ile Pro Gln Ala Ala Thr Ala His Asp Thr Ala Tyr 170 175 180	782
gac ttc ttt ggt caa cag cca agc act ctg cat acc ctc ttc tgg gca Asp Phe Phe Gly Gln Gln Pro Ser Thr Leu His Thr Leu Phe Trp Ala 185 190 195 200	830
atg gca ggc cat ggt atc cca cgg tct ttc cgt cat gtt gac gga ttc Met Ala Gly His Gly Ile Pro Arg Ser Phe Arg His Val Asp Gly Phe 205 210 215	878
ggt gtc cac acc tat cgg ttc gtg aca gat gat ggc tcg tcc aag ttg Gly Val His Thr Tyr Arg Phe Val Thr Asp Asp Gly Ser Ser Lys Leu 220 225 230	926
gtc aaa ttt cac tgg aca tcg ctg caa ggt cgg gcc agt ctg gtc tgg Val Lys Phe His Trp Thr Ser Leu Gln Gly Arg Ala Ser Leu Val Trp 235 240 245	974
gag gaa gct cag gcc act gct ggc aaa aat gcc gac ttt atg aga cag Glu Glu Ala Gln Ala Thr Ala Gly Lys Asn Ala Asp Phe Met Arg Gln 250 255 260	1022
gat ctg tat gat agc att gag gct ggc cgt tat cca gag tgg gag Asp Leu Tyr Asp Ser Ile Glu Ala Gly Arg Tyr Pro Glu Trp Glu 265 270 275	1067
gtatgtacca ccgaattcat ggaaagtact cgactaacgt gaacag ctc ggc gtg Leu Gly Val 280	1122
caa ata att gag gag tcg gat gtc tta agc tac gga ttt gac ctg ttg Gln Ile Ile Glu Glu Ser Asp Val Leu Ser Tyr Gly Phe Asp Leu Leu 285 290 295	1170
gat cca acc aag att ctt ccg gtt gaa aaa gtt cca att act gcg ctc	1218

ES 2 547 118 T3

Asp	Pro	Thr	Lys	Ile	Leu	Pro	Val	Glu	Lys	Val	Pro	Ile	Thr	Ala	Leu		
300						305					310						
gga	aaa	atg	caa	ctc	aac	cgt	aat	cca	ttg	aat	tac	ttt	gcc	gag	aca		1266
Gly	Lys	Met	Gln	Leu	Asn	Arg	Asn	Pro	Leu	Asn	Tyr	Phe	Ala	Glu	Thr		
315					320					325					330		
gag	caa	gtc	atg	gtaagtcgac	cttccggcac	togagtcatt	tcctactaac										1318
Glu	Gln	Val	Met														
gtggatag	ttc	caa	cct	ggc	cac	att	gtt	cgt	ggt	atc	gac	ttc	acc	tat			1368
	Phe	Gln	Pro	Gly	His	Ile	Val	Arg	Gly	Ile	Asp	Phe	Thr	Tyr			
	335					340						345					
tat	cct	ctt	ctc	cag	ggt	cgt	tta	ttc	tcc	tac	ctc	gat	act	cag	ctg		1416
Tyr	Pro	Leu	Leu	Gln	Gly	Arg	Leu	Phe	Ser	Tyr	Leu	Asp	Thr	Gln	Leu		
	350					355						360					
aat	cgc	aat	ggt	ggt	ccc	aac	ttt	gaa	caa	att	cca	atc	aat	cgt	ccg		1464
Asn	Arg	Asn	Gly	Gly	Pro	Asn	Phe	Glu	Gln	Ile	Pro	Ile	Asn	Arg	Pro		
365					370					375					380		
cgt	gtt	cct	atc	cac	aac	aac	aac	cgc	gat	gga	ttc	gcc	caa	atg	ttt		1512
Arg	Val	Pro	Ile	His	Asn	Asn	Asn	Arg	Asp	Gly	Phe	Ala	Gln	Met	Phe		
				385					390						395		
att	cct	ttg	aac	cag	gca	gca	tat	tca	ccc	aac	acc	ttg	aat	aat	ggc		1560
Ile	Pro	Leu	Asn	Gln	Ala	Ala	Tyr	Ser	Pro	Asn	Thr	Leu	Asn	Asn	Gly		
			400					405							410		
tct	cct	cga	caa	gcc	aac	gag	act	gtc	gga	aat	ggc	ttc	ttt	acc	gcc		1608
Ser	Pro	Arg	Gln	Ala	Asn	Glu	Thr	Val	Gly	Asn	Gly	Phe	Phe	Thr	Ala		
		415					420					425					
ccc	ggg	cgc	tcc	gca	gat	gga	cac	ctt	gtt	cgc	gct	acg	agc	cca	aca		1656
Pro	Gly	Arg	Ser	Ala	Asp	Gly	His	Leu	Val	Arg	Ala	Thr	Ser	Pro	Thr		
	430					435					440						
ttt	gcc	gac	gtg	tgg	tct	cag	cct	ggc	ttg	ttt	tac	aac	tcc	ttg	acg		1704
Phe	Ala	Asp	Val	Trp	Ser	Gln	Pro	Gly	Leu	Phe	Tyr	Asn	Ser	Leu	Thr		
445					450					455					460		
gct	acc	gaa	caa	cag	ttc	gtg	atc	aat	gct	ttg	cgt	ttc	gaa	ttg	tct		1752
Ala	Thr	Glu	Gln	Gln	Phe	Val	Ile	Asn	Ala	Leu	Arg	Phe	Glu	Leu	Ser		
				465					470						475		
aat	gta	aag	agc	gag	gat	gtt	aaa	agc	aat	ttc	atc	aca	cag	ata	aat		1800
Asn	Val	Lys	Ser	Glu	Asp	Val	Lys	Ser	Asn	Phe	Ile	Thr	Gln	Ile	Asn		
			480					485							490		
cgc	gta	aac	aac	acg	tta	gca	aca	ctt	gtg	gct	tct	gca	att	gga	gtc		1848
Arg	Val	Asn	Asn	Thr	Leu	Ala	Thr	Leu	Val	Ala	Ser	Ala	Ile	Gly	Val		
		495					500					505					
tcc	gcg	ccc	gaa	ccc	gac	tct	aca	tac	tac	cac	agc	aat	aag	acg	tct		1896
Ser	Ala	Pro	Glu	Pro	Asp	Ser	Thr	Tyr	Tyr	His	Ser	Asn	Lys	Thr	Ser		
	510					515					520						
aat	gtc	gga	aca	ttc	ggt	act	cgg	ttg	aaa	aag	ctt	gac	ggt	ctc	aag		1944
Asn	Val	Gly	Thr	Phe	Gly	Thr	Pro	Leu	Lys	Lys	Leu	Asp	Gly	Leu	Lys		

ES 2 547 118 T3

525		530		535		540	
gtc gga gtc ctt gct tcg gtg aac ggt gaa agt agt att gcc gag gga							1992
Val Gly Val Leu Ala Ser Val Asn Gly Glu Ser Ser Ile Ala Glu Gly							
		545		550		555	
caa gca ttg gca caa agc cta gcg ggc tcg aac gtg gac gtc gtt atc							2040
Gln Ala Leu Ala Gln Ser Leu Ala Gly Ser Asn Val Asp Val Val Ile							
		560		565		570	
gtc gcc gag cat ctt act tcg aac gtg tca gct aca tac tct gga tca							2088
Val Ala Glu His Leu Thr Ser Asn Val Ser Ala Thr Tyr Ser Gly Ser							
		575		580		585	
gac gca acg aac ttt gat gct gtt att gtc agc tca ggg gct gaa ggt							2136
Asp Ala Thr Asn Phe Asp Ala Val Ile Val Ser Ser Gly Ala Glu Gly							
		590		595		600	
ctc ttt gga cct caa acc ttt aca gcc gaa tcc aat aca aca ctt tat							2184
Leu Phe Gly Pro Gln Thr Phe Thr Ala Glu Ser Asn Thr Thr Leu Tyr							
		605		610		615	620
ccg gca ggc cgt cct agc cag att ttg gtc gat gcc ttc cgc ttt ggc							2232
Pro Ala Gly Arg Pro Ser Gln Ile Leu Val Asp Ala Phe Arg Phe Gly							
		625		630		635	
aag ccg gtt gga gca gtt ggt ggt gcc agt gca gct ctg tca gcg gtg							2280
Lys Pro Val Gly Ala Val Gly Gly Ala Ser Ala Ala Leu Ser Ala Val							
		640		645		650	
gat atc agt act gat cgt agt ggt gtg att act ggt gat tcc gtc agt							2328
Asp Ile Ser Thr Asp Arg Ser Gly Val Ile Thr Gly Asp Ser Val Ser							
		655		660		665	
gac gac ttt gtc aag cag cta acg gag gac ctt gcc aca ttc aaa ttc							2376
Asp Asp Phe Val Lys Gln Leu Thr Glu Asp Leu Ala Thr Phe Lys Phe							
		670		675		680	
ttg gac cga ttc gct gtg gat gag tag							2403
Leu Asp Arg Phe Ala Val Asp Glu							
		685		690			

<210> 2

<211> 734

<212> PRT

<213> *Penicillium pinophilum*

<400> 2

Met Arg Gly Leu Tyr Ser Leu Gly Ala Phe Ala Ser Leu Ile Ala Ala  
 -40 -35 -30

Ala Ser Ala Ala Cys Pro Met Leu Thr Gly Glu Ile Pro Ala Gly Ser  
 -25 -20 -15

Val Ala Asn Pro His His His Gly Lys Arg Asp Asp Ser Asn Ala Ser  
 -10 -5 -1 1 5

5

10

ES 2 547 118 T3

Ser Glu Thr Glu Ala Phe Leu Ser Glu Phe Tyr Leu Asn Asp Asn Asp  
10 15 20

Ala Tyr Leu Thr Thr Asp Val Gly Gly Pro Ile Glu Asp Gln Asn Ser  
25 30 35

Leu Lys Ala Gly Ile Arg Gly Ser Thr Leu Leu Glu Asp Phe Ile Phe  
40 45 50

Arg Gln Lys Ile Gln His Phe Asp His Glu Arg Val Pro Glu Arg Ala  
55 60 65 70

Val His Ala Arg Gly Ala Gly Ala His Gly Val Phe Thr Ser Tyr Ala  
75 80 85

Asp Trp Ser Asn Ile Thr Ala Ala Ser Phe Leu Gly Ala Ser Gly Lys  
90 95 100

Glu Thr Pro Thr Phe Val Arg Phe Ser Thr Val Ala Gly Ser Arg Gly  
105 110 115

Ser Ala Asp Thr Ala Arg Asp Val His Gly Phe Ala Thr Arg Phe Tyr  
120 125 130

Thr Asp Glu Gly Asn Tyr Asp Ile Val Gly Asn Asn Ile Pro Val Phe  
135 140 145 150

Phe Ile Gln Asp Ala Ile Leu Phe Pro Asp Leu Ile His Ser Val Lys  
155 160 165

Pro Gln Pro Ala Asn Glu Ile Pro Gln Ala Ala Thr Ala His Asp Thr  
170 175 180

Ala Tyr Asp Phe Phe Gly Gln Gln Pro Ser Thr Leu His Thr Leu Phe  
185 190 195

Trp Ala Met Ala Gly His Gly Ile Pro Arg Ser Phe Arg His Val Asp  
200 205 210

Gly Phe Gly Val His Thr Tyr Arg Phe Val Thr Asp Asp Gly Ser Ser  
215 220 225 230

Lys Leu Val Lys Phe His Trp Thr Ser Leu Gln Gly Arg Ala Ser Leu  
235 240 245

ES 2 547 118 T3

Val Trp Glu Glu Ala Gln Ala Thr Ala Gly Lys Asn Ala Asp Phe Met  
 250 255 260

Arg Gln Asp Leu Tyr Asp Ser Ile Glu Ala Gly Arg Tyr Pro Glu Trp  
 265 270 275

Glu Leu Gly Val Gln Ile Ile Glu Glu Ser Asp Val Leu Ser Tyr Gly  
 280 285 290

Phe Asp Leu Leu Asp Pro Thr Lys Ile Leu Pro Val Glu Lys Val Pro  
 295 300 305 310

Ile Thr Ala Leu Gly Lys Met Gln Leu Asn Arg Asn Pro Leu Asn Tyr  
 315 320 325

Phe Ala Glu Thr Glu Gln Val Met Phe Gln Pro Gly His Ile Val Arg  
 330 335 340

Gly Ile Asp Phe Thr Tyr Tyr Pro Leu Leu Gln Gly Arg Leu Phe Ser  
 345 350 355

Tyr Leu Asp Thr Gln Leu Asn Arg Asn Gly Gly Pro Asn Phe Glu Gln  
 360 365 370

Ile Pro Ile Asn Arg Pro Arg Val Pro Ile His Asn Asn Asn Arg Asp  
 375 380 385 390

Gly Phe Ala Gln Met Phe Ile Pro Leu Asn Gln Ala Ala Tyr Ser Pro  
 395 400 405

Asn Thr Leu Asn Asn Gly Ser Pro Arg Gln Ala Asn Glu Thr Val Gly  
 410 415 420

Asn Gly Phe Phe Thr Ala Pro Gly Arg Ser Ala Asp Gly His Leu Val  
 425 430 435

Arg Ala Thr Ser Pro Thr Phe Ala Asp Val Trp Ser Gln Pro Gly Leu  
 440 445 450

Phe Tyr Asn Ser Leu Thr Ala Thr Glu Gln Gln Phe Val Ile Asn Ala  
 455 460 465 470

Leu Arg Phe Glu Leu Ser Asn Val Lys Ser Glu Asp Val Lys Ser Asn  
 475 480 485

Phe Ile Thr Gln Ile Asn Arg Val Asn Asn Thr Leu Ala Thr Leu Val

ES 2 547 118 T3

	490		495		500														
	Ala	Ser	Ala	Ile	Gly	Val	Ser	Ala	Pro	Glu	Pro	Asp	Ser	Thr	Tyr	Tyr			
			505					510					515						
	His	Ser	Asn	Lys	Thr	Ser	Asn	Val	Gly	Thr	Phe	Gly	Thr	Pro	Leu	Lys			
		520					525					530							
	Lys	Leu	Asp	Gly	Leu	Lys	Val	Gly	Val	Leu	Ala	Ser	Val	Asn	Gly	Glu			
	535					540					545					550			
	Ser	Ser	Ile	Ala	Glu	Gly	Gln	Ala	Leu	Ala	Gln	Ser	Leu	Ala	Gly	Ser			
					555					560					565				
	Asn	Val	Asp	Val	Val	Ile	Val	Ala	Glu	His	Leu	Thr	Ser	Asn	Val	Ser			
				570					575					580					
	Ala	Thr	Tyr	Ser	Gly	Ser	Asp	Ala	Thr	Asn	Phe	Asp	Ala	Val	Ile	Val			
			585					590					595						
	Ser	Ser	Gly	Ala	Glu	Gly	Leu	Phe	Gly	Pro	Gln	Thr	Phe	Thr	Ala	Glu			
		600					605					610							
	Ser	Asn	Thr	Thr	Leu	Tyr	Pro	Ala	Gly	Arg	Pro	Ser	Gln	Ile	Leu	Val			
	615					620					625					630			
	Asp	Ala	Phe	Arg	Phe	Gly	Lys	Pro	Val	Gly	Ala	Val	Gly	Gly	Ala	Ser			
					635					640					645				
	Ala	Ala	Leu	Ser	Ala	Val	Asp	Ile	Ser	Thr	Asp	Arg	Ser	Gly	Val	Ile			
				650					655					660					
	Thr	Gly	Asp	Ser	Val	Ser	Asp	Asp	Phe	Val	Lys	Gln	Leu	Thr	Glu	Asp			
			665					670					675						
	Leu	Ala	Thr	Phe	Lys	Phe	Leu	Asp	Arg	Phe	Ala	Val	Asp	Glu					
		680					685					690							

<210> 3  
 <211> 2749  
 <212> ADN  
 <213> *Humicola grisea*

5

<220>  
 <221> sig\_peptide  
 <222> (1)..(96)

10

<220>  
 <221> exón  
 <222> (1)..(282)

15

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(282)

5

<220>  
 <221> mat\_peptide  
 <222> (97)..(2749)

10

<220>  
 <221> intrón  
 <222> (283)..(463)

15

<220>  
 <221> exón  
 <222> (464)..(666)

20

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (464)..(666)

25

<220>  
 <221> intrón  
 <222> (667)..(747)

30

<220>  
 <221> exón  
 <222> (748)..(770)

35

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (748)..(770)

40

<220>  
 <221> intrón  
 <222> (771)..(846)

45

<220>  
 <221> exón  
 <222> (847)..(1007)

50

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (847)..(1007)

55

<220>  
 <221> intrón  
 <222> (1008)..(1160)

60

<220>  
 <221> exón  
 <222> (1161)..(1217)

65

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1161)..(1217)

<220>  
 <221> intrón  
 <222> (1218)..(1270)

<220>  
 <221> exón  
 <222> (1271)..(1841)

<220>  
 <221> CDS

ES 2 547 118 T3

<222> (1271)..(1841)

<220>  
 <221> intrón  
 5 <222> (1842)..(1895)

<220>  
 <221> exón  
 10 <222> (1896)..(2749)

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1896)..(2749)

15 <400> 3

atg aac aga gtc acg aat ctc ctc gcc tgg gcc ggc gcg ata ggg ctc	48
Met Asn Arg Val Thr Asn Leu Leu Ala Trp Ala Gly Ala Ile Gly Leu	
-30 -25 -20	
gcc caa gca aca tgc ccc ttc gcg gac cct gcc gct ctg tat agg cgt	96
Ala Gln Ala Thr Cys Pro Phe Ala Asp Pro Ala Ala Leu Tyr Arg Arg	
-15 -10 -5 -1	
cag gat act acc agc ggc cag tcg cca ctt gca gca tac gag gtg gat	144
Gln Asp Thr Thr Ser Gly Gln Ser Pro Leu Ala Ala Tyr Glu Val Asp	
1 5 10 15	
gac agc acc gga tac ctg acc tcc gat gtt ggc ggg ccc att cag gac	192
Asp Ser Thr Gly Tyr Leu Thr Ser Asp Val Gly Gly Pro Ile Gln Asp	
20 25 30	
cag acc agc ctc aag gca ggc atc cgg ggt ccg acc ctt ctt gag gac	240
Gln Thr Ser Leu Lys Ala Gly Ile Arg Gly Pro Thr Leu Leu Glu Asp	
35 40 45	
ttt atg ttc cgc cag aag atc cag cac ttc gac cat gaa cgg	282
Phe Met Phe Arg Gln Lys Ile Gln His Phe Asp His Glu Arg	
50 55 60	
gtaaggacat aatgctcaca cgagcggctg cgtacctatt tattttgaac gggtaaggac	342
ataatgctca caccgagcggc tgcgtacctt tattttccg agagatgggc tggctggctg	402
gctgtgatgc ctgagtttgg ggacatacgg agtaccttac tgacgcgcta atccactoca	462
g gtt ccc gaa agg gcg gtc cat gct cga ggc gct gga gca cac ggg acc	511
Val Pro Glu Arg Ala Val His Ala Arg Gly Ala Gly Ala His Gly Thr	
65 70 75	
ttc acg agt tac gcc gac tgg agt aac atc acc gcg gcg tcc ttt ctg	559
Phe Thr Ser Tyr Ala Asp Trp Ser Asn Ile Thr Ala Ala Ser Phe Leu	
80 85 90	



ES 2 547 118 T3

aac gcc aca gga aag cag acg ccg gtg ttt gtc cgg ttc tcg acc gtt 607  
Asn Ala Thr Gly Lys Gln Thr Pro Val Phe Val Arg Phe Ser Thr Val  
95 100 105 110

gct ggg tct cga ggg agc gca gac acg gcg aga gac gtt cat ggt ttc 655  
Ala Gly Ser Arg Gly Ser Ala Asp Thr Ala Arg Asp Val His Gly Phe  
115 120 125

gcg acg cgg tt gtaagttttg ttgtgtttca ttogttccgg tctgtagagg 706  
Ala Thr Arg Phe

agggttagga tatgagctaa cgtgtgtgtg tgtgtgtgaa g t tac act gat gaa 760  
Tyr Thr Asp Glu

ggc aac ttt g gtacgtccca cgcattggtcc tcaattctct tatctggcag 810  
Gly Asn Phe  
135

cgatgtggtc attgtcgacg ttgctaactt gcgtag at atc gtc gga aac aac 863  
Asp Ile Val Gly Asn Asn  
140

atc ccg gta ttc ttc att caa gat gca atc cag ttc cct gac ctt atc 911  
Ile Pro Val Phe Phe Ile Gln Asp Ala Ile Gln Phe Pro Asp Leu Ile  
145 150 155

cac tcg gtc aag ccg agt cca gac aac gag att ccc caa gcg gcg acg 959  
His Ser Val Lys Pro Ser Pro Asp Asn Glu Ile Pro Gln Ala Ala Thr  
160 165 170 175

gct cat gat tca gct tgg gac ttc ttc agc cag cag cca agc gcc atg 1007  
Ala His Asp Ser Ala Trp Asp Phe Phe Ser Gln Gln Pro Ser Ala Met  
180 185 190

gtaagcaatg gaccaaggag ccgcacctgg ggtgacatac cagggagtac acggggcgtt 1067

ccgatgaccc tcgtgtgacc aaggcagtac aacactccac ggaggactcg aagagattcg 1127

gaaatattgga acacagaact gacaggatgg tag cac acg ttg ttc tgg gcc atg 1181  
His Thr Leu Phe Trp Ala Met  
195

tct ggc cac gga atc cct cgc agc tat cgc cat atg gtacgtttgc 1227  
Ser Gly His Gly Ile Pro Arg Ser Tyr Arg His Met  
200 205 210

ctggctgaga tgaccgtgaa tccatttcta acctcaagtc cag gat ggc ttc ggc 1282  
Asp Gly Phe Gly

gtc cac acg ttc cgg ttt gtc aaa gat gac ggc tcg tcc aag ttg atc 1330  
Val His Thr Phe Arg Phe Val Lys Asp Asp Gly Ser Ser Lys Leu Ile  
215 220 225 230

aag tgg cat ttc aag tca cgc cag gga aag gcg agt cta gtc tgg gaa 1378  
Lys Trp His Phe Lys Ser Arg Gln Gly Lys Ala Ser Leu Val Trp Glu  
235 240 245

ES 2 547 118 T3

gag gcg cag gtt ctt tct ggc aag aat gcc gac ttc cac cgt cag gac	1426
Glu Ala Gln Val Leu Ser Gly Lys Asn Ala Asp Phe His Arg Gln Asp	
250 255 260	
ctc tgg gat gct att gag tcc ggg aac gga cca gaa tgg gat gtc tgc	1474
Leu Trp Asp Ala Ile Glu Ser Gly Asn Gly Pro Glu Trp Asp Val Cys	
265 270 275	
gtc cag att gtc gat gag tcc cag gcg caa gcc ttt ggc ttc gac ttg	1522
Val Gln Ile Val Asp Glu Ser Gln Ala Gln Ala Phe Gly Phe Asp Leu	
280 285 290	
ctg gac ccg aca aag atc atc ccc gag gag tac gcc ccc ttg acg aaa	1570
Leu Asp Pro Thr Lys Ile Ile Pro Glu Glu Tyr Ala Pro Leu Thr Lys	
295 300 305 310	
ctg ggg ctc ttg aag ctg gat cgc aat ccg acc aac tac ttc gcc gag	1618
Leu Gly Leu Leu Lys Leu Asp Arg Asn Pro Thr Asn Tyr Phe Ala Glu	
315 320 325	
acg gag cag gtc atg ttc caa ccc ggt cat ata gtc cgc ggc gtc gac	1666
Thr Glu Gln Val Met Phe Gln Pro Gly His Ile Val Arg Gly Val Asp	
330 335 340	
ttc acg gag gat ccc ctg cta cag gga cgt ctc ttc tcg tac ctt gac	1714
Phe Thr Glu Asp Pro Leu Leu Gln Gly Arg Leu Phe Ser Tyr Leu Asp	
345 350 355	
acg cag ctg aac cgg aat ggc ggg ccc aac ttt gag cag ctg ccc atc	1762
Thr Gln Leu Asn Arg Asn Gly Gly Pro Asn Phe Glu Gln Leu Pro Ile	
360 365 370	
aac atg ccg cgg gtg ccg att cac aac aat aat cgc gac ggc gcc ggc	1810
Asn Met Pro Arg Val Pro Ile His Asn Asn Asn Arg Asp Gly Ala Gly	
375 380 385 390	
cag atg ttc atc cac agg aac aag tat cct t gtaagtacct cttttgcctc	1861
Gln Met Phe Ile His Arg Asn Lys Tyr Pro	
395 400	
gatcgttggtg gtgccggctt gctgacagac gcag ac act ccc aac acc ctg aac	1915
Tyr Thr Pro Asn Thr Leu Asn	
405	
agt ggt tat ccg cgg caa gcc aac caa aat gcc gga cgc gga ttc ttc	1963
Ser Gly Tyr Pro Arg Gln Ala Asn Gln Asn Ala Gly Arg Gly Phe Phe	
410 415 420	
aca gcg cct ggc cgt acc gtc agc ggt gcc ctc gtc cgt gag gtg tcg	2011
Thr Ala Pro Gly Arg Thr Val Ser Gly Ala Leu Val Arg Glu Val Ser	
425 430 435	
cca aca ttc aac gac cac tgg tcg cag ccc cgt ctc ttc ttc aac tcc	2059
Pro Thr Phe Asn Asp His Trp Ser Gln Pro Arg Leu Phe Phe Asn Ser	
440 445 450 455	
ctc act ccc gtc gaa cag cag ttc ctc gtc aac gcc atg cgc ttc gaa	2107
Leu Thr Pro Val Glu Gln Gln Phe Leu Val Asn Ala Met Arg Phe Glu	
460 465 470	
atc agc ctt gtg aag tcg gaa gaa tgc agg aag aac gtg ctc acc cag	2155

Ile Ser Leu Val Lys Ser Glu Glu Cys Arg Lys Asn Val Leu Thr Gln	
475	480
485	
ctc aac cgc gtc agc cat gat gtg gcc gtg cgc gtg gcc gcc gct atc	2203
Leu Asn Arg Val Ser His Asp Val Ala Val Arg Val Ala Ala Ala Ile	
490	495
500	
ggc ctc gcc gcg ccc gac gcg gac gac aca tac tac cac aac aac aag	2251
Gly Leu Ala Ala Pro Asp Ala Asp Asp Thr Tyr Tyr His Asn Asn Lys	
505	510
515	
acg gct ggc gtc tcg atc ctt gga agc ggg ccc ttg cct acc atc aag	2299
Thr Ala Gly Val Ser Ile Leu Gly Ser Gly Pro Leu Pro Thr Ile Lys	
520	525
530	
act ctc cgc gtc ggc atc ctg gct acc acg agc gag tcg agc gcg ctg	2347
Thr Leu Arg Val Gly Ile Leu Ala Thr Thr Ser Glu Ser Ser Ala Leu	
540	545
550	
gat cag gca gcc cag ctc cgc acc cgt ctg gaa aag gac ggg ctt gtg	2395
Asp Gln Ala Ala Gln Leu Arg Thr Arg Leu Glu Lys Asp Gly Leu Val	
555	560
565	
gtc acg gtt gtg gct gaa acg ctg cgc gag ggg gta gac cag aca tac	2443
Val Thr Val Val Ala Glu Thr Leu Arg Glu Gly Val Asp Gln Thr Tyr	
570	575
580	
tcg acg gcg gat gcc acg ggt ttc gac ggc gtt gtt gtt gtg gac ggg	2491
Ser Thr Ala Asp Ala Thr Gly Phe Asp Gly Val Val Val Asp Gly	
585	590
595	
gcg gcg gcg ctg ttt gcc agc acc gcg tcg tcg ccg ttg ttc ccg acg	2539
Ala Ala Ala Leu Phe Ala Ser Thr Ala Ser Ser Pro Leu Phe Pro Thr	
600	605
610	615
ggc agg ccg ttg cag atc ttt gtg gac gcg tat cgg tgg gga aag ccg	2587
Gly Arg Pro Leu Gln Ile Phe Val Asp Ala Tyr Arg Trp Gly Lys Pro	
620	625
630	
gtc ggt gtg tgt ggt ggg aag tcg agc gag gtg ttg gat gcg gcg gat	2635
Val Gly Val Cys Gly Gly Lys Ser Ser Glu Val Leu Asp Ala Ala Asp	
635	640
645	
gtt ccg gaa aat ggg gac ggg gtg tat tcg gag gag tcg gtg gac aag	2683
Val Pro Glu Asn Gly Asp Gly Val Tyr Ser Glu Glu Ser Val Asp Lys	
650	655
660	
ttt gtg gag gag ttt gag aag ggg ttg gct act ttc agg gtg agt ctt	2731
Phe Val Glu Glu Phe Glu Lys Gly Leu Ala Thr Phe Arg Val Ser Leu	
665	670
675	
ggt gcc ttt gtt ttt tga	2749
Gly Ala Phe Val Phe	
680	

<210> 4  
 <211> 716  
 <212> PRT  
 <213> *Humicola grisea*

5

<400> 4

ES 2 547 118 T3

Met Asn Arg Val Thr Asn Leu Leu Ala Trp Ala Gly Ala Ile Gly Leu  
 -30 -25 -20

Ala Gln Ala Thr Cys Pro Phe Ala Asp Pro Ala Ala Leu Tyr Arg Arg  
 -15 -10 -5 -1

Gln Asp Thr Thr Ser Gly Gln Ser Pro Leu Ala Ala Tyr Glu Val Asp  
 1 5 10 15

Asp Ser Thr Gly Tyr Leu Thr Ser Asp Val Gly Gly Pro Ile Gln Asp  
 20 25 30

Gln Thr Ser Leu Lys Ala Gly Ile Arg Gly Pro Thr Leu Leu Glu Asp  
 35 40 45

Phe Met Phe Arg Gln Lys Ile Gln His Phe Asp His Glu Arg Val Pro  
 50 55 60

Glu Arg Ala Val His Ala Arg Gly Ala Gly Ala His Gly Thr Phe Thr  
 65 70 75 80

Ser Tyr Ala Asp Trp Ser Asn Ile Thr Ala Ala Ser Phe Leu Asn Ala  
 85 90 95

Thr Gly Lys Gln Thr Pro Val Phe Val Arg Phe Ser Thr Val Ala Gly  
 100 105 110

Ser Arg Gly Ser Ala Asp Thr Ala Arg Asp Val His Gly Phe Ala Thr  
 115 120 125

Arg Phe Tyr Thr Asp Glu Gly Asn Phe Asp Ile Val Gly Asn Asn Ile  
 130 135 140

Pro Val Phe Phe Ile Gln Asp Ala Ile Gln Phe Pro Asp Leu Ile His  
 145 150 155 160

Ser Val Lys Pro Ser Pro Asp Asn Glu Ile Pro Gln Ala Ala Thr Ala  
 165 170 175

His Asp Ser Ala Trp Asp Phe Phe Ser Gln Gln Pro Ser Ala Met His  
 180 185 190

Thr Leu Phe Trp Ala Met Ser Gly His Gly Ile Pro Arg Ser Tyr Arg  
 195 200 205

ES 2 547 118 T3

His Met Asp Gly Phe Gly Val His Thr Phe Arg Phe Val Lys Asp Asp  
 210 215 220

Gly Ser Ser Lys Leu Ile Lys Trp His Phe Lys Ser Arg Gln Gly Lys  
 225 230 235 240

Ala Ser Leu Val Trp Glu Glu Ala Gln Val Leu Ser Gly Lys Asn Ala  
 245 250 255

Asp Phe His Arg Gln Asp Leu Trp Asp Ala Ile Glu Ser Gly Asn Gly  
 260 265 270

Pro Glu Trp Asp Val Cys Val Gln Ile Val Asp Glu Ser Gln Ala Gln  
 275 280 285

Ala Phe Gly Phe Asp Leu Leu Asp Pro Thr Lys Ile Ile Pro Glu Glu  
 290 295 300

Tyr Ala Pro Leu Thr Lys Leu Gly Leu Leu Lys Leu Asp Arg Asn Pro  
 305 310 315 320

Thr Asn Tyr Phe Ala Glu Thr Glu Gln Val Met Phe Gln Pro Gly His  
 325 330 335

Ile Val Arg Gly Val Asp Phe Thr Glu Asp Pro Leu Leu Gln Gly Arg  
 340 345 350

Leu Phe Ser Tyr Leu Asp Thr Gln Leu Asn Arg Asn Gly Gly Pro Asn  
 355 360 365

Phe Glu Gln Leu Pro Ile Asn Met Pro Arg Val Pro Ile His Asn Asn  
 370 375 380

Asn Arg Asp Gly Ala Gly Gln Met Phe Ile His Arg Asn Lys Tyr Pro  
 385 390 395 400

Tyr Thr Pro Asn Thr Leu Asn Ser Gly Tyr Pro Arg Gln Ala Asn Gln  
 405 410 415

Asn Ala Gly Arg Gly Phe Phe Thr Ala Pro Gly Arg Thr Val Ser Gly  
 420 425 430

Ala Leu Val Arg Glu Val Ser Pro Thr Phe Asn Asp His Trp Ser Gln  
 435 440 445

ES 2 547 118 T3

Pro Arg Leu Phe Phe Asn Ser Leu Thr Pro Val Glu Gln Gln Phe Leu  
450 455 460

Val Asn Ala Met Arg Phe Glu Ile Ser Leu Val Lys Ser Glu Glu Cys  
465 470 475 480

Arg Lys Asn Val Leu Thr Gln Leu Asn Arg Val Ser His Asp Val Ala  
485 490 495

Val Arg Val Ala Ala Ala Ile Gly Leu Ala Ala Pro Asp Ala Asp Asp  
500 505 510

Thr Tyr Tyr His Asn Asn Lys Thr Ala Gly Val Ser Ile Leu Gly Ser  
515 520 525

Gly Pro Leu Pro Thr Ile Lys Thr Leu Arg Val Gly Ile Leu Ala Thr  
530 535 540

Thr Ser Glu Ser Ser Ala Leu Asp Gln Ala Ala Gln Leu Arg Thr Arg  
545 550 555 560

Leu Glu Lys Asp Gly Leu Val Val Thr Val Val Ala Glu Thr Leu Arg  
565 570 575

Glu Gly Val Asp Gln Thr Tyr Ser Thr Ala Asp Ala Thr Gly Phe Asp  
580 585 590

Gly Val Val Val Val Asp Gly Ala Ala Ala Leu Phe Ala Ser Thr Ala  
595 600 605

Ser Ser Pro Leu Phe Pro Thr Gly Arg Pro Leu Gln Ile Phe Val Asp  
610 615 620

Ala Tyr Arg Trp Gly Lys Pro Val Gly Val Cys Gly Gly Lys Ser Ser  
625 630 635 640

Glu Val Leu Asp Ala Ala Asp Val Pro Glu Asn Gly Asp Gly Val Tyr  
645 650 655

Ser Glu Glu Ser Val Asp Lys Phe Val Glu Glu Phe Glu Lys Gly Leu  
660 665 670

Ala Thr Phe Arg Val Ser Leu Gly Ala Phe Val Phe  
675 680

<210> 5  
<211> 31  
<212> PRT

<213> *Penicillium pinophilum*

<400> 5

Asp Asp Ser Asn Ala Ser Ser Glu Thr Glu Ala Phe Leu Ser Glu Phe  
1 5 10 15

5 Tyr Leu Asn Asp Asn Asp Ala Tyr Leu Thr Thr Asp Val Gly Gly  
20 25 30

<210> 6

<211> 26

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador: P catalasa F

15 <220>

<221> misc feature

<222> (18)..(18)

<223> cualquiera

20 <400> 6

gaggccggca actaccngg rttgga 26

<210> 7

<211> 25

<212> ADN

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador: P catalasa R

30 <400> 7

cctgctcggc ctcggcraar wartt 25

<210> 8

<211> 21

<212> ADN

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador: PCNF

40 <400> 8

atgcgaggat tatactccct c 21

<210> 9

<211> 21

<212> ADN

45 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador: PCNR

50 <400> 9

ctactcatcc acagcgaatc g 21

55 <210> 10

<211> 20

<212> PRT

60 <213> *Humicola grisea*

ES 2 547 118 T3

<400> 10

Gln Asp Thr Thr Ser Gly Gln Ser Pro Leu Ala Ala Tyr Glu Val Asp  
 1 5 10 15

Asp Ser Thr Gly  
 20

5 <210> 11  
 <211> 17  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> cebador: H catalasa F

15 <220>  
 <221> misc feature  
 <222> (3)..(3)  
 <223> cualquiera

20 <220>  
 <221> misc feature  
 <222> (6)..(6)  
 <223> cualquiera

25 <220>  
 <221> misc feature  
 <222> (12)..(12)  
 <223> cualquiera

30 <400> 11  
 gtncgnttyt cnactgt 17

35 <210> 12  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (6)..(6)  
 <223> cualquiera

45 <220>  
 <221> misc feature  
 <222> (9)..(9)  
 <223> cualquiera

50 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (12)..(12)  
 <223> desoxiinosina

55 <400> 12  
 aaraanacng gntrrtgtt 20

60 <210> 13  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial



<220>  
 <223> cebador: HCNF  
 5 <400> 13  
 atgaacagag tcacgaatct c 21  
 <210> 14  
 <211> 21  
 10 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> cebador: HCNR  
 15 <400> 14  
 tcaaaaaaca aaggcaccaa g 21  
 <210> 15  
 <211> 21  
 20 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> cebador: proctasaB-N  
 25 <400> 15  
 atggtcgtct tcagcaaaac c 21  
 <210> 16  
 <211> 21  
 30 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> cebador: proctasaB-C  
 35 <400> 16  
 ctaagcctga gcggcgaatc c 21  
 <210> 17  
 <211> 25  
 40 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> cebador: proctasaBNxba  
 45 <400> 17  
 ggtctagaat gtcaagcaag agagt 25  
 <210> 18  
 <211> 26  
 50 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> cebador: proctasaBCxba  
 60 <400> 18  
 ggtctagaat caaccactga agtggga 26  
 <210> 19  
 <211> 35  
 65 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> cebador: PCN-XbaIPtN

5 <400> 19  
ggctagagg tcaaatgcg aggattatac tcct 35

<210> 20  
<211> 30  
10 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> cebador: PCN-XbaIPtC

15 <400> 20  
ggctagact actcatccac agcgaatcgg 30

<210> 21  
<211> 9728  
20 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> plásmido pPTPCN

25 <400> 21

ES 2 547 118 T3

togagattct ggtcccgcgc gaccacctca agcatgcccc tgtccggacg tgctttcgta 60  
 ttctgtcggg gatgatttcc atcttgaagg taggcccctt cggttccccc gtaggcctg 120  
 gctctgctga caattttcca gactttcacg ctccgtgcca aagaagacga tgtgcgtgtg 180  
 togctggacc tccaggatcg caccattgaa gccttgaaga cctgcgtagt cgacgatgtt 240  
 cacctaaacc acgcgattgc gcgattgttg gaattgctca ccaccagcat tgcacgcgt 300  
 tttctgcgtt tcgcgccctt ggaccgcagc ggcgatggcg aacaagaacg cccatccgca 360  
 ccagtctcac ggcatcagtc gccgcggccg cgtgaagggc cacaaaaccg ccgggaaggg 420  
 tgggocgatg cctggacgcc agcgcagagt gcgacacaaa atctgggata tgtcgatagc 480  
 aatagccaga cggggaccag catgacttct gtccatgatc cgctggcccg catccctgcc 540  
 cagccgatca attcgtccaa catcaatgtc tcttcatgc cccctcctcc atcagtgtat 600  
 tacaactact acgaccccag cgcaactccg ccggcggggc agctggacgg gtctaatgtt 660  
 ccgtctcagg cgatgcacga taatccaggc acgtccggcg gattgcccga ctgggttgcg 720  
 ctgccactcg accagttttt caacagttcg acagccgtgg tggaccaggg tctggggaggc 780  
 acgggcccga tgggtggcga atttgacatg ctggaggtgc ttctaaatga acagtatgac 840  
 ggtcatgagg ggatagagtc ggctggcggg gggaaacctc cgtcacagtt tttgcaatcg 900  
 tgatcacoga tggctcctatg aatgtacgaa tttacgcgtc gtagcttctt cctctttttg 960  
 cttggattct tgctagtcc tttctgtaca cttecgcttt tggcttgtga tcttgattgc 1020  
 tagagatgta tctctcaag gataccgccg gagtgcgcca tttctgggta ccttctcttt 1080  
 ccctttttgt ctcgatcgtg aggcggaacg caggatgaag acacggcttc tccatcgcgg 1140  
 cccaccaacc aacaatgtcc ttggaagccc aactctccat ctactgggca ttgggtccat 1200  
 gcagagacac cgtcgagctc aatggggccg gccaaacccg agtcgtcagg ggcagcggca 1260  
 gcaacgagct aaattagacc actgataaga cgcgatagtc caaagtctga ccgtcacatt 1320  
 gtgccagcag ataagttgaa tcgtgtgact ggatgttggc taacgtatgg cgtctccgga 1380  
 ggcccgacgg accctgcgcg atcggcgggt gagcgcgaatc taaggacatc cgcgcctaag 1440  
 atatctacc ttcagcagtt cagcctagcc ctgcagactt gtcggaccag tgctatcgtg 1500  
 atcggccccc acggtcgaat gagctcttgt ctctttccgt cagaccctgc cagttaatct 1560  
 gctatctact ccgcggtaac atcgtgcctg tctccactaa ggcagggctc agggctgtat 1620  
 gtcttacttt gcaccgagtc ggccgcgggt tggctctgtc ttggcaattg cgaatatcct 1680  
 caogggcgac ggacgacaag gatttggacg gacatgogga gatcttcgtc ggtttattcc 1740  
 tgggaagggac atcatctcct tccatcatga cggctgccat agcggggact ctgagacatt 1800  
 tttgctctga agagcatggt cgacttggat gatggaggag ttgatcgagg tcaatgagga 1860

ES 2 547 118 T3

gaggcttgca agtataagaa gagactgctc gaccagcaga atggatcttc ttgttcatca 1920  
 accaagagtc caaggcttct ttgtctgggt ctatctcttc tccgaactct cttgcttgac 1980  
 attctagagg tcaaaatgcg aggattatac tccctcggcg ccttcgccag tctcattgcg 2040  
 geggcttcgg ctgcatgccc aatgctgact ggcgaaatcc cagctggtag tgttgccaat 2100  
 cctcatcadc acggaaagcg tgacgattca aatgcttcoo cggaaacaga agcctttctg 2160  
 tccgagttct acctcaacga caacgatgcc tatctcacca ccgatgtagg cgggccgatc 2220  
 gaggatcaaa acagtttgaa ggccggcatt cgtggatoga cctcttgga agacttcadc 2280  
 ttccgtcaga aaatccagca ttttgatcat gagcgtgtag gttatccatt ctatcacgta 2340  
 cttcaggggt agttctgaca tgcccaggtc ccggaacgtg ccgtgcatgc tccaggtgca 2400  
 ggtgctcatg gtgtatttac ttcatatgcc gactggcca acatcactgc tgcttcattt 2460  
 ttgggagctt ccggaagga aacgcccaca tttgtccgct tctcactgtg tgcaggcagc 2520  
 cgaggaagtg ccgacaccgc tcgtgacgtt cacggatttg ctactcgtt ctatactgac 2580  
 gagggaaact atggtagcct ttctctttga ctctccata gatagggatg taactgactt 2640  
 caacagacat tgttggaac aacattcctg tcttcttoat ccaagatgct atcttattcc 2700  
 cagatctcat ccatagcgtt aagccacagc cagccaatga aatcccacag gctgctactg 2760  
 cacacgacac ggcctatgac ttctttggtc aacagccaag cactctgcat accctcttct 2820  
 gggcaatggc aggccatggt atcccacggt ctttccgtca tgttgacgga ttcgggtgccc 2880  
 acacctatcg gttcgtgaca gatgatggct cgtccaagtt ggtcaaattt cactggacat 2940  
 cgctgcaagg tccggccagt ctggtctggg aggaagctca ggccactgct ggcaaaaatg 3000  
 ccgactttat gagacaggat ctgtatgata gcattgaggc tggccgttat ccagagtggg 3060  
 aggtatgtac caccgaattc atggaaagta ctcgactaac gtgaacagct cggcgtgcaa 3120  
 ataattgagg agtcggatgt cttaaagtac ggatttgacc tgttgatcc aaccaagatt 3180  
 cttccggttg aaaaagttcc aattactgcg ctccgaaaaa tgcaactcaa ccgtaatcca 3240  
 ttgaattact ttgccgagac agagcaagtc atggtaagtc gaccttccgg cactcgagtc 3300  
 atttctact aacgtggata gttccaacct ggccacattg ttcgtggat cgacttcacc 3360  
 gaggatcctc ttctccaggg tcgtttatte tctacctog atactcagct gaatcgcaat 3420  
 ggtggtccca actttgaaca aattccaatc aatcgtccgc gtgttctat ccacaacaac 3480  
 aaccgcgatg gattcccca aatgtttatt cctttgaacc aggcagcata ttcaccaac 3540  
 acctgaata atggctctcc tcgacaagcc aacgagactg tcggaaatgg cttctttacc 3600  
 gccccgggc gctccgcaga tggacacctt gttccgccta ccgagccaac atttgccgac 3660

ES 2 547 118 T3

gtgtggtctc agcctggctt gttttacaac tccttgacgg ctaccgaaca acagttcgtg 3720  
 atcaatgctt tgcgtttcga attgtctaata gtaaagagcg aggatgttaa aagcaatttc 3780  
 atcacacaga taaatogcgt aaacaacaag ttagcaaacac ttgtggcttc tgcaattgga 3840  
 gtctccgcgc ccgaaccoga ctctacatac taccacagca ataagacgtc taatgtcggg 3900  
 acattcggta ctccgttgaa aaagcttgac ggtctcaagg tcggagtcct tgcttcggtg 3960  
 aacggtgaaa gtagtattgc cgagggacaa gcattggcac aaagcctagc gggctcgaac 4020  
 gtggacgtcg ttatcgtcgc cgagcatctt acttcgaacg tgtcagctac atactctgga 4080  
 tcagacgcaa cgaactttga tgctgttatt gtcagctcag gggctgaagg tctctttgga 4140  
 cctcaaacct ttacagccga atccaataca acactttatc cggcaggccg tcctagccag 4200  
 attttggtcg atgccttcog ctttggaag ccggttgag cagttggtgg tgccagtcca 4260  
 gctctgtcag cgggtgatat cagtactgat cgtagtgggtg tgattactgg tgattccgtc 4320  
 agtgacgact ttgtcaagca gctaacggag gaccttgcca cattcaaatt cttggaccga 4380  
 ttccgtgtgg atgagtagtc tagaatcaac cactgaagtg gagtctataa tctgctgatt 4440  
 gatccctoga cgatgaacta catgtggaaa tgtatagcag acgaggggtga tggatgatgat 4500  
 gttgatttga tgatgaccog tacatacttg atgaagctcg gtacatatgc aaatgtgact 4560  
 gtatctatgt gatgaatata tatatatata tgtatatoca totcatggct tttggctatg 4620  
 agtgcaggat aacacctga accagtagta gtactttccc acctatatct actgcggtgc 4680  
 ctcgccggc ccaacatcac ccagaggtg gccgcagagg agtcttataa gatagctact 4740  
 atcagttaca acacctctct gacagatgtg aaggagtaca ataaatcacc gaaacacaaa 4800  
 ttcaactaaa atcggtagt aataataatt taagacccaa tccacgcaat gttaaactat 4860  
 ctctgggtgt gaaagatctc tcccctggca acacctagtt gtgggagAAC tgtgtttgcc 4920  
 tgccatagat tccgttgacg ctccgtggga aagtgcagtt acataaatat attaagaaag 4980  
 tagagttgta gtttagatta ttaataagtt tcaatagtct agtcctctac aatcgcacag 5040  
 ttaaaatatt atcatgtcaa taagcaaac tgccatagag atagtagtaa gttcctggcg 5100  
 aagaagttgt gaacttgctt ggaattgaga aaattgggga cgggcgcggtt agatagggac 5160  
 cgacgccccaa atgaaccaca tcaataaagt caatttttgg aaaccgtttc tacacaagta 5220  
 gcccttggtg cgcaatcggg agcgcgtaag acttotaatc ttaaggctgt gggttcgacc 5280  
 cccaccaggg gctttttttt atttatcttt tcccctttg atttcgcatt caacttcaag 5340  
 cttttttgaa acatatgagg cgcctccctt atgtcctttt cctttccttc tttctttctt 5400  
 atgtcatctc gtccttctgc tatcaatcaa agaaatatct gccctctcca aacgtgactt 5460  
 gtttgcgcaa ttaacatcat gcttcatatt cacatgaacg gcccgctcac ttgctttttt 5520

ES 2 547 118 T3

tgtotaacct caagcaagaa gctgctgtga atgcaagcta atatggcatg atattgtacc 5580  
 cgccattaac caaggaggcc cttgtggcgc aatcggtagc gogtaagact tctaactcta 5640  
 aggctgtggg ttcgaccccc accaggggct ttacattttt ttcattttct ttttggta 5700  
 ttccttcctt atttttcgta gtattacott aagaaactat aattgactaa ctgggctggg 5760  
 tcatgataat gttattgaca gtatactgcc tagcaagatg gtgttttata atatcaatca 5820  
 gctcctcccc cccttcctcc ggcgaaattc gagatagacg ctgaatgttc actgcaacaa 5880  
 aggaaaggga aggaagaggg ggggagggta catggaaaat cacatcaaca cacgattaac 5940  
 gaggcagtgg actggtatgt gccccacgcc taaatcggtc aagcaaagga tgagcagtat 6000  
 tttcattacc aatgtggata aaccgtctcg ggaactgcga gatctcttcc aatgatttct 6060  
 tctccagaac ctccacgaag gtgttcgctt tgaataccat acccatggcc gaatttgttg 6120  
 catagtatac cacttcacga ccgaaggaat cgggttatct aatccggaaa gctagacgga 6180  
 gggccggatc atcatgagct tcagagcttg aggttgcata tagacttgta tgcgtttctc 6240  
 occaaggaca aagctccagt ttgacaaaga cttttccatc catgatatcc atatcatccg 6300  
 ggaatagaat ctgcaatag taaatattag aagctaagtt gagacgatac agccccaaagc 6360  
 ttcaggtaag tgagtagcca gtataagatt aaatcgagct aatagcctgg gagcatacgg 6420  
 taagcccaaa gagatcatat actgatcatt agtgatgtga ctccatttgg caattcctct 6480  
 cgtttaaaac gctgatagga taaaaccatt aatactagta tcgcagtatc acgaagtatc 6540  
 gggatgaat cctcaaacia ctccagcgga gagagtagta togtcccatg ccttaggcca 6600  
 attcactggc cgtcgtttta caacgtcgtg actgggaaaa ccctggcgtt acccaactta 6660  
 atcgccttgc agcacatccc cctttcgcca gctggcgtaa tagcgaagag gcccgcacccg 6720  
 atcgccttcc ccaacagttg cgcagcctga atggcgaatg gcgcctgatg cgtatttttc 6780  
 tcocttaogca tctgtgcggt atttcacacc gcatacgtca aagcaaccat agtaocgcgc 6840  
 ctgtagcggc gcattaagcg cggcgggtgt ggtggttacg cgcagcgtga cogctacact 6900  
 tgccagcgcc ttagcgcgcc ctcttttcgc tttcttcctt tctttctcg ccacgttcgc 6960  
 cggctttccc cgtcaagctc taaatcgggg gctcccttta gggttccgat ttagtgcttt 7020  
 acggcacctc gacoccaaaa aacttgattt ggggtgatgtt tcacgtagtg ggccatcgcc 7080  
 ctgatagacg gtttttcgcc ctttgacgtt ggagtcacag ttctttaata gtggactctt 7140  
 gttccaaact ggaacaacac tcaactctat ctcgggctat tcttttgatt tataagggat 7200  
 tttgccgatt tcggtctatt ggttaaaaaa tgagctgatt taacaaaaat ttaacgcgaa 7260  
 ttttaacaaa atattaacgt ttacaatttt atggtgcact ctcagtacaa tctgctctga 7320

ES 2 547 118 T3

tgccgcatag ttaagccagc cccgacaccc gccaacaccc gctgacgcgc cctgacgggc 7380  
 ttgtctgctc ccggcctccg cttacagaca agctgtgacc gtctccggga gctgcatgtg 7440  
 tcagaggttt tcaccgtcat caccgaaacg cgcgagacga aagggcctcg tgatacgctt 7500  
 atttttatag gttaatgtca tgataataat ggtttcttag acgtcaggtg gcacttttcg 7560  
 gggaaatgtg cgcggaaccc ctatttgttt atttttctaa atacattcaa atatgtatcc 7620  
 gctcatgaga caataaccct gataaatgct tcaataatat tgaaaaagga agagtatgag 7680  
 tattcaacat ttcogtgtcg cccttatcc cttttttgcg gcattttgce ttctgtttt 7740  
 tgctcaccca gaaacgctgg tgaaagtaaa agatgctgaa gatcagttgg gtgcacgagt 7800  
 gggttacatc gaactggatc tcaacagcgg taagatcctt gagagttttc gccccgaaga 7860  
 acgttttcca atgatgagca cttttaagt tctgctatgt ggcgcggtat tatcccgat 7920  
 tgacgcggg caagagcaac tcggtcgccc catacactat tctcagaatg acttggttga 7980  
 gtactacca gtcacagaaa agcatcttac ggatggcatg acagtaagag aattatgcag 8040  
 tgctgccata accatgagtg ataacactgc ggccaactta cttctgacaa cgatcggagg 8100  
 accgaaggag ctaaccgctt ttttgacaaa catgggggat catgtaactc gccttgatcg 8160  
 ttgggaaccg gagctgaatg aagccatacc aaacgacgag cgtgacacca cgatgcctgt 8220  
 agcaatggca acaacgttgc gcaaactatt aactggcgaa ctacttactc tagcttcccg 8280  
 gcaacaatta atagactgga tggaggcggg taaagttgca ggaccacttc tgcgctcggc 8340  
 ccttccggct ggctggttta ttgctgataa atctggagcc ggtgagcgtg ggtctcggg 8400  
 tatcattgca gcactggggc cagatggtaa gccctcccgt atcgtagtta tctacacgac 8460  
 ggggagtcag gcaactatgg atgaacgaaa tagacagatc gctgagatag gtgcctcact 8520  
 gattaagcat tggttaactgt cagaccaagt ttactcatat atactttaga ttgatttaa 8580  
 acttcatttt taatttaaaa ggatctaggt gaagatcctt tttgataatc tcatgaccaa 8640  
 aatcccttaa cgtgagtttt cgttccactg agcgtcagac cccgtagaaa agatcaaagg 8700  
 atcttcttga gatccttttt ttctgcgctt aatctgctgc ttgcaaacia aaaaaccacc 8760  
 gctaccagcg gtggtttggt tgccgatca agagctacca actctttttc cgaaggtaac 8820  
 tggcttcagc agagcgcaga taccaaatac tgttcttcta gtgtagccgt agttaggcca 8880  
 ccacttcaag aactctgtag caccgcctac atacctcgtt ctgctaatec tgttaccagt 8940  
 ggctgctgcc agtggcgata agtcgtgtct tacggggtt gactcaagac gatagttacc 9000  
 ggataaggcg cagcggctcg gctgaacggg gggttcgtgc acacagocca gcttgagcg 9060  
 aacgacctac accgaactga gatacctaca gcgtgagcta tgagaaagcg ccacgcttcc 9120  
 cgaagggaga aagcgggaca ggtatccggt aagcggcagg gtcggaacag gagagcgcac 9180

ES 2 547 118 T3

gagggagctt ccaggggaa acgcctggta tctttatagt cctgtcgggt ttcgccacct 9240  
 ctgacttgag cgtcgathtt tgtgatgctc gtcagggggg cggagcctat ggaaaaacgc 9300  
 cagcaacgcg gcctttttac ggttcctggc cttttgctgg ccttttgctc acatgttctt 9360  
 tcttgcgta tcccctgatt ctgtggataa ccgtattacc gcctttgagt gagctgatac 9420  
 cgctcgcgcg agccgaacga ccgagcgcag cgagtcagtg agcgaggaag cggaagagcg 9480  
 cccaatacgc aaaccgcctc tccccgcgcg ttggccgatt cattaatgca gctggcacga 9540  
 caggtttccc gactggaaag cgggcagtga ggcgaacgca attaatgtga gttagctcac 9600  
 tcattaggca ccccaggett tacactttat gcttccggct cgtatgttgt gtggaattgt 9660  
 gagcggataa caatttcaca caggaaacag ctatgacat gattacgcca agcttgcctg 9720  
 cctgcagg 9728

5 <210> 22  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> cebador: Nia-N

<400> 22  
 atggcgactg tctactgaggt g 21

15 <210> 23  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> cebador: Nia-C

<400> 23  
 ttagaagaaa tgaaggtccg a 21

25 <210> 24  
 <211> 6416  
 <212> ADN  
 <213> *Aspergillus niger* var. *macrosporus*

30 <400> 24

tctagacgtc cactcactga ctactgactc ctgactgact agtagtcggc cgatgggacc 60  
 attttttttc ttccatcttt tctgtctcgc cccactgcg gcaaaaagct caacagtccc 120  
 aggcaatatt acttgctcaa taatccccga taccgatgaat acacgattaa tcacgggtcaa 180  
 ctggagactt cgtaatcctg ctgcatttaa tgggcaatta atcggcgggtg gagccctttg 240  
 gaaactaaag tggatctggc cgctgtcctc ctggggcttg ttttgccatt acagcacaaa 300



ES 2 547 118 T3

ttgtcactag	tatcgagttt	agtttagtga	gtctgcttgc	tgctcgggag	aggcttgttt	360
ccagtttttt	tttcatgcc	tggtttttta	tacttttttt	tttcgggacc	aggcttcaag	420
ttcccacatt	ccggtagga	atgttogaat	gagaagcccg	tgttctccct	gtctaccoga	480
caggaggaca	caccaggcca	tgactagacc	tgctggagag	tacggagtat	tactattaca	540
tatctctgct	tgtagttaa	ctcattgttc	gaatccaccg	gctcccggcg	aaatctctcc	600
ggccgaatgt	tggccctcac	tcacgccctc	cccccaaaa	tagatctcaa	accagggtgga	660
atacctcctg	tttcttctcc	gtggacttag	taccagatcc	cggccggttc	tggtcacacc	720
cogttgagct	aatccaaaag	cgggcagttt	tgagggttca	tctgtcatct	ggtttttgag	780
cgattaattt	tcccgtagct	aaccctgata	ttccccggat	gagtgtcttg	ctcctctcat	840
ctgccttctg	catgctctgt	atoggtccta	agctatactc	gtcttcatcc	ctgatattgt	900
ctcatgcctt	atttggcacc	tcgaggccat	tgaaccacat	aaacacatac	catggcgact	960
gtcactgagg	tgtgacaga	gcctttcacc	gctcaagggg	tcaccctcaa	gtcgggtccg	1020
atcaaggctc	accaggagga	gttgccctgcc	gtggaacttt	cagacattcc	tctgccgccc	1080
cogtcaaaaag	agccaaccga	ggtcctcagt	atagacaagc	caacccccga	ttatcatggt	1140
cogcgcgacc	ctgccttat	cagactgacc	ggtgttcata	ccttcaatgt	cgagcctcca	1200
ctcacggcgc	tgtacgacga	aggtactcaa	cgtctttcct	gccgccccgc	tctttttgaa	1260
ctcggcgcaa	acttccttgt	attcgtagcg	atgctcacct	gccaataggc	ttcttgactt	1320
ccccggaact	gttctatgtg	agaaatcatg	gcccggtacc	attggtgaag	gacgaagata	1380
tccccaatg	ggagattagc	atcgaagggt	aaggaatctc	gatttcctca	aacatcgcgt	1440
catcatctga	caatggatat	gcagcctggt	ggagaagccg	cttgtcctca	acttcgggga	1500
cattttgcag	caatacgatc	agatcacagc	accaatcact	ctcgtctgtg	cgggaaacag	1560
acggaaggag	cagaatgtgg	tcaggaagac	caaaggtttc	tcattggggtt	ctgocggcct	1620
gtcgacggct	ctctggactg	gcccaatgat	ggcagatata	ctacggagtg	cgaagccttt	1680
gaggaaagcc	aagtatgtct	gcatggaggg	agctgataag	ctggtaagtt	acottatcca	1740
tccatgcatg	cagtgccttg	acagtttgct	ttcagccaaa	cgggtattac	gggacatcga	1800
tcaaactcaa	ttgggccatg	gatcccaata	ggggaatcat	gctggccccc	aaaatgaatg	1860
gcgaggatct	cogtctgat	cacggccgtc	ccttgagggc	tgctgtaccc	ggccagatcg	1920
gtggccgaag	tgtcaaatgg	ctgaagaagc	tcattctcac	tgatgcgccc	agtgataact	1980
ggtaccacat	ctatgacaac	cgagtattac	cgtgagactt	gcctatccga	ccacaagagt	2040
acgttgtcta	actgttatcc	aggacaatgg	tttcgcctga	aatgtcgtcc	agtgacccaa	2100

ES 2 547 118 T3

cttggtggcg cgacgaccga tatgcgattt atgatcttaa cgtgaactct tctgttgat 2160  
 accccgagca taaggaggtg ctggatcttg cgtcggcagg cccgtcgtac aacgtgaaag 2220  
 gatatgccta tgcaggaggc ggtcggagga ttacgagagt cgaaatatct ttagacaaag 2280  
 gcaaatgtac gacgatcatt gcgcaaatgt gttgaggcag agctaacatg tttttagcct 2340  
 ggcgattggc caacatctca tatgccgaag acaagtatcg tgactttgaa ggggacttgt 2400  
 ttggtggtag agtggacatg tcctggcgcg agacttgttt ctgctggtgc ttctggtcgc 2460  
 tggatatcgc cattcctgag ctagaaaata cagatgccat tctcgtgcga gccatggatg 2520  
 aggcottggc tctccaacca cgcgatatgt attggtctgt tctgggcatg atgaacaatc 2580  
 cttggttccg ggtcaccatc acgaaggaga acgggactct caggttcag caccacaacag 2640  
 atcctactgg gcccgcgga tggatggagc gcgtcaaaaa ggccgggggt gatctggtca 2700  
 atggttactg gggagaacga caagcaggag aggaaccgac agagcctgag cctgagaagg 2760  
 agatcaacat gaagaaagag ggcgtgaacc ggattatcga ccttcaagaa ttcaagaaga 2820  
 actcaagcga tgagaagccc tggttcatcg tgaacgggtga agtgtacgac ggcacggcat 2880  
 tcctggaggg ccatccggga ggagctcaga gtatcatctc gtctgctggc atcgacgttt 2940  
 ctgaggaatt tttggcaatc cgtacgtcct agggaccttc gaacaatgga aattagaatg 3000  
 ctgacacacc cacagatagc gaaacagcca aagccatgat gcccgattac catatcggaa 3060  
 ccatggataa ggcgtccttg gaagcgtca agaacgacaa cgcaccacaa tcggatgaac 3120  
 ctcgtgcaac attccttcag tcgaaatcat ggacaaaggc aacacttgta aagaggacgg 3180  
 acgtgtcctg ggacacgagg attttactt tccagctcca acacgacaaa caaacctgg 3240  
 gtctgccc at tggccagcat ctcatgatca aggtcgccga ccctaccagc aaagaagtca 3300  
 tcatecgtc atacaccct atctcggata ccaaccagga aggaccatg gacctgctgg 3360  
 tcaagatcta cttcgacacg cccacagtca aaggtggcaa gatgaccatg gccttagaga 3420  
 agctcgcgtt gggatcagaa atcgactgca aggtcccac tggtaggttt gactaccttg 3480  
 ggaacggcaa gatcttggtg agcgggaaag agcgccatgt tagttctttt aagatgattt 3540  
 gcggtggaac tggatcacg ccaatcttc aagtgtacg tgcggtgatg caggacaagc 3600  
 aggacctac gtcatgcgtg gtcctggatg gcaatagaca ggaagaggac atcctctgcc 3660  
 gcgccgatct ggacgcctat gaagcgttgg atagcaagaa gtgtaagggtg gtacacactt 3720  
 taaccaaggc tcggacagt tggactggac gccgtggacg tatatcagaa gacctgctga 3780  
 aggagcacgc cattcccgat ggcaagagca tgggtgcttat ctgtggtcca gaggccatgg 3840  
 aaaagtccgc caggaagatc cttctggagc aaggatgggc ggagtcggac cttcatttct 3900  
 tctaagggaa gcgcctctc agtactggaa atagccttcg tcactagtat aggaagacga 3960

ES 2 547 118 T3

cattgttaga tgtatataag aacgctaatt ccacaagaaa tatgtacgaa ctgtgatggt 4020  
tttcaaattt gaaggctaaa attgggctcg aagtgcgcct gcaatatgcg cgagtcagac 4080  
gtaggatcgt ctaccagtgt cagaatcgtc tcattcgttt actcacgtca gtcatttaag 4140  
acaagtagtc ggtcctgctt tataaggaaa gcgactgtca actaaatggc gtcgcactat 4200  
agtcacttca tctccaaaac ggccacacgg agacagtcgc tggcgctttt ctggatgtaa 4260  
atgctatacc cgacgtttca aagaaccttg gacacgttct ataccgcgta agcagogaat 4320  
agaggtagaa gttttgtttc actcatccga cgactgacag gttcaacgtc gtggcgca 4380  
ccaagattcc attcagcggg gagcgagcgt agggaatcct togaagatat aacggaggtt 4440  
tcgtacgttc atcgtacttt attctaaaac aattccctgc cgtatttctg aatcgcactc 4500  
gaaaaggcac ttgaagcaat tcgcaatccg acctattaa tgacgtcttt cagcatatgg 4560  
ttagtagtat ggagcagaca acttctccca cggcaacagc ttcaatggat gcaggaaccg 4620  
ccagataaac ctgtcaatca tccacagatc atgaccatac agcggggccaa cagtggagtc 4680  
tcccgatttc atcgtttctta ctogaacaca gccacccaaa acctcgtggg aatctcaagt 4740  
gacaaccacc agacgacgcg ttggcagcgc gagatcacgc ctcaactaac ccgaaccaga 4800  
ctagtgcctc tccccgtcca acgcccggac caccgcttgt tcgggaaacc gaagcggcag 4860  
gaattcgcg cggttcaacc aaccgcggg cgagagctct cccctcgc cectcagaaa 4920  
taacattatt taccttatcc acctctacac acaaagtctc tctttacgca ccaatcaatc 4980  
gccatgccc cgcgcaagaa agccaaactt acccccaaaa gcgagaatgc cgagccgtcc 5040  
gcaagcacca ctgaccagcc aacaaccgcg gattacgacc cagtgcagaga tccctggacg 5100  
gacgagcaag agaccgcggt attgaagggg attataaaat ggaagcctgt cggtagctg 5160  
accgcaacc ttctccccgc gcgcgaggg gaaacactat catcggagca gtgtgacgct 5220  
aacgcggccc tctttctctt tcaaaaggca tgcacaagca cttccgtatg atcgcgattt 5280  
cggagttcat gaaaagccaa ggctatgcmc ccgcgcacgc agaacacaca cggataccgg 5340  
ggatattgaa gaagctgggg acattataca atcttcggc tttggatgaa cgggtgggtt 5400  
gatgccctct ctcatccatg gagattacgt cctttggatt ctggctcgtg ctaacattca 5460  
tctaataatta cggaatgagc aggaagattc attgataaca gacaccgcg aggactcaaa 5520  
ggaattctac tgcccgttcg aattaccca ggatgaatac ggagaattga tgttcgaacg 5580  
gcggctggcg atggaaggaa ccgcatctcc tgatcctagc acgcatgccc gatcggagg 5640  
ggggagcacg gtggctgata cggacgggtc gtatataata tctctgcctt ggttgctaac 5700  
tggttgttgg ggaaagcgtc ctaatcgcaa tcgattcctc tcatacagaa cctcgtctct 5760

# ES 2 547 118 T3

ccccgcgcc atcacgagga cggaagtcag gtcgtggcgg gcgtccagcg ggacgagggga	5820
cgcgttcgtc gcgtcttcat gtggaggtcg aaccgccggc gaagggatcc ggagctgcgg	5880
aggaagaagc ggattctggc gaggagacag gcgcaaatga agaaggcgat gaagatggtt	5940
cggacgctgc gaaggatgat agtgaggtcg atgaggaagc ggaggggggc tcgcctacga	6000
cgcgaagtac gcgtgccag acatcgagga cgaagcagaa gggcagaggt acagcaggca	6060
cgggaactcg gaggggtcga cggcgtcagc cttgatattg atatgtgctt tctgctgacg	6120
ttcgttggct ctgtctgtaa caatacgtc gctaatgata ccttgggaga aatagggcgtt	6180
ttggtggggc tttgtttgta tgattacttt tctccttctt tgttctacca tccattgttc	6240
ttttgccgga cggtagccta tgcatactcc gttgatcaag ccattggctt gtatctttct	6300
atctccaacg acgacagttg gagaatagga aatccgagat aggaagtaaa acaacataga	6360
tggcatctaa atacatggga gcacatacaa tagatcacta catatttggg tctaga	6416

**REIVINDICACIONES**

1. Una proteína seleccionada del grupo que consiste en:
- 5 (i) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos 1-692 de la SEC ID N°: 2;
- (ii) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos en la que se eliminaron, sustituyeron o añadieron de 1 a 50 aminoácidos de la secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos 1-692 de la SEC ID N°: 2, y que tiene una actividad catalasa termoestable; y
- 10 (iii) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad del 80 % o más con la que consiste en los aminoácidos 1-692 de la SEC ID N°: 2, y que tiene una actividad catalasa termoestable.
2. Un ADN seleccionado del grupo que consiste en:
- (i) un ADN que codifica la proteína según la reivindicación 1; y
- (ii) un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos 1-2403 de la SEC ID N°: 1.
- 15 3. El ADN según la reivindicación 2, en el que se escinde del ADN una secuencia intrónica.
4. El ADN según la reivindicación 3, en el que la secuencia intrónica es una o más secuencias seleccionadas de la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos 322-372, 599-651, 1068-1113 o 1279-1326 de la SEC ID N°: 1.
- 20 5. El ADN según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en el que del ADN se escinde una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia señal.
6. El ADN según la reivindicación 5, en el que la secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia señal es la que consiste en los nucleótidos 1-126 de la SEC ID N°: 1.
7. Un vector de expresión que comprende el ADN según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6.
8. Un microorganismo huésped que comprende el vector de expresión según la reivindicación 7.
- 25

Figura 1

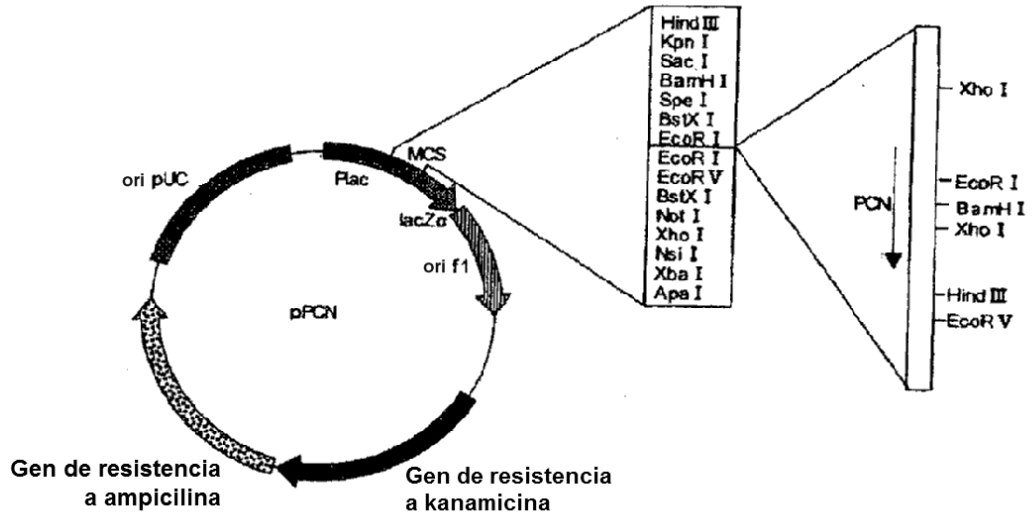


Figura 2

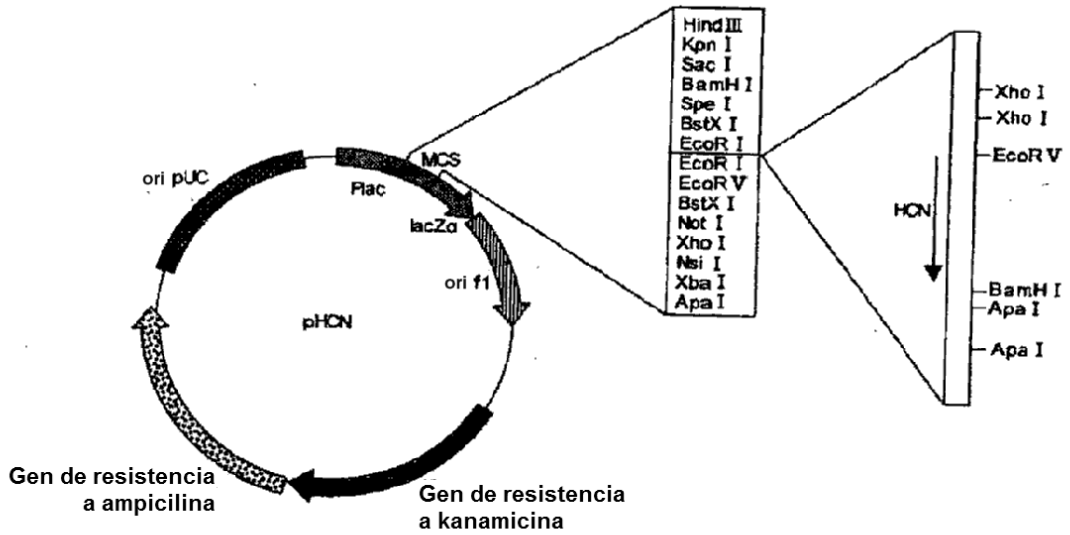


Figura 3

