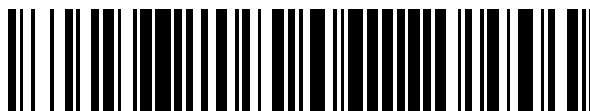


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 547 857**

51 Int. Cl.:

C12N 9/44 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.08.2007** **E 07837179 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.04.2015** **EP 2054512**

54 Título: **Variantes de pululanasa con productividad aumentada**

30 Prioridad:

23.08.2006 US 839735 P

23.02.2007 US 903247 P

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

09.10.2015

73 Titular/es:

DANISCO US INC. (100.0%)
925 Page Mill Road
Palo Alto, California 94304, US

72 Inventor/es:

ENGLAND, GEORGE;
KOLKMAN, MARC;
MILLER, BRIAN S. y
VROEMEN, CASPER

74 Agente/Representante:

RIZZO, Sergio

ES 2 547 857 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

Variantes de pululanasa con productividad aumentada

5 **Campo de la invención**

[0001] La invención hace referencia a variantes innovadoras de la pululanasa de péptidos enzimática, las secuencias de genes que codifican dichos péptidos innovadores, vectores de expresión que comprenden esas secuencias de genes así como organismos que expresan las variantes de pululanasa innovadoras. Además, la invención hace referencia al uso de estos péptidos de pululanasa innovadores en el textil, la fermentación, la alimentación y otras industrias.

Antecedentes de la invención

15 [0002] Las pululanastas son enzimas que se han hallado útiles en numerosas aplicaciones industriales, especialmente en las industrias de la alimentación y las bebidas. Las pululanastas son enzimas desramificantes de almidón y son eficaces en la desramificación de hidrolizados de almidón (útiles en la masa de acondicionamiento), la desramificación de los dextranos límite β (útiles en la producción de cervezas y de cervezas tipo ale) y en la producción de jarabes de azúcar a partir de maíz, patata, trigo, yuca y arroz, por ejemplo. Las pululanastas son enzimas clasificadas en EC 3.2.1.41 y tales enzimas se caracterizan por su capacidad de hidrolizar los enlaces glucosídicos α -1,6 en, por ejemplo, amilopectina y pululano.

25 [0003] Las pululanastas son el producto de bacterias, especialmente del género *Bacillus*. La producción de pululanastas para uso industrial no está libre de problemas. Las pululanastas se degradan rápidamente mediante diferentes proteasas también producidas por las bacterias, lo que hace que la recuperación de grandes cantidades de pululanasa sea ineficaz y cara. Diferentes personas en el campo han diseñado métodos para aumentar la producción limitando la degradación de pululanasa en el cultivo. Por ejemplo, se ha mostrado previamente que la delección de los genes AprL y Mpr (que expresaban proteasas) de una cepa de producción de pululanastas era necesaria para la expresión económica de pululanasa activa. Aun así, el tiempo de fermentación está limitado a 30 51-60 horas para limitar la degradación proteolítica y la pérdida de actividad del producto de pululanasa. Svendsen ha diseñado variantes de pululanasa que modifican la conformación tridimensional de la enzima para aumentar la estabilidad térmica de la enzima o para cambiar la forma en la que la enzima degrada su sustrato (véanse, las patentes estadounidenses 6.350.599 y 6.838.257, así como la solicitud estadounidense n° 2004/0082028).

35 [0004] Más recientemente, se ha demostrado que el tiempo de degradación de la pululanasa se determinaba con el siguiente resultado: entre 30 y 50 horas se observó un recorte parcial de la molécula de pululanasa de longitud completa en moléculas truncadas que carecían de los aminoácidos N-terminal 98 y 102, respectivamente. El recorte tuvo lugar en el N-terminal de residuos de ácido glutámico E99 y E103, respectivamente y podía visualizarse mediante HPLC. Sorprendentemente, las moléculas de pululanasa truncadas 1-98 y 1-102 retienen actividad de pululanasa y, lo que es más sorprendente, se ha demostrado que esta actividad es superior a la de la pululanasa de longitud completa. Después de 51 horas, una degradación adicional de moléculas de pululanasa tuvo como resultado una caída de la actividad que abolía finalmente toda actividad.

45 [0005] Aun así, queda espacio para la mejora del diseño de péptidos de pululanasa y las secuencias de nucleótidos que los codifican. Por lo tanto, lo que se necesita son compuestos y métodos para una producción de pululanasa más eficaz mediante, por ejemplo, la limitación de la degradación proteolítica, el aumento de los títulos de fermentación o el aumento de la actividad de pululanasa.

Sumario de la invención

50 [0006] La presente invención hace referencia a formas nuevas y no evidentes de pululanasa, una enzima péptido. Las pululanastas de la presente invención comprenden modificaciones innovadoras que tienen como resultado un rendimiento superior con respecto a los títulos de producción y/o a la degradación que soporta (p. ej., degradación enzimática mediante proteinasas) y/o son más activos en la descomposición de materiales de sustrato objetivo que los péptidos precursores ("tipo silvestre").

60 [0007] En este sentido, la presente invención hace referencia a las pululanastas de SEQ ID NO:4 y SEQ ID NO:6, tal y como se muestra en las figuras 8(b) y 9(b), respectivamente. La presente invención también hace referencia a las secuencias de nucleótidos que codifican secuencias de aminoácidos SEQ ID NO:4 y 6. Las respectivas secuencias de nucleótidos también se muestran en las figuras 8(a) y 9(a) como SEQ ID NO:3 y 5, respectivamente. Tal y como se conoce en la técnica, el código genético es redundante con múltiples codones de nucleótidos que codifican el mismo aminoácido. Por lo tanto, la presente invención hace referencia de forma adicional a cualquier secuencia de nucleótidos alternativa que codifica los péptidos de SEQ ID NO:4 y 6. Un experto en la técnica es capaz de determinar las secuencias de nucleótidos que codifican las secuencias de péptidos de la presente invención según la información dada a conocer en la memoria y el conocimiento en la técnica.

[0008] La presente invención hace referencia a construcciones de expresión que codifican los péptidos de la presente invención. La presente invención no está limitada a ninguna construcción de expresión específica siempre que sea capaz de la expresión de los péptidos de la presente invención. En este sentido, los ejemplos no limitativos de construcciones de expresión adecuadas se muestran de forma esquemática en la parte (a) de las figuras 4-6.

[0009] Tal y como se explica con más detalle en las secciones de Descripción Detallada y en los Ejemplos de la presente memoria, la secuencia que codifica el péptido de pululanasa precursor (de *Bacillus deramificans*) se modificó mediante técnicas de optimización de codones para producir una secuencia de nucleótidos con codón optimizado [SEQ ID NO:1] que codifica una copia de la secuencia de aminoácidos de pululanasa de tipo silvestre (es decir, precursora) [SEQ ID NO:2]. La secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos [SEQ ID NO:2] se clonó con dos orientaciones en el sitio *XhoI* del vector de integración de *B. licheniformis* pICatH que crea las versiones Ori1 (pICatH-PUL-Ori1) y Ori2 (pICatH-PUL-Ori2) de la construcción de expresión.

[0010] La secuencia que codifica el péptido de pululanasa precursor se modificó para producir un péptido de pululanasa a partir del cual se han eliminado 104 aminoácidos de N-terminal. La secuencia de nucleótidos que codifica esta pululanasa innovadora también se optimizó de codón en una forma de realización, [SEQ ID NO:3]. El péptido expresado mediante esta construcción, PULm104, se proporciona en SEQ ID NO:4 (véase, Figura 8(b)). La secuencia de nucleótidos que codifica [SEQ ID NO:4] se clonó con dos orientaciones en el sitio *XhoI* del vector de integración de *B. licheniformis* pICatH creando las versiones Ori1 (pICatH-PULm104-Ori1) y Ori2 (pICatH-PUL-Ori2) de la construcción de expresión.

[0011] En otra forma de realización, la secuencia que codifica el péptido de pululanasa precursor se modificó para reemplazar los residuos de aminoácidos en las posiciones 99 y 103 del ácido glutámico (E) a glutamina (Q) con el fin de hacer que el péptido fuera más resistente a la degradación proteolítica en estas posiciones. La secuencia de nucleótidos que codifica esta pululanasa innovadora también se optimizó de codón en una forma de realización, [SEQ ID NO:5]. El péptido expresado mediante esta secuencia de ácido nucleico, PUL_E99Q_E103Q, se proporciona en SEQ ID NO:6. La secuencia de nucleótidos que codifica [SEQ ID NO:6] se clonó con dos orientaciones en el sitio *XhoI* del vector de integración de *B. licheniformis* pICatH creando las versiones Ori1 (pICatH-PUL_E99Q_E103Q-Ori1) y Ori2 (pICatH-PUL_E99Q_E103Q-Ori2) de la construcción de expresión.

[0012] La presente invención también hace referencia a la transfección de la construcción de expresión de la presente invención en organismos huésped adecuados. La presente invención no está limitada a ningún organismo huésped específico. El organismo huésped puede ser, por ejemplo, un microorganismo, un cultivo de tejido o célula eucariota, un cultivo de tejido o célula vegetal o un cultivo de tejido o célula fúngica. En una forma de realización preferida, el organismo huésped en un microorganismo. Los organismos huéspedes preferidos incluyen, sin carácter limitativo, *Bacillus* sp. (esp., *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis* y *B. deramificans*), *Escherichia coli*, *Trichoderma reesei*, *Saccharomyces cerevisiae* o *Aspergillus niger*. En una forma de realización preferida, el organismo huésped es *B. licheniformis*.

[0013] La presente invención hace referencia al aislamiento y purificación de los péptidos de la presente invención del medio en el que se cultivan los organismos huéspedes de la presente invención. En este sentido, la presente invención no está limitada a ninguna técnica de aislamiento y purificación específica siempre que tenga como resultado una pureza mínima del 10 %. En una forma de realización preferida, la pureza mínima del péptido aislado y purificado es 25 %, en una forma de realización más preferida, la pureza mínima del péptido aislado y purificado es 50 %. En una forma de realización más preferida aún, la pureza mínima del péptido aislado y purificado es 75 %. En la forma de realización más preferida, la pureza mínima del péptido aislado y purificado de la presente invención es 90 %. Las purezas mínimas pueden medirse mediante porcentaje del peso seco total u otros medios adecuados conocidos en la técnica.

[0014] La presente invención no está limitada a ningún medio de purificación específico de aislamiento y purificación de los péptidos de la presente invención. Cualquier medio de purificación de péptidos conocido en la técnica es adecuado. Entre los ejemplos sin carácter limitativo de medios de purificación adecuados se incluyen cromatografía por afinidad, precipitación, cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía de capa fina, electroforesis, filtración por tamaño, etc.

[0015] Se pretende que un "fragmento biológicamente activo" incluya cualquier análogo, mimético, truncamiento, delección y/o sustitución de las secuencias de la presente invención. Los peptidomiméticos de las pululanases y los dominios activos de las pululanases de la presente invención pueden diseñarse de forma computacional utilizando datos estructurales, tal y como se conoce en la técnica. De forma adicional, se contempla que se puedan generar análogos y mutaciones de las secuencias de nucleótidos de las pululanases de la presente invención mediante evolución molecular dirigida. Las técnicas de evolución molecular dirigida son conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, la patente estadounidense nº 5.605.793 concedida a Stemmer, *et al.* o la patente estadounidense nº 6.537.776 concedida a Short). Las proteínas generadas mediante evolución molecular dirigida presentarán una capacidad menor, superior o igual para funcionar como una pululanasa en comparación con los péptidos de la

presente invención.

[0016] También se expone una composición que incluye uno o más péptidos de pululanasa (o un ácido nucleico que lo codifica) y uno o más componentes adicionales, p. ej., un portador, diluyente o solvente. El componente adicional puede ser uno que haga que la composición sea útil para un uso *in vitro*, *in vivo*, farmacéutico o veterinario.

[0017] En otro aspecto, la invención proporciona un ácido nucleico sustancialmente puro que presenta o comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido, cuya secuencia de aminoácidos incluye, o es, la secuencia de un péptido de pululanasa de la presente invención.

[0018] En formas de realización preferidas, el ácido nucleico de pululanasa en cuestión incluirá una secuencia reguladora transcripcional, p. ej., al menos uno de entre un promotor transcripcional o una secuencia potenciadora transcripcional, unida de forma operativa a la secuencia de genes de pululanasa, p. ej., con el fin de hacer que la secuencia de genes de pululanasa sea adecuada para utilizarse como vector de expresión.

[0019] También se expone un ácido nucleico que se hibrida bajo condiciones astringentes a una sonda de ácido nucleico correspondiente a al menos 12 nucleótidos consecutivos de SEQ ID NO:3 o 5, más preferiblemente a al menos 20 nucleótidos consecutivos de SEQ ID NO:3 o 5.

[0020] Otro aspecto de la presente invención proporciona aplicaciones de la pululanasa descrita en el presente documento en una variedad de entornos industriales. Por ejemplo, la presente invención expone el uso de las variantes de pululanasa innovadoras de la invención en la producción de productos alimenticios (incluidos, sin carácter limitativo, diferentes masas y siropes), bebidas (incluidas, sin carácter limitativo, diferentes bebidas fermentadas tal como cervezas y cervezas tipo ale), bioetanol y numerosos productos conocidos por aquellos expertos en la técnica.

Breve descripción de los dibujos

[0021]

La figura 1 muestra una representación esquemática del proceso de pululanasa actual y las variantes de pululanasa diseñadas en el presente proyecto.

La figura 2 muestra la arquitectura molecular de las construcciones presentes en las cepas de expresión de pululanasa realizadas en la invención actual, en comparación con la construcción de expresión de pululanasa en la cepa BMP 139.

La figura 3 muestra una representación esquemática del vector pICatH. El vector pICatH contiene un origen de replicación sensible a la temperatura (ori pE194, para la replicación en *Bacillus*), ori pBR322 (para amplificación en *E. coli*), un gen de resistencia a la neomicina para la selección y el gen de resistencia al cloranfenicol de *B. licheniformis* natural (cat) con repeticiones para la selección, integración cromosómica y la amplificación de casete.

La figura 4 muestra una representación esquemática de la construcción pICatH-PUL Ori1. La figura 5 muestra una representación esquemática de la construcción pICatH-PULm104Ori1.

La figura 6 muestra una representación esquemática de la construcción pICatH-PUL_E99Q_E103Q.

Las figuras 7A-B muestran (a) la secuencia de ácido nucleico [SEQ ID NO:1] y (b) la secuencia de aminoácidos [SEQ ID NO:2] de la pululanasa "de tipo silvestre" optimizada de codón (PUL).

Las figuras 8A-B muestran (a) la secuencia de ácido nucleico [SEQ ID NO:3] y (b) la secuencia de aminoácidos [SEQ ID NO:4] de la pululanasa PULm104.

Las figuras 9A-B muestran (a) la secuencia de ácido nucleico [SEQ ID NO:5] y (b) la secuencia de aminoácidos [SEQ ID NO:6] de la pululanasa PUL_E99Q_E103Q.

Sección de definiciones

[0022] Cabe destacar que, tal y como se utiliza en la presente memoria y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el", "la" incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a una composición que contiene "un compuesto" incluye una mezcla de dos o más compuestos. Cabe también destacar que el término "o" se emplea generalmente con su sentido incluyendo "y/o" a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

[0023] El término "pululanasa" hace referencia a una tipo específico de glucanasa, una endoenzima amilolítica que degrada el pululano. Se produce como, por ejemplo, una lipoproteína anclada a la superficie celular, extracelular mediante bacterias gram negativas del género *Klebsiella*. Sin embargo, las bacterias gram positivas producen pululanastas como proteínas secretadas. Las pululanastas del tipo I atacan específicamente enlaces α -1,6, mientras que las pululanastas del tipo II también son capaces de hidrolizar enlaces α -1,4. También es producida por otras bacterias y arqueobacterias. La pululanasa se utiliza como detergente en biotecnología. La pululanasa (EC 3.2.1.41) también conocida como pululano-6-glucanohidrolasa (enzima desramificante). El pululano se

considera como una cadena de unidades de maltotriosa enlazadas mediante enlaces glucosídicos α -1,6. La pululanasa divide de forma hidrolítica polisacáridos pululano α -glucano).

[0024] El término "optimización de codones" hace referencia a técnicas para mejorar los niveles de expresión mediante el reemplazo de codones de nucleótidos en una secuencia de codificación con codones que codifican el mismo aminoácido pero son procesados de forma más eficaz por el organismo huésped. La preferencia de codones entre las diferentes especies podría ser radicalmente diferente. Con el fin de mejorar el nivel de expresión de una proteína extraña en un sistema de expresión específico (bacterias, hongos, levadura, insecto, células de mamíferos o vegetales), es muy importante regular la frecuencia del codón de la proteína extraña para que coincida con el sistema de expresión huésped. Un ejemplo clásico es GFP (proteína verde fluorescente), por sus siglas en inglés, que se optimiza para conseguir una expresión de alto nivel en células de mamíferos. Por lo tanto, la optimización de codones puede utilizarse para expresar las proteínas de la presente invención con una amplia variedad de organismos huésped donde tales secuencias podrían no expresarse de forma eficaz o no expresarse en general.

[0025] El término "vector de expresión" tal y como se emplea en el presente documento hace referencia a una molécula de ADN recombinante que contiene una secuencia de codificación deseada y las secuencias de ácido nucleico adecuadas necesarias para la expresión de la secuencia de codificación unida de forma operativa en un organismo huésped específico. Las secuencias de ácido nucleico necesarias para la expresión en procariotas incluyen un promotor, una secuencia operadora de forma opcional, un sitio de unión de ribosomas y probablemente otras secuencias.

[0026] Un "promotor heterólogo", de acuerdo con el presente documento, es un promotor que no se encuentra asociado de forma natural a un gen o a un ácido nucleico purificado. El término "promotor", "elemento promotor" o "secuencia promotora" de acuerdo con el presente documento, hace referencia a una secuencia de ADN que cuando se liga a una secuencia de nucleótidos de interés es capaz de controlar la transcripción de la secuencia de nucleótidos de interés en ARNm. Normalmente, aunque no necesariamente, se ubica un promotor en 5' (es decir, secuencia arriba) de una secuencia de nucleótidos de interés cuya transcripción en ARNm controla y proporciona un sitio para un enlace específico mediante ARN polimerasa y otros factores de transcripción para el inicio de la transcripción.

[0027] El término "específico del tipo de célula" o "específico del organismo huésped" o términos equivalentes según se aplican a un elemento regulador hacen referencia a un elemento regulador que es capaz de dirigir la expresión selectiva de una secuencia de nucleótidos de interés en un tipo específico de célula u organismo en ausencia relativa de expresión de la misma secuencia de nucleótidos de interés en un tipo diferente de célula u organismos dentro del mismo tejido. Cuando se aplica el término "específico del tipo de célula" o "específico del organismo huésped" a un elemento regulador también indica un elemento regulador capaz de fomentar la expresión selectiva de una secuencia de nucleótidos de interés en una región dentro de un tejido u organismo único, respectivamente.

[0028] Una "preparación sustancialmente pura", "preparación purificada" o "aislada" de un polipéptido, de acuerdo con el presente documento, indica un polipéptido que se ha identificado y separado de al menos un contaminante con el que está asociado normalmente en su estado natural, o cuando se ha obtenido de su fuente actual. El al menos un otro contaminante puede ser, por ejemplo, otras proteínas, lípidos y ácidos nucleicos con las que se da normalmente de forma natural. Preferiblemente, el polipéptido también se separa de sustancias, p. ej., anticuerpos o matriz de gel, p. ej., poliacrilamida, que se utilizan para purificarlo. Preferiblemente, el polipéptido constituye al menos 10, 20, 50, 70, 80 o 95 % de peso en seco de la preparación purificada. Preferiblemente, la preparación contiene: un polipéptido suficiente con el fin de permitir la secuenciación de proteína; al menos 1, 10 o 100 mg del polipéptido; al menos 1, 10 o 100 mg del polipéptido.

[0029] Una "preparación purificada de células", de acuerdo con el presente documento, hace referencia, en el caso de células animales o vegetales, a una preparación *in vitro* de células y no a una planta o animal intacto completo. En el caso de células cultivadas o células microbianas, consiste en una preparación de al menos 10 % y más preferiblemente 50 % de las células en cuestión.

[0030] Un "ácido nucleico sustancialmente puro", p. ej., un ADN sustancialmente puro, es un ácido nucleico que está uno o ambos de entre: no inmediatamente contiguo con tanto una como ambas secuencias, p. ej., secuencias de codificación, con las que está inmediatamente contiguo (es decir, uno en el extremo 5' y otro en el extremo 3') en el genoma que se da de forma natural del organismo a partir del cual se deriva el ácido nucleico; o que está sustancialmente libre de una secuencia de ácido nucleico con la que se da en el organismo del cual se deriva el ácido nucleico. El término incluye, por ejemplo, un ADN recombinante que se incorpora en un vector, p. ej., en un virus o plásmido que se replica de forma autónoma, o en el ADN genómico de una procariota o eucariota, o que existe como molécula separada (p. ej., un ADNc o un fragmento de ADN genómico producido por PCR o tratamiento con endonucleasas de restricción) independiente de otras secuencias de ADN. Adicionalmente, el término "aislado" cuando se utiliza con respecto a un ácido nucleico, como en "secuencia de ácido nucleico aislada" hace referencia a una secuencia de ácido nucleico que se identifica y separa de al menos un ácido nucleico

contaminante con el que está asociado de forma ordinaria en su estado natural, o cuando se obtiene de su fuente real. El ácido nucleico aislado es ácido nucleico presente en una forma o configuración que es diferente de la cual se encuentra en la naturaleza. Por el contrario, ácidos nucleicos no aislados son ácidos nucleicos tales como ADN y ARN que se encuentran en el estado en el que existen en la naturaleza. Por ejemplo, una secuencia de ADN determinada (p. ej., un gen) se encuentra en el cromosoma de la célula huésped próximo a los genes vecinos; las secuencias de ARN, tales como una secuencia de ARNm específica que codifica una proteína específica, se encuentran en la célula como una mezcla con numerosos ARNm diferentes que codifican una multitud de proteínas. Sin embargo, una secuencia de ácido nucleico aislada que comprende, por ejemplo, SEQ ID NO:1 incluye, a modo de ejemplo, tales secuencias de ácido nucleico en células que normalmente contienen SEQ ID NO:1 donde la secuencia de ácido nucleico se encuentra en una ubicación cromosómica o extracromosómica diferente de la de las células naturales, o se encuentra flanqueada de forma diferente por una secuencia de ácido nucleico diferente a la que se encuentra en la naturaleza. La secuencia de ácido nucleico aislada puede estar presente en forma monocatenaria o bicatenaria. Cuando una secuencia de ácido nucleico aislada ha de utilizarse para expresar una proteína, la secuencia de ácido nucleico contendrá (como mínimo) al menos una parte de la hebra de codificación o sentido (es decir, la secuencia de ácido nucleico puede ser monocatenaria). De forma alternativa, puede contener las hebras sentido y antisentido (es decir, la secuencia de ácido nucleico puede ser bicatenaria).

[0031] "Homólogo", de acuerdo con la presente memoria, hace referencia a la similaridad de secuencia entre las moléculas de polipéptidos o entre dos moléculas de ácido nucleico. Cuando una posición en ambas secuencias comparadas es ocupada por la misma base o subunidad monómera de aminoácido, p. ej., si una posición en cada una de las dos moléculas de ADN es ocupada por adenina, entonces las moléculas son homólogas en esa posición. El porcentaje de homología entre dos secuencias es una función del número de posiciones homólogas o coincidentes compartidas por las dos secuencias dividido por el número de posiciones comparadas x 100. Por ejemplo, si 6 de 10 de las posiciones en dos secuencias son homólogas o coinciden entonces las dos secuencias son 60 % homólogas. A modo de ejemplo, las secuencias de ADN ATTGCC y TATGGC comparten un 50 % homología. Generalmente, se realiza una comparación cuando se alinean dos secuencias para proporcionar una homología máxima.

[0032] Los términos "péptido(s)", "proteína(s)" y "polipéptido(s)" se utilizan indistintamente en el presente documento.

[0033] El término "proteasa" indica un dominio de polipéptidos o proteínas de un polipéptido o proteína derivado de un microorganismo, p. ej., un hongo, bacteria o de un animal o planta, y que presenta la capacidad de catalizar la escisión de enlaces péptidos en una o más de las diferentes posiciones de una cadena principal proteica.

[0034] Preferiblemente, las proteínas de pululanasa de acuerdo con la presente invención se aíslan y se purifican. Mediante purificación o aislamiento se indica que se modifica el estado natural de la proteína de pululanasa mediante la separación de la pululanasa de algunos o todos los constituyentes que se dan de forma natural con los que se asocia en la naturaleza. Dicho aislamiento o purificación puede conseguirse mediante técnicas de separación reconocidas en la técnica tal como cromatografía de intercambio de iones, cromatografía por afinidad, separación hidrofóbica, diálisis, tratamiento de proteasa, precipitación de sulfato de amonio u otra precipitación de sales de proteínas, centrifugación, cromatografía de exclusión por tamaño, filtración, microfiltración, electroforesis en gel o separación sobre un gradiente con el fin de eliminar todas las células, restos celulares, impurezas, proteínas externas o enzimas no deseadas en la composición final. A continuación, se pueden añadir además constituyentes a la composición que contiene la pululanasa que proporcionan beneficios adicionales, por ejemplo, agentes activadores, agentes antiinhibición, iones deseados, compuestos para controlar el pH u otras enzimas. Preferiblemente, las proteínas de pululanasa de acuerdo con la presente invención se producen mediante métodos recombinantes.

[0035] "Microorganismo" hace referencia en el presente documento a una bacteria, un hongo, un virus, un protozoo u otros microbios u organismos microscópicos. En la presente invención, los microorganismos se utilizan como organismos huésped para la expresión de péptidos exógenos.

[0036] Una "secuencia natural" de pululanasa o una secuencia "de tipo silvestre" de pululanasa incluye, de acuerdo con el presente documento, un polipéptido con la misma secuencia de aminoácidos que una pululanasa derivada de la cepa precursora de la naturaleza o la misma secuencia de aminoácidos que la pululanasa a partir de la cual se realiza la pululanasa derivada o modificada, p. ej., la pululanasa expresada por la cepa precursora *B. deramificans* (BMP139) de la presente invención. Tal pululanasa de secuencia natural puede aislarse de la naturaleza o puede producirse mediante medios sintéticos o recombinantes. El término pululanasa "de tipo silvestre" o "de secuencia natural", en una forma de realización, hace referencia al péptido de pululanasa del cual se derivan las variantes de la presente invención y se encuentra en la figura 7b como SEQ ID NO:2.

[0037] De acuerdo con el presente documento, "porcentaje (%) de identidad de secuencia" con respecto a las secuencias de aminoácidos o nucleótidos identificadas en el presente documento se define como el porcentaje de residuos de aminoácidos o nucleótidos en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos de

aminoácidos o nucleótidos en una secuencia de pululanasa, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si fuera necesario, para conseguir el máximo porcentaje de identidad de secuencia y sin considerar ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. Los métodos para llevar a cabo el alineamiento de secuencias y determinar la identidad de secuencia son conocidos para los expertos en la técnica, pueden llevarse a cabo sin experimentación indebida y los cálculos de valores de identidad pueden obtenerse con concisión. Véase, por ejemplo, Ausubel, *et al.*, eds. (1995) *Current Protocols in Molecular Biology*, Capítulo 19 (Greene Publishing and Wiley-Interscience, Nueva York); y el programa ALIGN (Dayhoff (1978) en *Atlas of Protein Sequence and Structure* 5:Suppl. 3 (National Biomedical Research Foundation, Washington, D.C.). Existe un número de algoritmos disponibles para alinear secuencias y determinar la identidad de secuencia e incluyen, por ejemplo, el algoritmo de alineamiento de homología de Needleman *et al.* (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443; el algoritmo de homología local de Smith, *et al.* (1981) *Adv. Appl. Math.* 2:482; el método de la búsqueda de similitud de Pearson, *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85:2444; el algoritmo Smith-Waterman (*Meth. Mol. Biol.* 70:173-187 (1997); y los algoritmos BLASTP, BLASTN y BLASTX (véase Altschul, *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410). Los programas computarizados que emplean estos algoritmos también están disponibles, e incluyen, sin carácter limitativo: Software ALIGN o Megalign (DNASTAR), o WU-BLAST-2 (Altschul, *et al.*, *Meth. Enzym.*, 266:460-480 (1996)); o GAP, BESTFIT, BLAST (Altschul, *et al.*), supra, FASTA y TFASTA, disponibles en el paquete Genetics Computing Group (GCG), Versión 8, Madison, Wis., EEUU; y CLUSTAL en el programa PC/Gene de Intelligenetics, Mountain View, Calif. Los expertos en la técnica pueden determinar los parámetros apropiados para medir el alineamiento, incluidos los algoritmos necesarios para conseguir el alineamiento máximo sobre la longitud de las secuencias que se comparan. Preferiblemente, la identidad de secuencia se determina mediante el uso de los parámetros por defecto determinados por el programa. De forma específica, la identidad de secuencia puede determinarse mediante el algoritmo de búsqueda de homología de Smith-Waterman (*Meth. Mol. Biol.* 70:173-187 (1997)) según se lleva a cabo en el programa MSPRCH (Oxford Molecular) utilizando una búsqueda de hueco afín con los siguientes parámetros de búsqueda: penalización por gap (hueco) abierto de 12 y penalización por extensión de gap de 1. Preferiblemente, las comparaciones de aminoácidos emparejados pueden llevarse a cabo utilizando el programa GAP del paquete de software de análisis de secuencias GCG de Genetics Computer Group, Inc., Madison, Wis., que emplea la matriz de sustitución de aminoácidos blosum62, con una ponderación de hueco de 12 y una ponderación de longitud de 2. Con respecto al alineamiento óptimo de dos secuencias de aminoácidos, el segmento contiguo de la secuencia de aminoácidos variante puede presentar residuos de aminoácidos adicionales o residuos de aminoácidos eliminados con respecto a la secuencia de aminoácidos de referencia. El segmento contiguo utilizado para su comparación con la secuencia de aminoácidos de referencia incluirá al menos 20 residuos de aminoácidos contiguos y puede ser 30, 40, 50 o más residuos de aminoácidos. Las correcciones para una identidad de secuencia aumentada asociadas con la inclusión de huecos en la secuencia de aminoácidos del derivado pueden realizarse mediante la asignación de penalizaciones por gap.

[0038] De acuerdo con el presente documento, "construcción de expresión" (o "vector de expresión") indica una construcción de ADN incluyendo una secuencia de ADN que está unida de forma operativa a una secuencia control adecuada capaz de afectar a la expresión del ADN en un huésped adecuado. Tales secuencias control pueden incluir un promotor que afecte a la transcripción, una secuencia operadora opcional que controle la transcripción, una secuencia que codifique sitios de enlace de ribosomas adecuados en el ARNm y secuencias que controlen la finalización de la transcripción y la traducción. La presente invención no está limitada al uso de ninguna construcción de expresión específica. Se utilizan preferiblemente diferentes tipos de células con vectores de expresión diferentes. Por ejemplo, un promotor preferido para vectores utilizado en *Bacillus subtilis* es el promotor AprE; un promotor preferido para vectores utilizado en *Bacillus deramificans* es el promotor amyL, un promotor preferido utilizado en *E. coli* es el promotor Lac, un promotor preferido utilizado en *Saccharomyces cerevisiae* es PGK1, un promotor preferido utilizado en *Aspergillus niger* es glaA y un promotor preferido para *Trichoderma reesei* es cbhl. El vector puede ser un plásmido, una partícula fágica o simplemente una inserción genómica potencial.

[0039] Una vez transformada (o transfectada) en un huésped adecuado, la construcción de expresión puede duplicarse y funcionar de forma independiente al genoma huésped o, puede, bajo condiciones adecuadas, integrarse en el propio genoma. En la presente memoria, los términos "plásmido", "vector" y "construcción o construcciones de expresión" se utilizan a veces indistintamente. Sin embargo, la invención pretende incluir otras formas de vectores de expresión que cumplen funciones equivalentes y que son conocidas en la técnica, o se han vuelto conocidas en la técnica. De este modo, se puede emplear una amplia variedad de combinaciones de vectores de expresión/huésped a la hora de expresar las secuencias de ADN de la presente invención. Los vectores de expresión útiles para la presente invención no mencionados en ninguna otra parte de la presente memoria, por ejemplo, pueden consistir en segmentos de secuencias de ADN sintético, cromosómico y no cromosómico tales como diferentes derivados conocidos de SV40 y plásmidos bacterianos conocidos, p. ej., plásmidos de *E. coli* incluidos col E1, pCR1, pBR322, pMb9, pUC 19 y sus derivados, plásmidos de un intervalo huésped más amplios, p. ej., RP4, ADN fágicos, p. ej., los numerosos derivados de fago λ , p. ej., NM989, otros fagos de ADN, p. ej., M13 y fagos de ADN monocatenarios filamentosos, plásmidos de levadura tales como el plásmido 2v o derivados de este, vectores útiles en células eucariotas, tal como vectores útiles en células animales y vectores derivados de combinaciones de plásmidos y ADN fágicos, tal como plásmidos que han sido modificados para emplear ADN fágico u otras secuencias control de expresión.

[0040] Las técnicas de expresión que utilizan los vectores de expresión de la presente invención son conocidas en la técnica y se describen generalmente en, por ejemplo, Sambrook, *et al.*, *MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL*, SECOND EDITION, Cold Spring Harbor Press (1989). A menudo, tales vectores de expresión entre los que se incluyen las secuencias de ADN de la invención se transforman en un huésped unicelular mediante inserción directa en el genoma de una especie específica a través de un caso de integración (véase, p. ej., Bennett & Lasure, *MORE GENE MANIPULATIONS IN FUNGI*, Academic Press, San Diego, pp. 70-76 (1991) y artículos mencionados en ese documento que describen la inserción genómica dirigida en huéspedes fúngicos).

[0041] Los términos "unido de forma operativa", "en combinación operativa" y "en orden operativo" de acuerdo con el presente documento hacen referencia a la unión de las secuencias de ácido nucleico de forma que lleven a cabo la función prevista. Por ejemplo, la unión de forma operativa de una secuencia promotora a una secuencia de nucleótidos de interés hace referencia a la unión de la secuencia promotora y la secuencia de nucleótidos de interés de forma que la secuencia promotora sea capaz de dirigir la transcripción de la secuencia de nucleótidos de interés y/o la síntesis de un polipéptido codificado mediante la secuencia de nucleótidos de interés. De forma similar, la unión de forma operativa de una secuencia de ácido nucleico con actividad reguladora relacionada con la edad a una secuencia promotora y a una secuencia de nucleótidos de interés hace referencia a la unión de la secuencia de ácido nucleico con actividad reguladora relacionada con la edad, la secuencia promotora y la secuencia de nucleótidos de interés de forma que la secuencia de ácido nucleico con actividad reguladora relacionada con la edad sea capaz de modificar durante un periodo de tiempo el nivel de transcripción en el ARNm de la secuencia de nucleótidos de interés y/o la síntesis de un polipéptido codificado mediante la secuencia de nucleótidos de interés.

[0042] Los términos "organismo huésped", "cepa huésped" o "célula huésped" se refieren en el presente documento a un huésped adecuado para un vector de expresión que incluye ADN de acuerdo con la presente invención. Las células huésped útiles en la presente invención son normalmente huéspedes eucariotas o procariotas, incluido cualquier microorganismo transformable en el que se pueda conseguir la expresión. En el contexto de la presente invención, por ejemplo, las cepas huésped pueden ser *Bacillus subtilis*, *Bacillus deramificans* (u otros *Bacillus* sp.) *Escherichia coli*, *Trichoderma reesei*, *Saccharomyces cerevisiae* o *Aspergillus niger*. Las células huésped se transforman o transfectan con vectores construidos mediante el uso de técnicas de ADN recombinante. Tales células huésped pueden ser capaces tanto de duplicar vectores que codifican la pululanasa y sus derivados o variantes (mutantes) como de expresar el producto péptido deseado o ambos.

[0043] El término "cultivo" o "condiciones de cultivo", cuando se emplea en el contexto de cultivar una población de organismos huésped, hace referencia a un recipiente de cultivo, medio de cultivo y condiciones de cultivo que son adecuadas para el crecimiento del organismo huésped y, en el caso de organismos huésped transfectados con las secuencias de nucleótidos de la presente invención y sus variantes, para la producción de las pululanases de la presente invención. La presente invención no está limitada a ningún cultivo ni condición de cultivo específicos siempre que lo mencionado anteriormente se cumpla.

[0044] De acuerdo con el presente documento, "sujeto de forma funcional" o "unido de forma operativa" indica que una región reguladora, tal como un promotor, terminador, señal de secreción o región potenciadora se fija o une a un gen estructural y controla la expresión de ese gen.

[0045] De acuerdo con el presente documento, una sustancia (p. ej., un polinucleótido o proteína) "derivado de" un microorganismo indica que la sustancia es natural del microorganismo.

[0046] "*Trichoderma*" o "*Trichoderma* sp." hace referencia a cualquier cepa fúngica que ha sido clasificada previamente como *Trichoderma* o que está clasificada actualmente como *Trichoderma*. Preferiblemente las especies son *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei* o *Trichoderma viride*. En la presente invención, *Trichoderma* sp. puede utilizarse como organismo huésped en la presente invención.

[0047] La práctica de la presente invención utilizará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología celular, cultivo celular, biología molecular, biología transgénica, microbiología, ADN recombinante e inmunología, que se encuentran dentro de la técnica. Tales técnicas se describen en la literatura. Véase, por ejemplo, *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, 2ª Ed., ed. por Sambrook, Fritsch and Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1989); *DNA Cloning*, Volúmenes I y II (D. N. Glover ed., 1985); *Oligonucleotide Synthesis* (M. J. Gait ed., 1984); Mullis *et al.* patente estadounidense nº: 4.683.195; *Nucleic Acid Hybridization* (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); *Transcription And Translation* (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); *Culture Of Animal Cells* (R. I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., 1987); *Immobilized Cells And Enzymes* (IRL Press, 1986); B. Perbal, *A Practical Guide To Molecular Cloning* (1984); el tratado, *Methods In Enzymology* (Academic Press, Inc., N.Y.); *Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells* (J. H. Miller y M. P. Calos eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); *Methods In Enzymology*, Vols. 154 y 155 (Wu, *et al.*, eds.), *Immuno- chemical Methods In Cell And Molecular Biology* (Mayer y Walker, eds., Academic Press, Londres, 1987); *Handbook Of Experimental Immunology*, Volúmenes I-IV (D. M. Weir y C. C. Blackwell, eds., 1986); *Manipulating the Mouse Embryo*, (Cold Spring Harbor

Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986). Asimismo, información con respecto a los métodos de preparación, expresión, aislamiento y uso de proteasas puede obtenerse mediante la revisión de la patente estadounidense nº 6.768.001.

- 5 **[0048]** Otras características y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y de las reivindicaciones.

Descripción detallada

- 10 **[0049]** La invención se describirá ahora en detalle a modo de referencia únicamente utilizando las siguientes definiciones y ejemplos.

[0050] A menos que se defina lo contrario en el presente documento, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento presentan el mismo significado entendido comúnmente por un experto en la técnica a la que pertenece la presente invención. Singleton, *et al.*, *DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY*, 2 ED., John Wiley and Sons, Nueva York (1994), y Hale & Markham, *THE HARPER COLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY*, Harper Perennial, N.Y. (1991) proporcionan al experto un diccionario general de muchos de los términos utilizados en la presente invención. Pese a que se puede utilizar cualquier método o material similares o equivalentes a aquellos descritos en el presente documento en la práctica o el estudio de la presente invención, se describen los métodos y materiales preferidos. Los intervalos numéricos incluyen los números que definen el intervalo. A menos que se indique lo contrario, los ácidos nucleicos se escriben de izquierda a derecha en orientación 5' a 3'; las secuencias de aminoácidos se escriben de izquierda a derecha en orientación amino a carboxi, respectivamente. Se dirige a los profesionales especialmente a Sambrook *et al.*, 1989 y Ausubel FM *et al.*, 1993, para las definiciones y términos de la técnica. Ha de entenderse que la presente invención no está limitada a metodología, protocolos y reactivos específicos descritos, ya que estos pueden variar.

[0051] Los intervalos numéricos incluyen los números que definen el intervalo.

30 **[0052]** A menos que se indique lo contrario, los ácidos nucleicos se escriben de izquierda a derecha en orientación 5' a 3'; las secuencias de aminoácidos se escriben de izquierda a derecha en orientación amino a carboxi, respectivamente.

35 **[0053]** Los encabezamientos proporcionados en el presente documento no limitan los diferentes aspectos o formas de realización de la invención que pueden considerarse como referencia a la memoria en general. Por consiguiente, los términos definidos justo a continuación se definen de forma más completa haciendo referencia a la memoria en general.

Biología molecular

40 **[0054]** En una forma de realización, la presente invención proporciona la expresión de genes heterólogos bajo el control del promotor de amyL. Por lo tanto, la presente invención depende de las técnicas rutinarias en el campo de la genética recombinante. Entre los textos básicos que exponen los métodos generales de uso en la presente invención se incluyen Sambrook, *et al.*, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (2ª ed. 1989); Kriegler, *Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual* (1990); y Ausubel, *et al.*, eds., *Current Protocols in Molecular Biology* (1994)).

50 **[0055]** Los genes heterólogos que comprenden las secuencias promotoras del gen de celulasa de hongos filamentosos se clonan normalmente en vectores intermediarios antes de la transformación en las células *Trichoderma reesei* para la replicación y/o expresión. Estos vectores intermediarios son normalmente vectores procariotas, p. ej., plásmidos o vectores transportadores.

55 **[0056]** Con el fin de obtener un alto nivel de expresión de un gen clonado, el gen heterólogo se coloca preferiblemente a aproximadamente la misma distancia del promotor que a la que se encuentra en el gen de celulasa que se da de forma natural. Sin embargo, tal y como se conoce en la técnica, puede realizarse cierta variación en la distancia sin perder la función promotora.

[0057] Los expertos en la técnica son conscientes de que un promotor natural puede modificarse mediante el reemplazo, sustitución, adición o eliminación de uno o más nucleótidos sin cambiar su función. La práctica de la invención incluye tales alteraciones al promotor y no está limitada por estas.

60 **[0058]** La construcción/vector de expresión contiene normalmente una unidad de transcripción o casete de expresión que contiene todos los elementos adicionales necesarios para la expresión de la secuencia heteróloga. Por tanto, un casete de expresión típico contiene un promotor unido de forma operativa a la secuencia de ácido nucleico heterólogo y a las señales necesarias para la poliadenilación eficaz del transcrito, los sitios de unión ribosómicos y la finalización de la traducción. Los elementos adicionales del casete pueden incluir potenciadores y, si el ADN genómico se utiliza como el gen estructural, intrones con sitios aceptores y donantes de empalme

funcional.

[0059] La práctica de la invención no está limitada por la elección del promotor en la construcción genética. Sin embargo, los promotores de ejemplo son los promotores *cbh1*, *cbh2*, *eg1*, *eg2*, *eg3*, *eg5*, *xln1* y *xln2* de *Trichoderma reesei*.

[0060] Además de la secuencia promotora, el casete de expresión debería contener también una región de finalización de la transcripción secuencia abajo del gen estructural con el fin de proporcionar una finalización eficaz. La región de finalización puede obtenerse del mismo gen que la secuencia promotora o puede obtenerse a partir de genes diferentes.

[0061] Aunque es probable que ningún terminador fúngico sea funcional en la presente invención, entre los terminadores preferidos se incluyen: el terminador del gen *trpC* de *Aspergillus nidulans* (Yelton, M. *et al.* (1984) PNAS USA 81:1470-1474, Mullaney, E.J. *et al.* (1985) MGG 199:37-45), los genes de la glucoamilasa *Aspergillus awamori* o *Aspergillus niger* (Nunberg, J.H. *et al.* (1984) Mol. Cell Biol. 4:2306, Boel, E. *et al.* (1984) EMBO J. 3:1581-1585) y el gen de proteasa carboxilica *Mucor miehei* (Publicación EPO N° 0 215 594).

[0062] El vector de expresión específico utilizado para transportar la información genética en la célula no es especialmente importante. Se puede utilizar cualquiera de los vectores convencionales utilizados para la expresión de células procariotas o eucariotas. Entre los vectores de expresión bacterianos convencionales se incluyen bacteriófagos λ y M13, así como plásmidos tales como plásmidos basados en pBR322, pSKF, pET23D y sistemas de expresión de fusión tales como MBP, GST y LacZ. También se pueden añadir etiquetas de epítipo a proteínas recombinantes con el fin de proporcionar métodos convenientes de aislamiento, p. ej., c-myc.

[0063] Entre los elementos que normalmente se incluyen en los vectores de expresión también se encuentra un replicón, un gen que codifica la resistencia antibiótica con el fin de permitir la selección de bacterias que albergan plásmidos recombinantes y sitios de restricción únicos en regiones innecesarias del plásmido con el fin de permitir la inserción de secuencias heterólogas. El gen de resistencia antibiótica específico elegido no es importante, cualquiera de los genes de resistencia conocidos en la técnica es adecuado. Las secuencias procariotas se eligen preferiblemente de forma que no interfieran en la replicación o integración del ADN en *Trichoderma reesei*.

[0064] Los métodos de transformación de la presente invención pueden resultar en la integración estable de todo el vector de transformación o parte de él en el genoma de los hongos filamentosos. Sin embargo, también se contempla la transformación que resulta del mantenimiento de un vector de transformación extracromosómico que se autoduplica.

[0065] Se pueden utilizar muchos métodos de transfección convencionales para producir líneas celulares de *Trichoderma reesei* que expresan amplias cantidades de la proteína heteróloga. Entre algunos de los métodos publicados para la introducción de construcciones de ADN en las cepas de producción de celulasas de *Trichoderma* se incluyen Lorito, Hayes, DiPietro y Harman, 1993, *Curr. Genet.* 24: 349-356; Goldman, VanMontagu y Herrera-Estrella, 1990, *Curr. Genet.* 17:169-174; Penttilä, Nevalainen, Ratto, Salminen y Knowles, 1987, *Gene* 6: 155-164, para *Aspergillus*, Yelton, Hamer y Timberlake, 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU* 81:1470-1474, para *Fusarium* Bajar, Podila y Kolattukudy, 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU* 88: 8202-8212, para *Streptomyces* Hopwood *et al.*, 1985, The John Innes Foundation, Norwich, UK y para *Bacillus* Brigidi, DeRossi, Bertarini, Riccardi y Matteuzzi, 1990, *FEMS Microbiol. Lett.* 55: 135-138).

[0066] Sin embargo, puede utilizarse cualquiera de los procedimientos conocidos para introducir secuencias de nucleótidos extraños en células huésped. Estas incluyen el uso de transfección de fosfato de calcio, polybrene, fusión de protoplastos, electroporación, biolística, liposomas, microinyección, vectores de plasma, vectores virales y cualquier otro método conocido para introducir ADN genómico clonado, ADNc, ADN sintético u otro material genético extraño en una célula huésped (véase, p. ej., Sambrook *et al.*, *supra*). También se utiliza el método de transfección mediado por *Agrobacterium* descrito en la patente estadounidense n° 6.255.115. Solo es necesario que el procedimiento de ingeniería genética específico utilizado sea capaz de introducir de forma exitosa al menos un gen en la célula huésped capaz de expresar el gen heterólogo.

[0067] La invención también hace referencia a una pululanasa producida de forma heteróloga por un microorganismo. Entre los ejemplos de bacterias adecuadas se encuentran las bacterias gram positivas tal como *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus lentus*, *Bacillus brevis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus circulans*, *Bacillus lautus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus thuringiensis* o *Streptomyces lividans* o *Streptomyces murinus*, o bacterias gram negativas como *E. coli*. La transformación de las bacterias puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante transformación de protoplastos o mediante el uso de células competentes de forma conocida *per se*.

[0068] Generalmente, la presente invención incluye un método para producir una pululanasa mediante la expresión de ADN incorporado en un sistema de expresión que ha sido transformado en una célula huésped. Se puede

emplear una amplia variedad de combinaciones de vectores de expresión/huésped a la hora de expresar las secuencias de ADN de la presente invención. Muchos vectores de expresión procariotas y eucariotas están disponibles comercialmente. La selección de vectores de expresión adecuados dependerá del conocimiento de los expertos en la técnica. El vector puede ser un plásmido, una partícula fágica o simplemente una inserción genómica potencial. Una vez transformada en un huésped adecuado, el vector puede duplicarse y funcionar de forma independiente al genoma huésped o, puede, en algunos casos, integrarse en el propio genoma. En la presente memoria, el plásmido y el vector se utilizan a veces indistintamente ya que el plásmido es la forma más usada comúnmente actualmente. Sin embargo, la invención pretende incluir otras formas de vectores de expresión que cumplen funciones equivalentes y que son conocidas en la técnica o se harán conocidas en la técnica. Entre los vectores de expresión útiles se incluyen, por ejemplo, segmentos de secuencias de ADN cromosómico, no cromosómico y sintético, tal como los diferentes fagos y plásmidos conocidos útiles para este fin. Además, normalmente se utiliza cualquiera de entre una amplia variedad de secuencias control de expresión en estos vectores.

[0069] Las células huésped en la presente invención son generalmente huéspedes eucariotas o procariotas, incluido cualquier microorganismo transformable en el que puede conseguirse la expresión de pululanasa de acuerdo con la presente invención. Las células huésped se transforman o transfectan con vectores construidos mediante el uso de técnicas de ADN recombinante. Tales células huésped transformadas son capaces tanto de duplicar vectores que codifican la pululanasa y sus variantes (mutantes) como de expresar la pululanasa deseada. Estos huéspedes pueden incluir huéspedes eucariotas y procariotas, tales como cepas de *E. coli*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Streptomyces*, diferentes hongos, levadura y células animales. Preferiblemente, el huésped expresa la pululanasa de la presente invención de forma extracelular con el fin de facilitar la purificación y el procesamiento posterior.

[0070] En algunas formas de realización, la célula huésped es un elemento del género *Bacillus*, mientras que en algunas formas de realización, la cepa *Bacillus* de interés es una cepa *Bacillus* industrial. Entre los ejemplos de cepas *Bacillus* industriales se incluyen, sin carácter limitativo, *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. lentus*, *B. amyloliquefaciens*. En formas de realización adicionales, la cepa huésped *Bacillus* se elige del grupo consistente en *B. lentus*, *B. brevis*, *B. stearothermophilus*, *B. alkalophilus*, *B. coagulans*, *B. cirulans*, *B. pumilus*, *B. thuringiensis*, *B. clausii* y *B. megaterium*, así como otros organismos dentro del género *Bacillus*, tal y como se ha detallado anteriormente. En algunas formas de realización, se utiliza *B. subtilis*. En otras formas de realización, se utiliza *B. licheniformis*. Por ejemplo, las patentes estadounidenses nº 5.264.366 y 4.760.025 (RE34.606) y US2002/0182734 (publicación internacional nº WO 02/14490) describen diferentes huéspedes *Bacillus* que son útiles en la presente invención, aunque también se contempla el uso de otras cepas adecuadas en la presente invención. Preferiblemente, se utiliza una cepa de *Bacillus* negativa proteasa (genes eliminados, p. ej., Δ apr o Δ npr entre otros).

[0071] Se conocen diferentes métodos para la transformación de especies *Bacillus*. De hecho, los métodos para modificar el cromosoma de *Bacillus* que implican construcciones de plásmidos y la transformación de los plásmidos en *E. coli* son bastante conocidos. En la mayoría de los métodos, los plásmidos se aíslan posteriormente de *E. coli* y se transforman en *Bacillus*. Sin embargo, no es necesario utilizar dicho microorganismo intermedio tal como *E. coli* y, en algunas formas de realización, la construcción de ADN se transforma directamente en un huésped *Bacillus* competente mediante protoplastos o transformación celular competente. La expresión y purificación de la pululanasa mutante de la invención puede realizarse a través de medios reconocidos en la técnica para llevar a cabo tales procesos.

[0072] Después de introducir el vector de expresión en las células, las células transfectadas se cultivan bajo condiciones que favorecen la expresión de genes bajo el control de secuencias promotoras del gen de proteasa. Lotes amplios de células transformadas pueden cultivarse como se describe en los ejemplos, *infra*. Finalmente, el producto se recupera del cultivo utilizando las técnicas convencionales.

[0073] Por lo tanto, la invención en el presente documento garantiza la expresión y la secreción mejorada de los polipéptidos deseados cuya expresión se realiza bajo control de secuencias promotoras de genes incluidos genes de amilasa que se dan de forma natural, secuencias de ADN de fusión, y diferentes construcciones heterólogas. La invención también proporciona procesos para expresar y secretar altos niveles de tales polipéptidos deseados.

Expresión de proteína

[0074] Las proteínas de la presente invención se producen mediante el cultivo de células transformadas con un vector de expresión que contiene genes cuya expresión se realiza bajo el control de secuencias promotoras de genes de amilasa. La presente invención es especialmente útil para aumentar la producción intracelular y/o extracelular de proteínas. La proteína puede ser homóloga o heteróloga. Entre las proteínas que pueden producirse por la invención inmediata se incluyen, sin carácter limitativo, hormonas, enzimas, factores de crecimiento, citocinas, anticuerpos y similares.

[0075] Entre las enzimas se incluyen, sin carácter limitativo, hidrolasas, tal como proteasa, esterasa, lipasa, fenol oxidasa, permeasa, amilasa, pululanasa, celulasa, glucosa isomerasa, laccasa y proteína disulfuro isomerasa.

[0076] Las condiciones adecuadas para la expresión de dichos genes comprenden la provisión al cultivo de una composición de alimentación inductora, véase, por ejemplo, US-2004-0121446. Las condiciones óptimas para la producción de las proteínas variarán con la elección de la célula huésped y con la elección de la proteína a expresar. Tales condiciones serán determinadas fácilmente por un experto en la técnica a través de la experimentación rutinaria u optimización.

[0077] La proteína de interés, p. ej., una pululanasa según se describe en el presente documento, se purifica o aísla normalmente después de la expresión. La proteína de interés puede aislarse o purificarse de diferentes formas conocidas por los expertos en la técnica dependiendo de qué otros componentes estén presentes en la muestra. Entre los métodos de purificación convencionales se incluyen técnicas electroforéticas, moleculares, inmunológicas y cromatográficas, incluidos el intercambio iónico, la cromatografía hidrofóbica, por afinidad y HPLC de fase inversa y cromatofocalización. Por ejemplo, la proteína de interés puede purificarse utilizando una columna de anticuerpos antiproteína de interés convencional. Las técnicas de ultrafiltración y diafiltración, junto con la concentración proteica, también son útiles. Como guía general en técnicas de purificación adecuadas, véase Scopes, *Protein Purification* (1982). El grado de purificación necesario variará dependiendo del uso de la proteína de interés. En algunos casos no será necesaria purificación.

Aplicaciones industriales de la invención

[0078] La presente invención presenta muchas aplicaciones prácticas en la industria, tal y como se contempla en el presente documento, esta descripción pretende ser un ejemplo y no ser integradora.

[0079] En diferentes aspectos, la presente invención ha contemplado su uso en la producción de etanol, cocción, producción de zumo de frutas, producción de cerveza, destilación, fabricación de vino, cuero, aceites y grasas, papel y pulpa y la producción de pienso animal.

[0080] En otro aspecto, la presente invención ha contemplado su uso como componente activo "biológico" de detergentes y productos de limpieza. En este caso, las proteasas, amilasas y lipasas se utilizan para la descomposición de proteína, almidón y manchas de grasa. Entre los aspectos de la invención se incluyen el análisis de la compatibilidad de enzimas con ingredientes detergentes mediante la realización de estudios de estabilidad y su análisis en una variedad de formulaciones.

[0081] En otro aspecto, la presente invención ha contemplado su uso en la industria textil, principalmente en el acabado de tejidos y prendas. Entre las principales aplicaciones se incluyen: Desaprestado, eliminación de tamaño, (es decir, eliminación de elementos rígidos de fibra), de hilos en tejidos tras su tejido. Pulido biológico, un proceso para reducir la tendencia a la formación de residuos y para proporcionar a los tejidos una apariencia más brillante y regular. Prelavado biológico, un proceso donde una pequeña dosis de enzima puede reemplazar las tradicionales piedras pómez utilizadas en el lavado a la piedra del vaquero para conseguir un aspecto desgastado.

[0082] En otro aspecto más, la presente invención ha contemplado su uso enzimático para la licuefacción y sacarificación de almidón en glucosa y la isomerización en fructosa. La presente invención puede utilizarse para convertir amplios volúmenes de maíz y otros granos en edulcorantes, como sirope de maíz con alto contenido de fructosa y sirope de maltosa.

Ejemplos

[0083] En la exposición experimental que se muestra a continuación, se emplean las siguientes abreviaturas: eq (equivalentes); M (molar); μ M (micromolar); N (normal); mol (moles); mmol (milimoles); μ mol (micromoles); nmol (nanomoles); g (gramos); mg (miligramos); kg (kilogramos); μ g (microgramos); L (litros); ml (mililitros); μ l (microlitros); cm (centímetros); mm (milímetros); μ m (micrómetros); nm (nanómetros); °C (grados centígrados); h (horas); min (minutos); s (segundos); ms (milisegundos); TLC (cromatografía de capa fina); nt (nucleótidos); Q (glutamina); E (ácido glutámico); CAP (cloranfenicol).

[0084] La presente invención se describe con más detalle en los siguientes ejemplos que no pretenden limitar de ninguna manera el alcance de la invención según se ha reivindicado. Las figuras adjuntas han de considerarse como partes integrales de la memoria y la descripción de la invención. Los siguientes ejemplos se ofrecen para ilustrar y no para limitar la invención reivindicada.

Ejemplo 1

Diseño de variantes de pululanasa

[0085] Se diseñaron las siguientes variantes de pululanasa (véase, figura 1).

[0086] "PUL" Esta es la pululanasa de *B. deramificans* "de tipo silvestre", idéntica a la molécula expresada por BMP139. El gen ha sido optimizado de codón, es conducido por el promotor de amyL (LAT) y presenta una secuencia señal de amyL. Las diferencias entre esta construcción y la que está presente en BMP139 son las siguientes (véase, figura 2). En primer lugar, la nueva construcción presenta una región codificante optimizada de codón, comparada con la secuencia codificante natural en BMP139. En segundo lugar, la nueva construcción presenta una región promotora amyL más corta de 100 nt, frente a aproximadamente 800 nt en BMP 139. En tercer lugar, la nueva construcción presenta el terminador de amyL, mientras que BMP 139 presenta el terminador de pululanasa de *B. deramificans*. Tanto la nueva como la antigua construcción presentan la secuencia señal de amyL y expresan moléculas de pululanasa idénticas. Aunque la molécula expresada por esta nueva construcción es idéntica al producto actual, puede existir un beneficio con respecto a la producción de títulos como resultado de la optimización de codones.

[0087] "PULm104" Esta es la pululanasa de *B. deramificans* de la cual se han eliminado los 104 aminoácidos de N-terminal. La construcción incluye el promotor de amyL, la secuencia señal de amyL, la pululanasa optimizada de codón que codifica la región carente de la secuencia que codifica los 104 aminoácidos de N-terminal de la pululanasa madura y el terminador de amyL. La pululanasa truncada PULm104 se parece a las moléculas PULm98 y PULm102 producidas por el recorte de la pululanasa de longitud completa en N-terminal en E99 y E103. La pululanasa se eliminó hasta el aminoácido 104 con el fin de conseguir una secuencia consenso objetivo de peptidasa señal entre la secuencia señal de amyL y la secuencia de pululanasa: ASA-A. La lógica detrás de esta variante de pululanasa truncada sigue a sorprendentes observaciones previas en las que se observó una actividad específica más alta para las variantes de pululanasa recortadas en comparación con la molécula de longitud completa.

[0088] "PUL_E99Q_E103Q" Esta es la pululanasa de *B. deramificans* en la que los motivos diana de proteasa en E99 y E103 han sido modificados en Q99 y Q103, con el objetivo de hacer la molécula de pululanasa resistente al recorte en E99 y E103. Además, en el caso de que la degradación de la pululanasa posterior a las 51 h dependiera del recorte inicial en E99 y E103, se esperaría que esta modificación impidiera la degradación y la caída de actividad tras 51 h.

Ejemplo 2

Construcción y transformación de plásmidos

[0089] Se sintetizaron dos construcciones de pululanasa optimizadas de codón, una que codificaba la proteína de pululanasa "de tipo silvestre" y la otra que codificaba la variante E99Q_E103Q.

[0090] Ambas incluían 57 nucleótidos del promotor de amyL (que se demostró previamente que permitía la clonación en *E. coli*; tramos del promotor más largos son letales), la secuencia señal de amyL, la secuencia de pululanasa (variante) optimizada de codón y el terminador de amyL. Estas construcciones funcionaban como plantillas para la construcción por PCR de las tres construcciones de pululanasa descritas anteriormente:

[0091] "PUL" Se utilizaron los siguientes cebadores para amplificar la construcción de pululanasa "de tipo silvestre" a partir de la construcción de pululanasa "de tipo silvestre" sintética (sitio *Xho*I en **negrita**):

Plat5-XhoI_FW:

Ccccgctc**gagg**gcttttctttggaagaaaatatagggaaaatggtactgttaaaaattcgaatatattatacaatatcatatgt
ttacattgaaagggg
[SEQ ID NO.: 7].

Tlat-XhoI_RV: tggaatc**tcgagg**gttttatcctttacctgtctcc [SEQ ID NO:8].

[0092] "PULm104" El casete de expresión para la pululanasa truncada se generó mediante fusión por PCR. Los siguientes dos fragmentos se amplificaron a partir de la construcción de pululanasa "de tipo silvestre" sintética y se fusionaron posteriormente:

Un fragmento que cubría el promotor de amyL y la secuencia señal de amyL.

Un fragmento que cubría la secuencia que codificaba la pululanasa truncada y el terminador de amyL.

Ad A)

[0093] Se utilizaron los siguientes cebadores para la amplificación del promotor de amyL y la secuencia señal:

Plat5-XhoI_FW [SEQ ID NO:7] (véase anteriormente).

ssLAT-PULm104_RV: gcggttgctgactgccggttagcagctgctgaagctgcagaatgaggcagc [SEQ ID NO:9] (cebador de fusión; secuencia de pululanasa inversa que empieza en el codón 105 en **negrita**).

5 Ad B)

[0094] Se utilizaron los siguientes cebadores para la amplificación de la secuencia que codifica la pululanasa y el terminador de amylL:

10 **ssLAT-PULm104_FW**: gctgcctcattctgcagcttcagcagctgctaaaccggcagtcagcaacgc [SEQ ID NO:10] (cebador de fusión; secuencia de pululanasa que empieza en el codón 105 en **negrita**).

Tlat-XhoI-RV: [SEQ ID NO:8] (véase anteriormente).

15 [0095] Cada uno de los cebadores de fusión incluyen dos tramos de secuencias que están separados 312 nt en la secuencia plantilla (que representa los 104 aminoácidos de N-terminal). Los dos fragmentos por PCR descritos bajo A) y B) se fusionaron en una reacción por PCR utilizando los cebadores Plat5-XhoI_FW and Tlat-XhoI_RV.

20 [0096] "PUL_E99Q_E103Q" La construcción de la variante de pululanasa E99Q_E103Q era idéntica a la de la construcción de pululanasa "de tipo silvestre" (véase, 1 anterior), con la construcción sintética E99Q_E103Q como plantilla.

25 [0097] Los fragmentos generados se clonaron en dos orientaciones en el sitio XhoI del vector de integración de *B. licheniformis* pICatH (figura 3). Esto tuvo como resultado seis construcciones, pICatH-PUL-Ori1 (figura 4), pICatH-PUL-Ori2, pICatH-PULm104-Ori1 (figura 5), pICatH-PULm104-Ori2, pICatH-PUL-E99Q_E103Q-Ori1 (figura 6) y pICatH-PUL-E99Q_E103Q-Ori2.

30 [0098] Las construcciones Ori1 y Ori2 presentan orientaciones opuestas del gen de pululanasa en relación con el gen de resistencia a cloranfenicol (catH). Las figuras 4(a), 5(a) y 6(a) muestran mapas de plásmidos de las tres construcciones Ori1.

35 [0099] Las seis construcciones se transformaron en *B. subtilis* y se detectó la formación de halo en capas de AZCL-pullulan (Megazyme) (0,1 % en 100 mM NaAc pH 5,1 % agar). Los transformantes pICatH-PULm104 produjeron halos mayores que los transformantes de cualquier pululanasa de longitud completa. Se verificó la secuencia de las construcciones y se transformaron en cepas huésped de *B. licheniformis* BML612 y BML780 utilizando la transformación de protoplastos.

Ejemplo 3

Integración en el genoma *B. licheniformis*

40

[0100] Después de la transformación, se seleccionaron los transformantes sobre placas de regeneración mínima con 5 µg/ml cloranfenicol y 10 µg/ml neomicina. Los transformantes se duplicaron en las placas en dos placas de agar infusión corazón (conocido por los expertos en la técnica) con los mismos antibióticos, uno de ellos se cubrió con AZCL-pullulan para seleccionar los transformantes de pululanasa positivos. De forma análoga a la situación en *B. subtilis*, los transformantes PULm104 mostraron halos mayores. Los plásmidos se integraron en el locus *catH* en el cromosoma de *B. licheniformis*. Por lo tanto, se buscó el siguiente conjunto de integrantes, tal y como se muestra en la tabla 2, para una mayor extirpación/amplificación:

45

TABLA 2

50

BML612 PUL Ori1
BML612 PUL Ori2
BML612 PULm104 Ori1
BML612 PULm104 Ori2
BML612 PUL_E99Q_E103Q Ori1
BML612 PUL_E99Q_E103Q Ori2
BML780 PUL Ori1
BML780 PUL Ori2
BML780 PULm104 Ori1
BML780 PULm104 Ori2
BML780 PUL_E99Q_E103Q Ori1
BML780 PUL_E99Q_E103Q Ori2

[0101] La extirpación del plásmido y la amplificación del casete se llevaron a cabo como se muestra a continuación.

Las cepas sin ADN extraño ("cepas exentas") se obtuvieron mediante la extirpación de las secuencias del vector ("bucles de salida"), dejando únicamente el casete de expresión de pululanasa catH integrado en el cromosoma. A continuación, se amplificó el casete de expresión sometiendo a las cepas a un aumento escalonado en concentración de cloranfenicol (5, 25, 50, 75 µg/ml). La producción de pululanasa se monitorizó mediante la superposición de placas de reproducción con AZCL-pullulan tras cada etapa de amplificación. De cada cepa, se obtuvieron cuatro niveles de amplificación: CAP5, CAP25, CAP50 y CAP75.

Ejemplo 4:

Evaluación de cepas de pululanasa de *B. licheniformis*

[0102] Se recogieron cepas en duplicado en todos los niveles de amplificación en una única placa de agar infusión corazón amplia con 5 µg/ml cloranfenicol y se cultivó durante la noche a 37 °C. La cepa de producción de pululanasa BMP139 se incluyó como punto de referencia. La actividad de pululanasa se visualizó mediante la superposición de la placa con agar AZCL-pullulan. La superposición se incubó 8 h a 37 °C, seguido de una incubación de 16 h a temperatura ambiente. El resultado se resume en la tabla 3 a continuación.

TABLA 3

Cepa	CAP5	CAP25	CAP50	CAP75	
BML612 PUL Ori1	+	+	+	++	
BML612 PUL Ori2	+	+	+	++	
BML612 PULm 104 Ori1	+	++	++	+++	
BML612 PULm 104 Ori2	+	+	+++	+++	
BML612 PUL_E99Q_E103Q Ori1	+	+	++	++	
BML612 PUL_E99Q_E103Q Ori2	+	+	++	++	
BML780 PUL Ori1	+	+	+	++	
BML780 PUL Ori2	+	+	++	++	
BML780 PULm 104 Ori1	++	++	+++	+++++	
BML780 PULm104 Ori2	++	++	+++	+++++	
BML612 PUL_E99Q_E103Q Ori1	++	++	++	++	
BML612 PUL_E99Q_E103Q Ori2	+	++	++	+++	
BMP 139					++
Leyenda: + = diámetro halo 7-9 mm ++ = diámetro halo 10-12 mm +++ = diámetro halo 13-15 mm ++++ = diámetro halo 16-18 mm +++++ = diámetro halo 19-21 mm					

[0103] A partir de la evaluación, queda claro que la amplificación tiene como resultado un aumento en los títulos y/o rendimiento. Conclusiones más específicas:

1) Las cepas PUL truncadas en N-terminal (PULm104) presentan un beneficio de rendimiento muy pronunciado sobre las cepas de pululanasa de longitud completa. Las cepas BML780 PULm104 CAP75 producen halos con una superficie aumentada 2,5 veces (sobre un diámetro aumentado 1,5 veces) sobre aquellos de la cepa BMP139 y las cepas BML780 PUL CAP75. Esto sugiere que la molécula más corta se produce con títulos más altos o su actividad se aumenta en comparación con las moléculas de pululanasa de longitud completa.

2) La variante PUL_E99Q_E103Q puede presentar un ligero beneficio sobre la PUL "de tipo silvestre". Los

halos producidos por las cepas BML780 PUL_E99Q_E103Q son algo más grandes que los de las cepas BML780 PUL.

- 5 3) La cepa de producción BMP 139 parece presentar el mismo rendimiento que las cepas PUL "de tipo silvestre" amplificadas CAP75. Por lo tanto, según la evaluación de la placa, la optimización de codones no tiene como resultado un rendimiento aumentado.
- 10 4) Las cepas BML780 presentan generalmente mejor rendimiento que las cepas BML612. Esta información está en consonancia con los datos previos sobre degradación de pululanasa en el fondo de BML612. El hecho de que las cepas de pululanasa BML612 construidas en este caso aún muestren una ausencia razonable de AZCL sugiere que, en las placas, la pululanasa es relativamente estable incluso en el fondo de BML612.
- 5) No se observaron diferencias de rendimiento claras entre las cepas de pululanasa Ori1 y Ori2.

REIVINDICACIONES

1. Pululanasa aislada que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4 o SEQ ID NO:6.
- 5 2. Molécula de ácido nucleico aislada que codifica una pululanasa de acuerdo con la reivindicación 1.
3. Molécula de ácido nucleico aislada de acuerdo con la reivindicación 2 que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:5.
- 10 4. Construcción de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico aislada de acuerdo con la reivindicación 2 o la reivindicación 3.
- 15 5. Construcción de expresión de acuerdo con la reivindicación 4 donde dicha molécula de ácido nucleico aislada está unida de forma operativa a secuencias control reconocidas por una célula huésped transformada o transfectada con dicha construcción de expresión.
6. Organismo huésped que comprende la construcción de expresión de acuerdo con la reivindicación 5.
- 20 7. Organismo huésped de acuerdo con la reivindicación 6, donde dicho organismo huésped se elige del grupo consistente en hongos, bacterias y células eucariotas.
8. Organismo huésped de acuerdo con la reivindicación 6, donde dicho organismo huésped se elige del grupo consistente en *Bacillus sp.*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Trichoderma reesei*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus niger* y *B. licheniformis*.
- 25 9. Método para producir una pululanasa de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende el cultivo de un organismo huésped de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8 durante un periodo de tiempo y bajo condiciones suficientes para la producción de pululanasa.
- 30 10. Método de acuerdo con la reivindicación 9, que comprende las etapas consistentes en proporcionar una construcción de expresión de acuerdo con la reivindicación 5 y transformar o transfectar dicha construcción de expresión en dicho organismo huésped.
- 35 11. Método de acuerdo con la reivindicación 9 o la reivindicación 10, donde dicha pululanasa se aísla del cultivo.

FIGURA 1

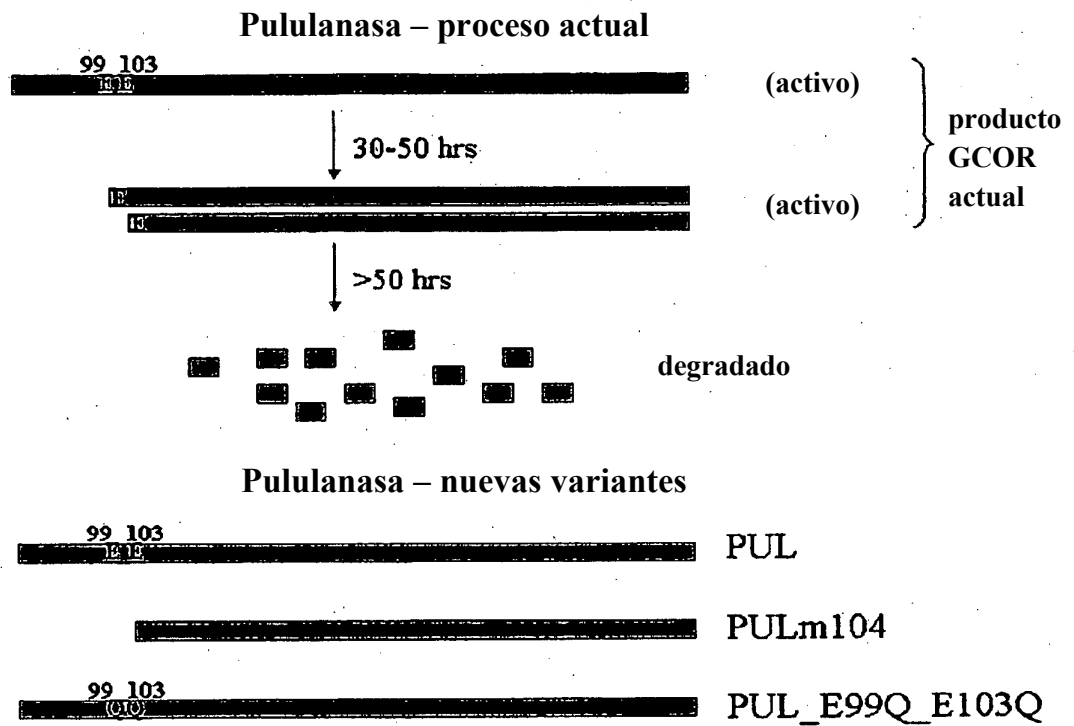


FIGURA 2

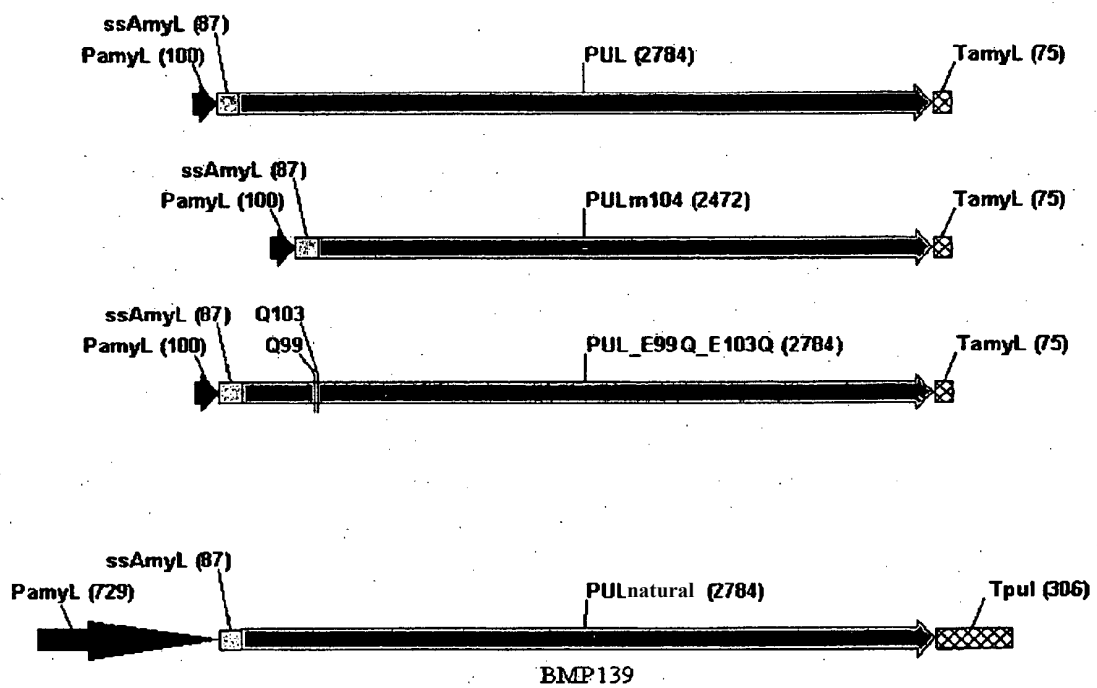


FIGURA 3

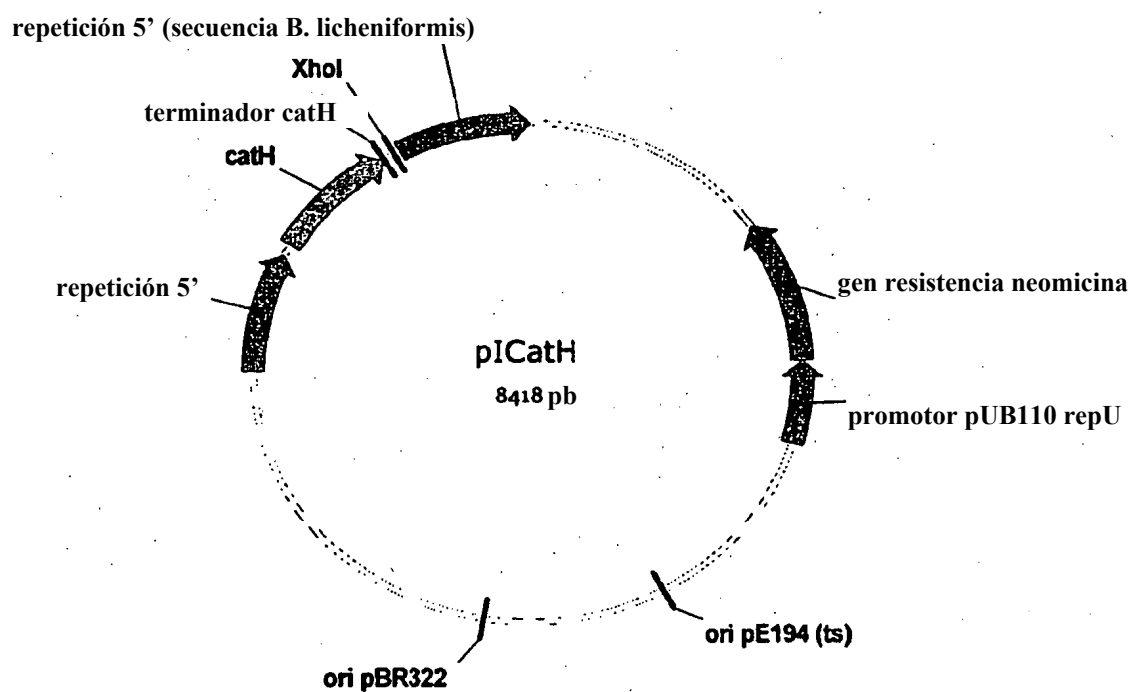


FIGURA 4

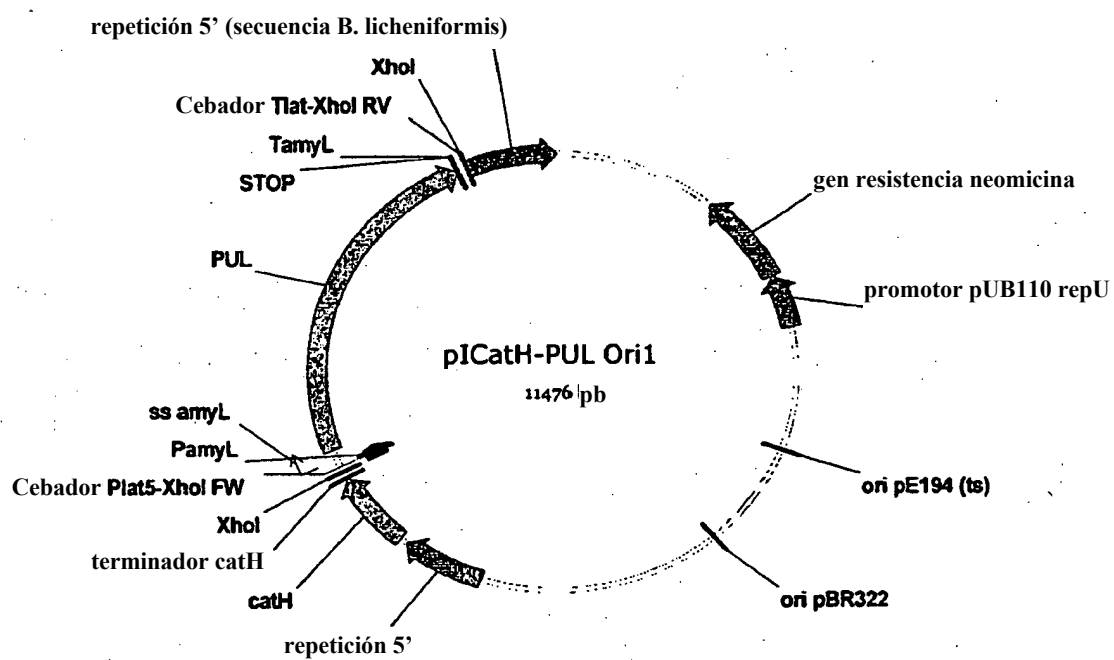


FIGURA 5

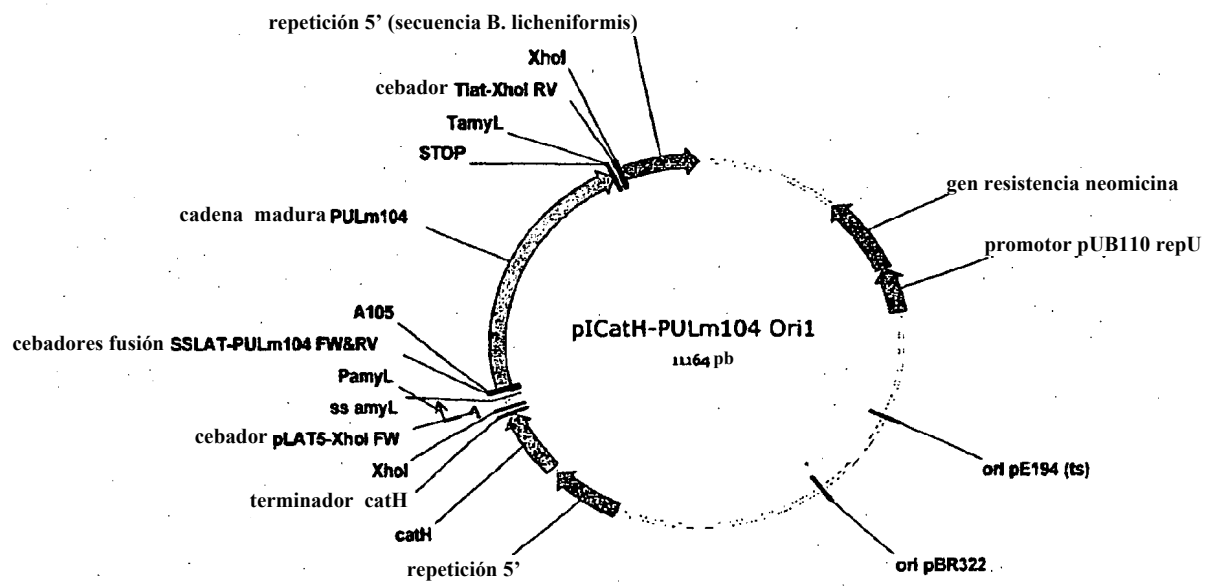


Figura 6

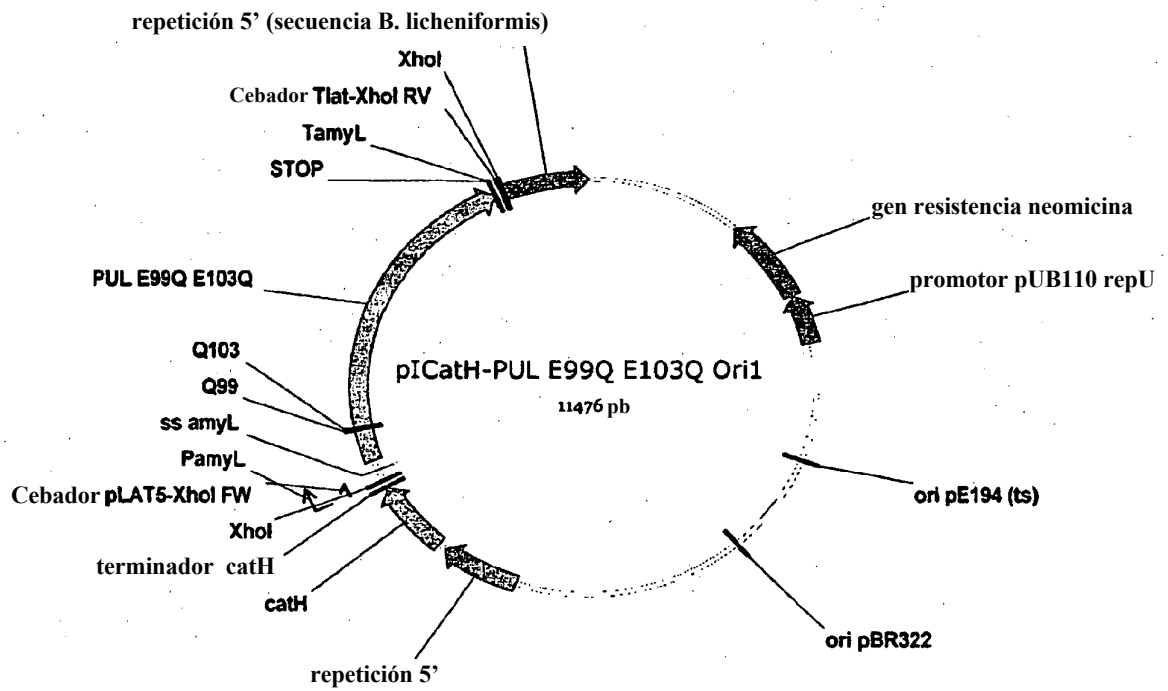


FIGURA 7A

secuencia nucleótidos ADN PUL tipo silvestre

Negrita = secuencia señal amyL

Negro = secuencia codificación PUL madura

```

atgaaacaacaaaaacggctttacgcccgaattgctgacgctgttattttgcgctcatcttcttgcgtgcc
tcattctgcagcttcagcagatggcaatacgcagcagcatcatcgccattattttagaccggcgaggag
attatcaaccgtggagcctttggatgtggccgaaagatggaggaggagcggaatatgattttaaccag
ccggcagattcacttggagcagtcgcctcagcagatattccgggaaatccgagccaagtcggcatcat
cgtcagaacacaggattggacgaaagatgtcagcgcggatcgctatatcgatctgagcaaaggcaatg
aagtctggctggctgaaggcaacagccagatcctttatagcgaaaaagacgccgaagatgctgctaaa
ccggcagtcagcaacgccttatctggatgccagcaaccaagtcctggcctgagccaaccgctgac
aattgggagaaggagcagcggatttacgggtccatgatgacacggcggaacaaagatatccgggtcacga
gcgttaaagatgctagcctgggccaagatgtcacagcagttctggcgggcacgtttcaacatatcttt
ggcggtatcagattgggcaccggataatcacagcagcgtgctgaaaaaagtcacgaacaacctgtatca
gttttagcggagatctgccggaaggcaactatcaatataaagtgcgcctgaacgatagctggaacaatc
cgagctatccgagcgataacatcaatctgacagtcgccggcaggcggagcacatgtcacgtttagctat
atcccgagcacacatgccgtctatgacacgatcaacaacccgaacgccgatcttcaagtcgaaagcgg
cgtcaaaacggatctggtcacagtcacattgggagaagatccggatgtcagccatacactgagcatcc
aaacggatggctatcaagcgaaacaagtcacccgagaaacgtcctgaacagcagccagttatttat
agcggcgatgatctgggcaacacgtatacacaaaaagcgacgacgtttaagtttgggcgccgacaag
cacacaagtcacagtcctgtctgtatgattcagcaacaggcagcgtcacaaaaatcgtcccgatgacag
catcaggacatggagtctgggaagcgacgggtcaacaaaacctggaaaactgggtatttatgtatgaa
gtcacgggccaaggatcaacaagaacagcgggtcgatccgtatgctacagcaatcgccccgaatggaac
aagaggcatgatcgctcgatctggcaaaaacagacccggcagggtggaatagcgataaacatatcacgc
cgaaaaacatcgaagatgaagtcacatctgaaatggacgtccgggattttagccatacactcggaacgc
ggcatgaaaaaacaaaggcaaatatctggcgctgacgggaaaaaggaacaaaaggcccgataaacgtcaa
aacaggcatcgatagcctgaaacaactgggcatcacacatgtccaactgatgccgggtctttgctagca
atagcgtcgatgaaacggacccgcacacaagataactggggctatgacccgagaaattatgatgtcccg
gaaggccaatatgccacgaacgccaatggaaacgcccggtcaaagaatttaaagaaatggctcctgag
ccttcatagagaacatatcggcgtcaacatggacgtcgtctataaccatacgtttgccacacagatca
ggcactttgataaaaatcgtgccggaatattattatcgagcggatgacgccggcaattatacgaatggc
agcggcacaggaaatgaaatcgccgcccgaagaccgatgggtccagaaatttatcgcagacagccttaa
atattgggtcaacgaatatcatatcgacggctttcgctttgatctgatggcgctgctgggcaagata
caatgagcaaaagcggcgagcgaacttcattgctatcaatccgggcatcgctctttatggagaacctgg
acaggaggaacatcagcactgccggatgatcaactgctgacaaaaggcgcccaaaaaggaatgggagt
cgccgtctttaacgacaacctgagaaatgccctggatggcaacgtttttgatagcagcgcccaaggat
ttgctacaggagcgacaggactgacagatgccatcaaaaatggcgtcgaaggcagcatcaacgatttt
acaagcagcccgggagaaacgatcaattatgtcagagccatgacaactatacgtgtgggacaaaat
cgctctgagcaacccgaatgatagcgaagcggaccggatcaaaatggatgaactggcacaagcagtcg
tcatgacatcacaaggcgtcccgcttatgcaaggcgggagaagaaatgctgagaacgaaaggcggcaac
gacaacagctataatgccggcgatgccgtcaatgaatttgactggagccggaaagcacaatatccgga
cgtctttaactattattcaggacttatccatctgagactggaccatccggcgctttagaatgacgacgg
cgaacgaaatcaacagccatcttcagtttctgaacagcccgaaaatacggctgcctatgaactgacg
gaccatgtgaacaaagacaaatggggcaacatcatcgctcgtttataaccggaacaaaacggtcgccac
aatcaatcttccgagcggcgaatgggcaatcaatgccacaagcggcgaagtggagaaagcacactgg
gacaagcagaaggatcagccaagtcccggaatcagcatgatgatccttcataagaagtcagcccc
gaccacggcaaaaaa

```

FIGURA 7B

secuencia proteína PUL tipo silvestre

Negrita = secuencia señal amyL

Negro = secuencia PUL madura

MRQQKRLYARLLTLLFALIFLLPHSAASADGNTTTTIIIVHYFRPAGDYQPWSLWMWPKDGGGAHEYDFNQ
PADSLGAVASADIPGNPSQVGIIIVRTQDWTQDVSAADRYIDLSKGNEVWLVEGNSQIFYSEKDAEDAAK
PAVSNAYLDAASNQVLVKLSQPLTLGEGASGFTVHDDTANKDIPVTSVKDASLGQDVTAVLAGTFQHIF
GGSDWAPDNHSTLLKKVTNNLYQFSGDLPEGNYQYKVALNDSWNNPSYPSDNINLTVPAGGAHVTFSTY
IPSTHAVYDTINNPADLQVESGVKTDLVTVTLGEDPDVSHTLSIQTDGYQAKQVIPRNVLNSSQYYY
SGDDLGNITYTQKATTFKVVWAPTSTQVNVLLYDSATGSVTKIVPMTASGHGVWEATVNQNLNENWYYMYE
VTGQGSTRTAVDPYATAIAPNGTRGMIVDLAKTDPAGWNSDKHITPKNIEDEVIYEMDVDRDFSIDPNS
GMKNKGKYLALTEKGTGKPDNVKTGIDSLKQLGITHVQLMPVFASNSVDETDPTQDNWGYDPRNYDVP
EGQYATNANGNARIKEFKEMVLSLHREHIGVNMVNVNHTFATQISDFDKIVPEYYYRTDDAGNYTNG
SGTGNEIAAERPMVQKFIIDSLKYWVNEYHIDGFRFDLMALLGKDTMSKAASELHAINPGIALYGEPW
TGGTSALPDDQLLTGKAQKGMGVAVFNDNLRNALDGNVFDSSAQGFATGATGLTDAIKNGVEGSINDF
TSSPGETINYVTSHDNYTLWDKIALSNPNDEADRIKMDLAQAVVMTSQGVPFMGGGEMLRTKGGN
DNSYNAGDAVNEFDWSRKAQYPDVFNYYSGLIHLRLDHPAFRMTTANEINSHLQFLNSPENTVAYELT
DHVNKDKWGNIIVVYNPNKTVATINLPSGKWAINATSGKVGESTLGQAEGSVQVPGISMMILHQEVSP
DHGKK

FIGURA 8A

secuencia nucleótidos PULm194

Negrita = secuencia señal amyL

Negro = secuencia codificación PULm104 madura

atgaaacaacaaaaacggctttacgcccgattgctgacgctgttattttgcgctcatcttcttctgctgcc
tcattctgcagcttcagcagctgctaaaccggcagtcagcaacgcttatctggatgccagcaaccaag
tcctgggtcaaaactgagccaaccgctgacacttggagaaggagcgagcggatttacgggtccatgatgac
acggcgaacaaagatatcccggtcacgagcgttaaagatgctagcctgggccaagatgtcacagcagt
tctggcggggcagctttcaacatatctttggcggatcagattgggcaccggataatcacagcacgctgc
tgaaaaaagtacgaacaacctgtatcagtttagcggagatctgccggaaggcaactatcaatataaa
gtcgccctgaacgatagctggaacaatccgagctatccgagcgataacatcaatctgacagctcccggc
aggcggagcacatgtcacgcttagctatatcccgagcacacatgccgtctatgacacgatcaacaacc
cgaacgccgatcttcaagtcgaaagcggcgctcaaaacggatctgggtcacagtcacattggggagaagat
ccggatgtcagccatacactgagcatccaaacggatggctatcaagcgaaacaagtcaccccagaaaa
cgtcctgaacagcagccagttatttatagcggcgatgatctgggcaacacgtatacacaacaaagcga
cgacgtttaaagtttgggcgccgacaagcacacaagtcacagtcctgctgtatgattcagcaacaggc
agcgtcacaaaaaatcgtcccgatgacagcatcaggacatggagtctgggaagcgacgggtcaaccaaaa
cctggaaaactgggtatttatgtatgaagtcacggggccaaggatcaacaagaacagcgggtcgatccgt
atgctacagcaatcgccccgaatggaacaagaggcatgatcgtcgatctggcaaaaaacagaccgggca
ggctggaatagcgataaacatatcacgccgaaaaacatcgaagatgaagtcatttatgaaatggacgt
ccgggatttttagcatcgatccgaacagcggcatgaaaaacaaaggcaaatatctggcgctgacggaaa
aaggaaacaaaaggcccgataacgtcaaaacaggcatcgatagcctgaaacaactgggcatcacacat
gtccaactgatgccgggtctttgctagcaatagcgtcgatgaaacggacccgacacaagataaactgggg
ctatgacccgagaaattatgatgtcccggaaggccaatatgccacgaacgccaatggaaacgcccgga
tcaaagaatttaaagaaatggctcctgagccttcatagagaacatatcgggcgtcaacatggacgtcgtc
tataaccatacgtttgcccacacagatcagcgactttgataaaaatcgtgccggaatattattatcggac
ggatgacgcgggcaattatacgaatggcagcggcacaggaaatgaaatcgccgcccgaagaccgatgg
tccagaaatttatcatcgacagccttaaatattgggtcaacgaatatcatatcgacggctttcgcttt
gatctgatggcgctgctgggcaaagatacaatgagcaaagcggcgagcgaacttcatgctatcaatcc
gggcatcgctctttatggagaaccgtggacaggaggaacatcagcactgccggatgatcaactgctga
caaaaggcgcgccaaaaagggaatgggagtcgccgtctttaacgacaacctgagaaatgcctggatggc
aacgtttttgatagcagcgcccaaggatttgctacaggagcgacaggactgacagatgccatcaaaaa
tggcgtcgaaggcagcatcaacgattttacaagcagcccgggagagacgatcaattatgtcacgagcc
atgacaactatacgtgtgggacaaaatcgctctgagcaaccggaatgatagcgaagcggaccggatc
aaaatggatgaactggcacaagcagtcgtcatgacatcacaaggcgtcccgtttatgcaaggcggaga
agaaatgctgagaacgaaaggcggcaacgacaacagctataatgccggcgatgccgtcaatgaatttg
actggagcgggaaagcacaatatccggacgtctttaactattattcaggacttatccatctgagactg
gaccatccggcggttagaatgacgacggcgaaacgaaatcaacagccatcttcagtttctgaacagccc
ggaaaatacggctcgcttatgaactgacggaccatgtgaacaaagacaaatggggcaacatcatcgctcg
tttataacccgaacaaaacggctcgccacaatcaatcttccgagcggcgaatgggcaatcaatgccaca
agcggcgaagttggagaaagcacactgggacaagcagaaggatcagtcgaagtcccgggaatcagcat
gatgatccttcatcaagaagtacgcccggaccacggcaaaaaa

FIGURA 8B

secuencia proteína PULm104

Negrita = secuencia señal amyL

Negro = secuencia PULm104 madura

MRQQKRLYARLLTLL**FALIFLLPHSAASAAAKPAVSNAYLDASNQVLVKLSQPLTLGEGASGFTVHDD**
TANKDIPVTSVKDASLGQDVTAVLAGTFQHIFGGSDWAPDNHSTLLKKVTNNLYQFSGDLPEGNYQYK
VALNDSWNNPSYPSDNINLTVPAGGAHVTFYSYIPSTHAVYDTINNPADLQVESGVKTDLVTVTLGED
PDVSHTLSIQTDGYQAKQVI PRNVLNSSQYYYSGDDLGNTRYTQKATTFKVVWAPTSTQVNVLLYDSATG
SVTKIVPMTASGHGVWEATVNQNLENWYMYEVTGQGSSTRTAVDPYATAIAPNGTRGMIVDLAKTDP
GWNSDKHITPKNIEDEVIIYEMDVRFSDPNSGMKNKGKYLALTEKGTGKPDNVKTGIDSLKQLGITH
VQLMPVFASNSVDETDPTQDNWGYDPRNYDVPEGQYATNANGNARIKEFKEMVLSLHREHIGVNMDVV
YNHTFATQISDFDKIVPEYYYYRTDDAGNYTNGSGTGNEIAAERPMVQKFIIDSLKYWVNEYHIDGFRF
DLMALLGKDTMSKAASELHAINPGIALYGEPTWTGGTSALPDDQLLTGGAQKGMGVAVFNDNLRNALDG
NVFDSSAQGFATGATGLTDAIKNGVEGSINDFTSSPGETINYVTSHDNYTLWDKIALSNPNDSADRI
KMDELAQAVVMTSQGVPFMQGGEMLRTKGGNDNSYNAGDAVNEFDWSRKAQYPDVFNYYSGLIHLRL
DHPAFRMTTANEINSHLQFLNSPENTVAYELTDHVNKDKWGNIIVVYNPNKTVATINLPSGKWAINAT
SGKVGESTLGQAEGSVQVPGISMILHQEVSPDHGKK

FIGURA 9A

secuencia nucleótidos PUL E99Q_E103Q

Negrita = secuencia señal amyL

Negro = secuencia codificación PUL E99Q_E103Q madura

atgaaacaacaaaaacggcctttacgcccgcattgctgacgctgttattttgcgctcatcttcttgcgtgcc
tcattctgcagcttcagcagatggcaatacgcagcagcatcatcgctccattatttttagaccggcgggag
attatcaaccgtggagcctttggatgtggccgaaagatggaggaggagcggaatatgattttaaccag
ccggcagattcacttggagcagtcgcctcagcagatattccgggaaatccgagccaagtccggcatcat
cgtcagaacacaggattggacgaaagatgtcagcgccgatcgctatatcgatctgagcaaaggcaatg
aagtctggctggctgaaggcaacagccagatcttttatagcgaaaaagacgcccgaagatgctgctaaa
ccggcagtcagcaacgccttatctggatgccagcaaccaagtcctgggtcaaaactgagccaaccgctgac
acttggagaaggagcagcggtttacgggtccatgatgacacggcgcaacaaagatatcccggtcacga
gcgttaaagatgctagcctgggccaagatgtcacagcagttctggcgggcacgtttcaacatatcttt
ggcggtacagattgggcaccggataatcacagcagcgtgctgaaaaaagtcacgaacaacctgtatca
gttttagcggagatctgccggaaggcaactatcaatataaaagtcgccctgaacgatagctggaacaatc
cgagctatccgagcgataacatcaatctgacagtcgccggcaggcgagcacatgtcacgtttagctat
atcccgagcacacatgccgtctatgacacgatcaacaacccgaacgccgatcttcaagtcgaaagcgg
cgtcaaaacggatctgggtcacagtcacattgggagaagatccggatgtcagccatacactgagcatcc
aaacggatggctatcaagcgaaacaagtcaccccgagaaaacgctcctgaacagcagccagattattat
agcggcgatgatctgggcaacacgtatacacaaaaagcgacgacgtttaaagtttgggcgcggacaag
cacacaagtcaacgtcctgctgtatgattcagcaacaggcgagcgtcacaaaaatcgtcccgatgacag
catcaggacatggagtctgggaagcgacggtcaacaaaacctggaaaactgggtatttatgtatgaa
gtcacgggccaaggatcaacaagaacagcggtcgatccgtatgctacagcaatcgccccgaatggaac
aagaggcatgatcgctcgatctggcaaaaaacagaccggcagggtggaatagcgataaacatatcacgc
cgaaaaacatcgaagatgaagtcatctatgaaatggacgtccgggatttttagcatcgatccgaacagc
ggcatgaaaaacaaaggcaaatatctggcgctgacggaaaaaggaacaaaaggcccgataacgtcaa
aacaggcatcgatagcctgaaacaactgggcatcacacatgtccaactgatgccggctcttgcgtagca
atagcgtcgatgaaacggaccgcacacaagataactggggctatgacccgagaaattatgatgtcccg
gaaggccaatatgccacgaacgccaatggaaacgcccggatcaaagaatttaaagaaatggctcctgag
ccttcatagagaacatatcggcgtcaacatggacgtcgtctataaccatacgtttgccacacagatca
ggcactttgataaaatcgtgccggaatatattattatcgagcggatgacgcccggcaattatacgaatggc
agcggcacaggaaatgaaatcgccgcccgaagaccgatgggtccagaaatttatcatcgacagccttaa
atattgggtcaacgaatatcatatcgacggctttcgctttgatctgatggcgctgctgggcaagata
caatgagcaaagcggcgagcgaacttcatgctatcaatccgggcacgctctttatggagaaccgtgg
acaggaggaacatcagcactgccggatgatcaactgctgacaaaaggcgccaaaaagggaatgggagt
cgccgtctttaacgacaacctgagaaatgccctggatggcaacgtttttgatagcagcgcccaaggat
ttgctacaggagcgacaggactgacagatgccatcaaaaatggcgtcgaaggcagcatcaacgatttt
acaagcagcccgggagaaacgatcaattatgtcacgagccatgacaactatacgtgtgggacaaaat
cgctctgagcaacccgaatgatagcgaagcggaccggatcaaaatggatgaactggcacaagcagtcg
tcatgacatcacaaggcgtcccgtttatgcaaggcggagaagaaatgctgagaacgaaaggcggcaac
gacaacagctataatgccggcgatgccgtcaatgaatttgactggagcgggaaagcacaatatccgga
cgtctttaactattattcaggacttatccatctgagactggaccatccggcggtttagaatgacgacgg
cgaacgaaatcaacagccatcttcagtttctgaacagcccggaaaaatcgggtcgcttatgaactgacg
gacatgtgaacaaagacaaatggggcaacatcatcgctgtttataacccgaacaaaaacggtcgccac
aatcaatcttccgagcggcaaatgggcaatcaatgccacaagcggcaagttggagaaagcacactgg
gacaagcagaaggatcagtcgaagtcggggaatcagcatgatgatccttcatcaagaagtcagcccc
gaccacggcaaaaaa

FIGURA 9B

secuencia proteina PUL E99Q_E103Q

Negrita = secuencia señal amyL

Negro = secuencia PUL E99Q_E103Q madura

MKQQKRLYARLLTLLFALIFLLPHSAASADGNTTTTIIIVHYFRPAGDYQPWSLWMWPKDGGGA
EYDFNQPADSLGAVASADIPGNPSQVGIIIVRTQDWT KDVSADRYIDLSKGNEVWLVEGNSQI
FYSQKDAQDAKPAVSNA YLDASNQVLVKLSQPLTLGEGASGFTVHDDTANKDIPVTSVKDA
SLGQDVTAVLAGTFQHIFGGSDWAPDNHSTLLKKVTNNLYQFSGDLPEGNYQYKVALNDSWN
NPSYPSDNINLTV**PAGGAHVTF**SYIPSTHAVYDTINNPNADLQVESGVKTDLVTVT**LGEDPD**
VSHTLSIQTDGYQAKQVIPRNVLN**SSQ**YYS**GDDL**GN**TYTQKATTF**KVWAPTSTQVNVLLYD
SATGSVTKIVPMTASGHGVWEATVNQNLENWYMYEVTGQGSTRTAVDPYATAIAPNGTRGM
IVDLAKTDPAGWNSDKHITPKNIEDEVIYEMDVRDFSIDPNSGMKNKGKYLALTEKGTKGPD
NVKTGIDSLKQLGITHVQLMPVFASNSVDETDPTQDNWGYDPRNYDVPEGQYATNANGNARI
KEFKEMVLSLHREHIGVNMDVVYNHTFATQISDFDKIVPEYYYRTDDAGNYTNGSGTGNEIA
AERPMVQKFIIDSLKYWVNEYHIDGFRFDLMALLGKDTMSKAASELHAINPGIALYGE**PWTG**
GTSALPDDQLLTKGAQKGMGVAVFNDNLRNALDGNVFDSSAQGFATGATGLTDAIKNGVEGS
INDFTSSPGETINYVTSHDNYTLWDKIALSNPNDSEADRIKMDELAQAVVMTSQGVPFMQGG
EEMLRTKG**GNDNSYNAGDAVNEFDWSRKAQYPDVFN**YYSGLIHLRLDHPAFRMTTANEINSH
LQFLNSPENTVAYELTDHVNKDKWGNIIVVYNPNKTVATINLPSGKWAINATSGKVGESTLG
QAEGSVQVPGISMILHQEVSPDHGKK