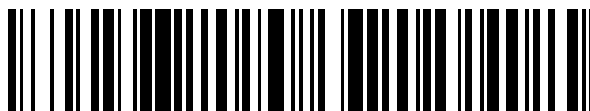


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 585 652**

51 Int. Cl.:

C12N 9/58

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.03.2012** **E 12722084 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.05.2016** **EP 2691520**

54 Título: **Enzima proteasa y usos de la misma**

30 Prioridad:

31.03.2011 FI 20115310

31.03.2011 US 201161470168 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
07.10.2016

73 Titular/es:

AB ENZYMES OY (100.0%)

Tykkimäentie 15b

05200 Rajamäki, FI

72 Inventor/es:

VALTAKARI, LEENA;

JUNTUNEN, KARI;

PALOHEIMO, MARJA y

OJAPALO, PENTTI

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 585 652 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

Enzima proteasa y usos de la misma.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a una enzima serina proteasa, en particular a una enzima serina proteasa fúngica que resulta útil en diversas aplicaciones, particularmente en detergentes. La invención se refiere a una molécula de ácidos nucleicos codificante de dicha enzima, un vector recombinante, una célula huésped para producir dicha enzima, una composición enzimática que comprende dicha enzima, así como un procedimiento para preparar dicha composición. La presente invención se refiere además a diversos usos de dicha enzima y a composiciones que comprenden dicha enzima.

Antecedentes

Las proteasas microbianas son de entre las enzimas hidrolíticas más importantes y encuentran aplicación en diversos sectores industriales, tales como detergentes, alimentos, cuero, medicamentos, diagnósticos, gestión de residuos y recuperación de plata. Las proteasas microbianas extracelulares constituyen la mayor parte de las ventas mundiales de enzimas industriales (Cherry y Fidantsef, 2003). Aproximadamente el 90% de las proteasas comerciales son enzimas de detergentes (Gupta *et al.*, 2002). Las preparaciones de detergentes comerciales utilizadas en la actualidad comprenden las serina proteasas alcalinas naturales (EC 3.4.21) de la familia de la subtilisina o subtilisinas (EC 3.4.21.62), originadas en especies de *Bacillus*, o son preparaciones de proteasas recombinantes de las mismas (Maurer, 2004).

Son ejemplos de proteasas comerciales, la subtilisina Carlsberg (Alcalase®), la subtilisina 309 (Savinase®), la subtilisina 147 (Esperase®), Kannase®, Everlase®, Ovozyme® y la proteasa de lavado en frío Polazyme® (Novozymes A/S, Dinamarca), Puraferc®, Puraferc® Ox, Puraferc® Primer y Properase® (Genencor Int., Inc., USA) y las series S y X de BLAP (Henkel, DE).

También se han aislado varias serina proteasas y genes codificantes de dichas enzimas a partir de organismos eucarióticos, incluyendo levaduras y hongos filamentosos. Las patentes US nº 3.652.399 y EP nº 519229 (Takeda Chemical Industries, Ltd., Japón) dan a conocer una proteasa alcalina del género *Fusarium* (estado asexual, teleomorfo) o *Gibberella* (estado sexual, anamorfo), en particular de *Fusarium* sp. S-19-5 (ATCC nº 20192, IFO 8884), *F. oxysporum* f. sp. *lini* (IFO 5880) o *G. saubineti* (ATCC nº 20193, IFO 6608), que resultan útiles en la formulación de detergentes y otras composiciones limpiadoras. El documento WO 1994/025583 (NovoNordisk A/S, Dinamarca) da a conocer una enzima proteasa de tipo tripsina activo que puede obtenerse de una especie de *Fusarium*, en particular de una cepa de *F. oxysporum* (DSM 2672) y la secuencia de ADN codificante del mismo. Las secuencias de aminoácidos y de nucleótidos de las serina proteasas de *F. equiseti* y de *F. acuminatum* se han dado a conocer en los documentos WO 2010/125174 y WO 2010/125175, respectivamente (AB Enzymes Oy, FI). Además, se ha informado de proteasas alcalinas de especies fúngicas tales como *Tritirachium* y *Conidiobolus* (revisión en Anwar y Saleemuddin, 1998).

El problema principal durante la utilización de las proteasas en los detergentes líquidos es su inestabilidad. En los detergentes líquidos, las enzimas entran en contacto directo con el agua y agentes caotrópicos tales como los surfactantes aniónicos y los agentes acomplejantes, los cuales pueden conducir a una desnaturalización irreversible. Las proteasas degradan las proteínas, incluyendo otras enzimas en las formulaciones de detergentes y sí mismos. La autoproteólisis resulta potenciada por los surfactantes y el calor. De esta manera, la estabilidad de los detergentes líquidos que contienen proteasas representa un importante reto en el desarrollo del producto (Maurer, 2010).

Se han utilizado diversos métodos para mejorar la estabilidad de las serina proteasas industriales. Los documentos WO 92/03529 (NovoNordisk A/K, Dinamarca), US 2009/096916 (Genencor Int. Inc., Estados Unidos) y WO 2007/145963 (Procter & Gamble Co., Estados Unidos) dan a conocer la utilización de un inhibidor de proteasa reversible de tipo péptido o proteína. Las composiciones de detergentes líquidas que comprenden proteasas con frecuencia incluyen inhibidores de proteasa tales como el ácido bórico con o sin polioles a fin de inhibir la actividad de las proteasas. Un ejemplo de dichos inhibidores es el ácido 4-formil-fenil-borónico (4-FPBA) dado a conocer en el documento US 2010/0120649 (Novozymes A/S, Dinamarca). La estabilidad de las proteasas también se ha mejorado mediante la utilización de una combinación de sales haluro y polioles (documento WO 02/08398, Genencor Int. Inc., Estados Unidos). El documento EP 0 352 244 A2 (NovoNordisk A/S, Dinamarca) sugiere mejorar la estabilidad de las enzimas derivadas de *Bacillus* utilizando compuestos anfotéricos, tales como surfactantes.

Basándose en la información obtenida de las estructuras cristalinas y las comparaciones de similitud de secuencias entre proteínas homólogas, pueden diseñarse variantes con una estabilidad y/o rendimiento mejorado. Se han desarrollado mediante mutagénesis dirigida a sitio y/o aleatoria variantes de las serina proteasas naturales con una eficiencia catalítica mejorada y/o una mejor estabilidad frente a la temperatura, los agentes oxidantes y diferentes condiciones de lavado, así como una estabilidad de almacenamiento mejorada en detergentes líquidos.

La termomicolina EC 3.4.21.65, aislada en forma de una endopeptidasa alcalina extracelular, es producida por un hongo termofílico, *Malbranchea pulcella* var. *sulfurea*. La termomicolina se describe como una proteína de cadena sencilla de 325 residuos. Presenta la secuencia de sitio activo -Leu-Ser-(Gly)-Thr-Ser*-Met-, que es típica de los miembros de la familia de la subtilisina. La termomicolina presenta un puente disulfuro, lo que es excepcional. La termomicolina no es tan termoestable como las serina proteasas extracelulares de las bacterias termofílicas pero es más estable que la mayoría de proteasas fúngicas (Gaucher y Stevenson, 2004). Según Ong y Gaucher (1975), la inactivación térmica de la termomicolina se produce a 73°C en presencia de Ca^{2+} 10 mM. La termomicolina hidroliza la caseína en un amplio intervalo de pH. El pH óptimo para la hidrólisis de la caseína es aproximadamente 8,5.

Abu-Shady *et al.* (2001) dan a conocer propiedades de una proteasa de *Malbranchea sulfurea* que es un aislado local de muestras de suelo recogidas de mataderos en Egipto y cultivados para obtener una enzima proteasa. Dicha publicación describe la actividad relativa de la proteasa de *M. sulfphurea* en presencia de determinados detergentes a concentraciones bajas (0,7%) a una temperatura de entre 30°C y 90°C utilizando un tiempo de preincubación de entre 15 y 60 min., es decir, bajo condiciones similares a las condiciones de lavado. Sin embargo, no proporciona ninguna indicación del rendimiento de eliminación de manchas o de la estabilidad de almacenamiento de dicha proteasa en el detergente mismo, lo que son propiedades esenciales para la idoneidad de uso de una proteasa en formulaciones de detergente. La publicación describe además los perfiles de temperatura y pH de una proteasa parcialmente purificada. La temperatura óptima de la proteasa es de 50°C y el pH óptimo es de 9,0.

A pesar del hecho de que se han publicado numerosas publicaciones de patente, revisiones y artículos que dan a conocer serina proteasas fúngicas de diversos microorganismos, por ejemplo las proteasas alcalinas de baja temperatura de microorganismos actinomicetos (*Nocardopsis dassonvillei*) y fúngicos (*Paecilomyces marquandii*), por ejemplo en las patentes EP 0 290 567 y 0 290 569 (Novo Nordisk A/S, Dinamarca), todavía existe una gran necesidad de nuevas proteasas que resulten adecuadas y eficaces para modificar, degradar y eliminar materiales proteicos de diferentes manchas, en particular en intervalos de temperatura baja o moderada, y que resulten estables en presencia de detergentes con propiedades altamente variables. Debido a la propiedad autocatalítica de las serina proteasas, la estabilidad durante el almacenamiento también resulta muy importante.

También resulta deseable que la serina proteasa pueda producirse en cantidades elevadas y pueda procesarse posteriormente a los costes más bajos posibles, mediante la separación fácil respecto del caldo de fermentación y los micelios.

Sumario de la invención

El objetivo de la presente invención es proporcionar una serina proteasa de origen fúngico que resulte activa en intervalos amplios de pH y que funcione particularmente bien a temperaturas bajas y moderadas. Las serina proteasas para la aplicación en detergentes también deben ser estables en presencia de detergentes y ser compatibles con los mismos. En particular, el objetivo de la invención es proporcionar una serina proteasa que sea capaz de eliminar materiales proteicos, incluyendo manchas durante el lavado de la ropa y la vajilla, a temperaturas más bajas que una preparación enzimática comercial, de manera que, por ejemplo, los materiales más sensibles puedan lavarse y ahorrarse energía. Son objetivos adicionales de la invención proporcionar una molécula de ácidos nucleicos codificante de dicha enzima, un vector recombinante, una célula huésped para producir dicha enzima, una composición que comprende dicha enzima, un procedimiento para preparar dicha composición, así como usos de dicha enzima y composiciones que comprenden dicha enzima.

La serina proteasa fúngica según la invención puede producirse en huéspedes fúngicos de alto rendimiento y su procesamiento posterior, por ejemplo la separación del caldo de fermentación y los micelios resultan fáciles de llevar a cabo.

Los elementos característicos de la invención se presentan en las reivindicaciones adjuntas.

Se da a conocer una enzima serina proteasa fúngica que presenta una actividad de serina proteasa y comprende una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de por lo menos 66% respecto a la secuencia de aminoácidos definida en SEC ID nº 18. Una serina proteasa preferente se obtiene de *Malbranchea cinnamomea* (Lib.) Oorschot de Hoog.

En el presente contexto, "obtenido de" pretende indicar no sólo una serina proteasa producida o producible por una cepa del organismo en cuestión, sino también una serina proteasa codificada por una secuencia de ADN aislada a partir de dicha cepa y producida en un organismo huésped transformado con dicha secuencia de ADN. Finalmente, la expresión pretende indicar una serina proteasa que está codificada por una secuencia de ADN de origen sintético y de ADNc y que presenta características identificativas de la serina proteasa en cuestión.

Además, se da a conocer una enzima serina proteasa fúngica que presenta una actividad de serina proteasa y comprende una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de por lo menos 66% respecto a la secuencia de aminoácidos de la proteasa madura de *Malbranchea* ALKO4122 tal como se define en SEC ID nº 18 o la

secuencia de aminoácidos de la proteasa madura de *Malbranchea* ALKO4122 tal como se define en SEC ID nº 18.

La enzima serina proteasa fúngica de la invención puede obtenerse de *Malbranchea*, preferentemente de *Malbranchea cinnamomea* (Lib.) Oorschot de Hoog (sinónimo de *Malbranchea pulchella* var. *sulfurea* (Miehe) Cooney y R. Emers.). Según la forma de realización particularmente preferente, la enzima serina proteasa de la invención puede obtenerse de la cepa *Malbranchea* ALKO4122 depositada bajo el número de acceso CBS 128533 o de la cepa *Malbranchea* ALKO4178 depositada con el número de acceso CBS 128564. La enzima proteasa de *Malbranchea* ALKO4178 es esencialmente idéntica a la enzima proteasa de la cepa *Malbranchea* ALKO4122.

La enzima serina proteasa fúngica presenta una masa molecular de entre 20 y 35 kDa. El óptimo de temperatura de la enzima según una forma de realización se encuentra comprendido entre el intervalo de entre 30°C y 80°C a pH 8,5, preferentemente a aproximadamente 70°C. Según una forma de realización, el óptimo de pH de la enzima se encuentra comprendido en el intervalo de entre 6 y 10 a 50°C, preferentemente a pH 10. Las características de temperatura y pH se determinaron utilizando un tiempo de reacción de 30 min. y caseína como sustrato.

La serina proteasa fúngica es capaz de degradar o eliminar manchas proteicas en presencia de detergentes a una temperatura de entre 0°C y 90°C, preferentemente a una temperatura de entre 5°C y 60°C, particularmente preferentemente a una temperatura de entre 10°C y 40°C.

La enzima serina proteasa fúngica de la invención se encuentra codificado por una secuencia polinucleótida aislada que se hibrida bajo condiciones restrictivas con una secuencia polinucleótida incluida en el plásmido pALK3092 que comprende la secuencia de nucleótidos SEC ID nº 11, depositada en *E. coli* RF8758 bajo el número de acceso DSM 24426 o con la secuencia codificante de la proteasa madura de ALKO4122, SEC ID nº 17. Alternativamente, la enzima serina proteasa fúngica de la invención está codificado por una secuencia polinucleótida aislada que se hibrida bajo condiciones restrictivas con una secuencia polinucleótida incluida en el plásmido pALK3093 que comprende la secuencia de nucleótidos SEC ID nº 12, depositada en *E. coli* RF8759 bajo el número de acceso DSM 24427.

Según una forma de realización, la enzima está codificada por una secuencia polinucleótida aislada que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de la proteasa madura de *Malbranchea* ALKO4122 tal como se define en SEC ID nº 18 o una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de por lo menos 66% respecto a la secuencia de aminoácidos de la proteasa madura de *Malbranchea* ALKO4122 tal como se define en SEC ID nº 18. Según una forma de realización, dicha enzima se encuentra codificada por una molécula de ácidos nucleicos aislada que comprende la secuencia de nucleótidos SEC ID nº 17.

La enzima serina proteasa fúngica de longitud completa de la invención se encuentra codificado por la secuencia polinucleótida incluida en pALK3094 depositada en *Escherichia coli* RF8791 bajo el número de acceso DSM 24410.

La enzima serina proteasa fúngica es producido a partir de un vector de expresión recombinante que comprende la molécula de ácidos nucleicos codificante de una serina proteasa fúngica de la invención operablemente ligado a secuencias reguladoras capaces de dirigir la expresión de la enzima serina proteasa en un huésped adecuado. Entre los huéspedes adecuados se incluyen huéspedes heterólogos, preferentemente huéspedes microbianos de los géneros *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Humicola*, *Chrysosporium*, *Neurospora*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Myceliophthora* y *Mortierella*.

Preferentemente dicha enzima es producida en *Trichoderma* o *Aspergillus*, más preferentemente en *T. reesei*.

Según una forma de realización también una molécula de ácidos nucleicos aislada que comprende una secuencia polinucleótida codificante de una enzima serina proteasa seleccionada de entre el grupo que consiste en:

- (a) una molécula de ácidos nucleicos codificante de un polipéptido con actividad de serina proteasa y que comprende la secuencia de aminoácidos tal como se ilustra en SEC ID nº 18,
- (b) una molécula de ácidos nucleicos codificante de un polipéptido que presenta una actividad de serina proteasa y una identidad de por lo menos 66% respecto a la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 18,
- (c) una molécula de ácidos nucleicos que comprende la secuencia codificante de la secuencia de nucleótidos descrita en SEC ID nº 17,
- (d) una molécula de ácidos nucleicos que comprende la secuencia codificante de la secuencia polinucleótida contenida en DSM 24410,
- (e) una molécula de ácidos nucleicos la secuencia codificante de la cual difiere de la secuencia codificante de una molécula de ácidos nucleicos según cualquiera de (c) a (d) debido a la degeneración del código genético,

- (f) una molécula de ácidos nucleicos hibridante bajo condiciones restrictivas con una molécula de ácidos nucleicos contenida en DSM 24426, o SEC ID nº 17 codificante de un polipéptido con actividad de serina proteasa y una secuencia de aminoácidos que muestra una identidad de por lo menos 66% respecto a la secuencia de aminoácidos tal como se ilustra en SEC ID nº 18.

La invención se refiere además a un vector de expresión recombinante que comprende la secuencia de nucleótidos de la invención operablemente ligada a secuencias reguladoras capaces de dirigir la expresión de dicho gen de serina proteasa en un huésped adecuado. Entre los huéspedes adecuados se incluyen huéspedes heterólogos, preferentemente huéspedes microbianos de los géneros *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Humicola*, *Chrysosporium*, *Neurospora*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Myceliophthora* y *Mortierella*. Preferentemente, dicha enzima es producida en *Trichoderma* o *Aspergillus*, más preferentemente en *T. reesei*.

La invención se refiere además a una célula huésped que comprende el vector de expresión recombinante tal como se ha indicado anteriormente. Preferentemente, la célula huésped es un huésped microbiano, tal como un hongo filamentoso. Los huéspedes preferentes son de un género de entre *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Humicola*, *Chrysosporium*, *Neurospora*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Myceliophthora* y *Mortierella*.

Más preferentemente, el huésped es *Trichoderma* o *Aspergillus*, más preferentemente el hongo filamentoso *T. reesei*.

Además, se proporciona un procedimiento para producir un polipéptido que presenta una actividad de serina proteasa, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de cultivar la célula huésped de la invención y recuperar el polipéptido. Además, se proporciona un polipéptido que presenta una actividad de serina proteasa codificada por la secuencia de ácidos nucleicos de la invención y que puede obtenerse mediante el procedimiento indicado anteriormente.

Además, se proporciona un procedimiento para obtener una preparación enzimática que comprende las etapas de cultivar una célula huésped de la invención y recuperar el polipéptido a partir de las células o separar las células del medio de cultivo y obtener el sobrenadante. Además, se proporciona una preparación enzimática que puede obtenerse mediante el procedimiento indicado anteriormente.

La invención se refiere a una preparación enzimática que comprende la enzima serina proteasa de la invención.

La invención se refiere además a una composición que comprende la enzima serina proteasa de la invención.

La preparación o composición enzimática (por ejemplo la formulación de detergente) que contiene la enzima proteasa de la invención puede comprender además otras enzimas seleccionadas de entre el grupo que consiste en proteasas (otras proteasas aparte de la de la invención), amilasas, celulasas, lipasas, xilanasas, mananasas, cutinasas, pectinasas y oxidasas con o sin un mediador, así como aditivos adecuados seleccionados de entre el grupo que consiste en estabilizadores, tampones, surfactantes, agentes blanqueadores, mediadores, agentes anticorrosión, mejoradores de detergente, agentes anti-redeposición, abrillantadores ópticos, tintes, pigmentos, perfumes, sustancias cáusticas, abrasivos y conservantes, etc.

El medio de cultivo agotado del huésped de producción puede utilizarse sin modificación, o pueden separarse las células huésped y/o concentrarse, filtrarse o fraccionarse. También pueden secarse. La preparación enzimática y la composición que comprende la enzima serina proteasa de la invención puede encontrarse en forma de líquido, polvos, granulado o tabletas. La enzima puede encontrarse en forma inmovilizada en la preparación o en la composición.

También se encuentra comprendida en la invención la utilización de la enzima serina proteasa o la preparación enzimática de la invención para detergentes, para tratar fibras, para tratar material proteico, tal como lana, pelo, cuero, seda, para el tratamiento de alimentos o piensos, o para cualesquiera aplicaciones que impliquen la modificación, degradación o eliminación de material proteico. En particular, la enzima o preparación enzimática resulta útil como aditivo detergente en líquidos detergentes, polvos detergentes y pastillas de detergente.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 (1A y 1B) muestra la secuencia de nucleótidos del gen de la proteasa de *Malbranchea* ALKO4122, su promotor parcial (50 nucleótidos cadena arriba de ATG) y las secuencias de terminador (60 nucleótidos cadena abajo del codón de parada) y la secuencia de aminoácidos deducida de la proteasa codificada. El péptido de señal putativo, analizado con el programa SignalP V3.0 se muestra en minúsculas y subrayado. La secuencia pro y los aminoácidos deducidos de la secuencia pro se muestran en letra minúscula. Las secuencias maduras de nucleótidos y peptídica se muestran en letra mayúscula. Las tres secuencias intrónicas putativas se muestran en minúscula, cursiva y señaladas con una línea de puntos bajo la secuencia de nucleótidos. El codón de parada se muestra con un asterisco bajo la secuencia. Las localizaciones de los cebadores DET27 (cebador de sentido 5', s) y DET28 (cebador antisentido 3', as) utilizados en la clonación por PCR del gen de proteasa de *Malbranchea*

ALKO4178 se muestran subrayadas con línea doble.

La figura 1A muestra la secuencia de nucleótidos del gen de proteasa de *Malbranchea* ALKO4122 y su promotor parcial. La secuencia del gen de la proteasa incluye los nucleótidos 51 a 960, la región de secuencia codificante de la secuencia de aminoácidos entre Met 1 y Val 279 y el primer codón de Ala 280 de la proteasa.

La figura 1B muestra la secuencia de nucleótidos del gen de proteasa de *Malbranchea* ALKO4122 y su terminador parcial. La secuencia del gen de proteasa incluye los nucleótidos 961 a 1.486 (incluido el codón de parada TAA), la región de secuencia codificante de la secuencia de aminoácidos entre Ala 280 (los dos últimos codones) y Arg 401 de la proteasa.

La figura 2 muestra esquemáticamente el mapa del plásmido pALK2777 utilizado como esqueleto para la construcción del casete de expresión pALK3097. El gen de la proteasa de *Malbranchea* se ligó entre el promotor *cbhl* (*cel7A*) (fusión exacta mediante el sitio *SacII*) y las secuencias de terminador (mediante el sitio *BamHI* en el conector) en pALK2777 cortado con *SacII*-*BamHI*. Para más información ver el Ejemplo 2. El plásmido pALK2777 incluye un gen marcador *amdS* sintético para el cribado de transformantes. *pcb1*, promotor *cbh1*; *tcb1*, terminador *cbh1*; *s_amdS*, gen marcador *amdS* sintético (ADNc); Conector, secuencia de conector, incluyendo, por ejemplo, el sitio *BamHI*.

La figura 3 muestra esquemáticamente el casete pALK3097 aislado a partir del esqueleto del vector mediante digestión con *NotI* y utilizado para expresar el gen de proteasa de *Malbranchea* ALKO4122 en *Trichoderma reesei*. *pcb1*, promotor *cbh1*; *tcb1*, terminador *cbh1*; *s_amdS*, gen marcador *amdS* sintético (ADNc); Conector, secuencia de conector.

La figura 4 muestra la proteína recombinante parcialmente purificada analizada en gel de SDS-PAGE al 12%. Carril 1: muestra de la proteasa parcialmente purificada de *Malbranchea*. Carril 2: marcador de PM (escala de proteínas no teñida Page Ruler, Fermentas).

La figura 5 (5A y 5B) muestra la actividad relativa de la enzima a diferentes temperaturas y valores del pH.

La figura 5A describe el perfil de temperatura de la proteasa recombinante de *Malbranchea* y Savinase® 16L sometida a ensayo a pH 8,5 utilizando un tiempo de reacción de 30 min. y caseína como sustrato. Los puntos de datos son medias de tres mediciones independientes.

La figura 5B describe el efecto del pH sobre la actividad de la proteasa recombinante de *Malbranchea* y Savinase® 16L. El tampón utilizado era tampón de Britton-Robinson 40 mM; se utilizó caseína como sustrato; el tiempo de reacción era de 30 min. y la temperatura de reacción era de 50°C. Los puntos de datos son medias de tres mediciones independientes.

La figura 6 (6A, 6B, 6C y 6D) describe el rendimiento de eliminación de manchas de la proteasa recombinante de *Malbranchea* ALKO4122 sobre una mancha de sangre/leche/tinta (Art. 117, CO+PES, nº de serie 11-08, nuevo lote, EMPA) a una temperatura de entre 10°C y 50°C, pH aprox. 8, 60 min. en presencia de detergente líquido comercial con una concentración de 5 g/l. Se utilizaron las preparaciones comerciales de proteasa Savinase® 16L y Savinase® Ultra 16L a título comparativo.

La figura 6A describe el rendimiento de eliminación de manchas a 10°C.

La figura 6B describe el rendimiento de eliminación de manchas a 20°C.

La figura 6C describe el rendimiento de eliminación de manchas a 30°C.

La figura 6D describe el rendimiento de eliminación de manchas a 50°C.

La figura 7 (7A, 7B, 7D y 7C) describen el rendimiento de eliminación de manchas de la proteasa recombinante de *Malbranchea* ALKO4122 sobre una mancha de sangre/leche/tinta (Art. 117, CO+PES, nº de serie 10-07, lote antiguo, EMPA) a una temperatura de entre 10°C y 50°C, pH aprox. de 8, 60 min. en presencia de detergente líquido comercial con una concentración de 5 g/l. Se utilizó Savinase® 16L a título comparativo.

La figura 7A describe el rendimiento de eliminación de manchas a 10°C.

La figura 7B describe el rendimiento de eliminación de manchas a 20°C.

La figura 7C describe el rendimiento de eliminación de manchas a 30°C.

La figura 7D describe el rendimiento de eliminación de manchas a 50°C.

- La figura 8 (8A, 8B, 8C y 8D) describe el rendimiento de eliminación de manchas de la proteasa recombinante de *Malbranchea* ALKO412 sobre una mancha de sangre/leche/tinta (Art. 117, CO+PES, nº de serie 11-08, nuevo lote, EMPA) a una temperatura de entre 10°C y 50°C, pH aprox. de 8, 60 min. en presencia de detergente líquido comercial con una concentración de 5 g/l. Se utilizó Savinase® 16L y Savinase® Ultra 16L a título comparativo.
- La figura 8A describe el rendimiento de eliminación de manchas a 10°C (dosis enzimática calculada como proteína).
- La figura 8B describe el rendimiento de eliminación de manchas a 20°C (dosis enzimática calculada como proteína).
- La figura 8C describe el rendimiento de eliminación de manchas a 30°C (dosis enzimática calculada como proteína).
- La figura 8D describe el rendimiento de eliminación de manchas a 50°C (dosis enzimática calculada como proteína).
- La figura 9 (9A, 9B, 9C, 9D, 9E, 9F, 9G y 9H) muestra el rendimiento de la proteasa recombinante de *Malbranchea* ALKO4122 con diferentes manchas en ensayos de Launder-O-meter, en presencia de detergente líquido comercial con una concentración de 5 g/l a 30°C y a 60°C, durante 60 min., pH aprox. de 8. Se utilizó la preparación comercial Savinase® Ultra 16L a título comparativo.
- La figura 9A muestra el rendimiento sobre hierba, algodón, Art. 164 (nº de serie 23-03), EMPA a 30°C.
- La figura 9B muestra el rendimiento sobre hierba, algodón, Art. 164 (nº de serie 23-03), EMPA a 60°C.
- La figura 9C muestra el rendimiento sobre sangre/leche/tinta, algodón, Art. 116 (nº de serie 18-16), EMPA a 30°C.
- La figura 9D muestra el rendimiento sobre sangre/leche/tinta, algodón, Art. 116 (nº de serie 18-16), EMPA, a 60°C.
- La figura 9E muestra el rendimiento sobre sangre/leche/tinta, CO+PES, Art. 117 (nº de serie 11-08, nuevo lote), EMPA, a 30°C.
- La figura 9F muestra el rendimiento sobre sangre/leche/tinta, CO+PES, Art. 117 (nº de serie 11-08, nuevo lote), EMPA, a 60°C.
- La figura 9G muestra el rendimiento sobre sangre/leche/tinta, CO+PES, Art. 117 (nº de serie 10-07, lote antiguo), EMPA a 30°C.
- La figura 9H muestra el rendimiento sobre sangre/leche/tinta, CO+PES, Art. 117 (nº de serie 10-07, lote antiguo), EMPA a 60°C.
- La figura 10 (10A y 10B) muestra el rendimiento de la proteasa en presencia de detergente en polvo.
- La figura 10A describe el rendimiento de la proteasa recombinante de *Malbranchea* ALKO4122 sobre sangre/leche/tinta, CO+PES, Art. 117 (nº de serie 11-08), EMPA en presencia de detergente en polvo tradicional comercial (descrito en el Ejemplo 8), 5 g/l a 50°C, durante 60 min., pH aprox. de 10,5. Se utilizó Savinase® Ultra 16L a título comparativo.
- La figura 10B describe el rendimiento de la proteasa recombinante de *Malbranchea* ALKO4122 sobre sangre/leche/tinta, CO+PES, Art. 117 (nº de serie 11-08), EMPA en presencia de detergente en polvo, Art. 601, EMPA, 5 g/l a 50°C, durante 60 min., pH aprox. de 10. Se utilizó Savinase® Ultra 16L a título comparativo.
- La figura 11 (11A y 11B) muestra la estabilidad de la proteasa durante el almacenamiento a 37°C.
- La figura 11A muestra la estabilidad de la proteasa recombinante de *Malbranchea* ALKO4122 durante el almacenamiento a 37°C, al conservarla/estabilizarla con Proxel LV o propilenglicol (PG).
- La figura 11B muestra la estabilidad de la proteasa recombinante Fe_RF6318 (documento WO 2010/125174A1) durante el almacenamiento a 37°C al conservarla/estabilizarla con Proxel LV o propilenglicol.
- La figura 12 (12A y 12B) muestra la estabilidad de la proteasa en detergente.
- La figura 12A muestra la estabilidad de la proteasa recombinante de *Malbranchea* ALKO4122 en detergente de

referencia con etiqueta ecológica, a 37°C y pH aprox. de 7. Se utilizó la preparación comercial Savinase® Ultra 16L y la proteasa recombinante Fe_RF6318 (documento WO 2010/125174A1) a título comparativo. La cantidad de preparación enzimática utilizada en el detergente era de 4% (p/p).

5 La figura 12B muestra la estabilidad de la proteasa de *Malbranchea* ALKO4122 en detergente líquido comercial a 37°C (pH aprox. de 8). Se utilizó la preparación comercial Savinase® Ultra 16L y la proteasa recombinante Fe_RF6318 (documento WO 2010/125174A1) a título comparativo. La cantidad de preparación enzimática utilizada en el detergente era de 4% (p/p).

10 Listado de secuencias

SEC ID nº 1 Secuencia de cebador sentido DET1 utilizado en la PCR para la síntesis de sonda proteasa de *Malbranchea*.

15 SEC ID nº 2 Secuencia de cebador sentido DET2 utilizado en la PCR para la síntesis de sonda proteasa de *Malbranchea*.

SEC ID nº 3 Secuencia de cebador antisentido DET3 utilizado en la PCR para la síntesis de sonda proteasa de *Malbranchea*.

20 SEC ID nº 4 Secuencia de cebador antisentido DET4 utilizado en la PCR para la síntesis de sonda proteasa de *Malbranchea*.

25 SEC ID nº 5 Secuencia de cebador antisentido DET5 utilizado en la PCR para la síntesis de sonda proteasa de *Malbranchea*.

SEC ID nº 6 Secuencia de un péptido de consenso utilizado para el diseño del cebador sentido de PCR DET1.

SEC ID nº 7 Secuencia de un péptido de consenso utilizado para el diseño del cebador sentido de PCR DET2.

30 SEC ID nº 8 Secuencia de un péptido de consenso utilizado para el diseño del cebador antisentido de PCR DET3.

35 SEC ID nº 9 Secuencia de un péptido de consenso utilizado para el diseño del cebador antisentido de PCR DET4.

SEC ID nº 10 Secuencia del péptido utilizado para el diseño del cebador sentido de PCR DET5.

40 SEC ID nº 11 Secuencia del fragmento de PCR obtenido utilizando DET5 y DET4 en una reacción de PCR y ADN genómico de *Malbranchea* ALKO4122 como molde. Este fragmento contiene un gen de proteasa parcial de *Malbranchea* y una inserción en el plásmido pALK3092.

45 SEC ID nº 12 Secuencia del fragmento de PCR obtenido utilizando DET5 y DET4 en una reacción de PCR y ADN genómico de *Malbranchea* ALKO4178 como molde. Este fragmento contiene un gen de proteasa parcial de *Malbranchea* y una inserción en el plásmido pALK3093.

50 SEC ID nº 13 Secuencia de nucleótidos codificante de la secuencia de aminoácidos de longitud completa de la proteasa de *Malbranchea* ALKO4122. El gen de longitud completa se encuentra incluido en el plásmido pALK3094. Las secuencia del gen de proteasa clonado a partir de *Malbranchea* ALKO4178 mediante PCR era idéntica a dicha secuencia.

SEC ID nº 14 Secuencia de aminoácidos de longitud completa de la proteasa de *Malbranchea* ALKO4122, incluyendo los aminoácidos Met1 a Arg401 de la proteasa de longitud completa.

55 SEC ID nº 15 Secuencia de nucleótidos codificante de la secuencia de aminoácidos de la forma proenzima de la proteasa de *Malbranchea* ALKO4122.

SEC ID nº 16 Secuencia de aminoácidos de la forma proenzima de la proteasa de *Malbranchea* ALKO4122, incluyendo los aminoácidos Gly21 a Arg401 de la proteasa de longitud completa.

60 SEC ID nº 17 Secuencia de nucleótidos codificante de la secuencia de aminoácidos de la forma madura de la proteasa de *Malbranchea* ALKO4122.

65 SEC ID nº 18 Secuencia de aminoácidos de la forma madura de la proteasa de *Malbranchea* ALKO4122, incluyendo los aminoácidos Ala121 a Arg401 de la enzima de longitud completa.

SEC ID nº 19 Secuencia del cebador sentido de PCR DET27 utilizado para la clonación del gen de proteasa de *Malbranchea* ALKO4178.

5 SEC ID nº 20 Secuencia del cebador antisentido de PCR DET28 utilizado para la clonación del gen de proteasa de *Malbranchea* ALKO4178.

SEC ID nº 21 Secuencia del cebador sentido de PCR DET17 utilizado en la construcción del casete de expresión en pALK3097.

10 SEC ID nº 22 Secuencia del cebador antisentido de PCR DET18 utilizado en la construcción del casete de expresión en pALK3097.

Depósitos

15 Se depositó *Malbranchea* ALKO4122 en el Centraalbureau Voor Schimmelcultures en Uppsalalaan 8, 3508 AD, Utrecht, Países Bajos, el 20 de diciembre de 2010, y se le asignó el número de acceso CBS 128533.

20 Se depositó *Malbranchea* ALKO4178 en el Centraalbureau Voor Schimmelcultures en Uppsalalaan 8, 3508 AD, Utrecht, Países Bajos, el 5 de enero de 2011, y se le asignó el número de acceso CBS 128564.

La cepa RF8791 de *E. coli* que incluía el plásmido pALK3094 se depositó en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Inhoffenstrasse 7 B, D-38124 Braunschweig, Alemania, el 20 de diciembre de 2010 y se le asignó el número de acceso DSM 24410.

25 La cepa RF8758 de *E. coli* que incluía el plásmido pALK3092 se depositó en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Inhoffenstrasse 7 B, D-38124 Braunschweig, Alemania, el 3 de enero de 2010 y se le asignó el número de acceso DSM 24426.

30 La cepa RF8759 de *E. coli* que incluía el plásmido pALK3093 se depositó en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Inhoffenstrasse 7 B, D-38124 Braunschweig, Alemania, el 3 de enero de 2010 y se le asignó el número de acceso DSM 24427.

Descripción detallada

35 La presente invención proporciona una enzima serina proteasa de origen fúngico. Esta proteasa es activa en un amplio intervalo de pH y presenta un amplio óptimo de temperatura en el lavado y un rendimiento particularmente bueno en intervalos de temperatura baja, así como a temperaturas moderadas y altas. La enzima resulta ideal para aplicaciones de detergentes, incluyendo composiciones de detergente típicas y resulta eficaz a niveles bajos de enzima en soluciones de detergente. En particular, se da a conocer una proteasa que es activa a temperaturas de aplicación de entre 0°C y 90°C, siendo el intervalo preferente de entre 5°C y 60°C, más preferentemente de entre 10°C y 40°C. La proteasa de la invención también es altamente estable en composiciones de detergente líquido. De esta manera, la presente invención proporciona una nueva serina proteasa para la utilización en detergentes y otras aplicaciones, en particular en formulaciones líquidas. La serina proteasa fúngica puede producirse en huéspedes fúngicos de alto rendimiento y su procesamiento posterior, por ejemplo la separación del caldo de fermentación y los micelios, es de sencilla ejecución.

50 En particular, se proporciona una enzima serina proteasa que presenta una actividad de serina proteasa y comprende una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de por lo menos 66% respecto a la secuencia de aminoácidos definida en SEC ID nº 18. Preferentemente la presente invención proporciona una enzima serina proteasa fúngica que presenta una actividad de serina proteasa y comprende una secuencia de aminoácidos tal como se define en SEC ID nº 18. Una serina proteasa preferente se deriva de *Malbranchea cinnamomea* (Lib.) Oorschot de Hoog.

55 La expresión "serina proteasa" o "serina endopeptidasa" o "serina endoproteinasa" se refiere, en relación a la presente invención, a una enzima clasificada como EC 3.4.21 por la nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular.

60 Las proteasas pueden clasificarse utilizando inhibidores específicos de grupo. El grupo diverso de inhibidores de serina proteasa incluye inhibidores químicos sintéticos e inhibidores proteicos naturales. De esta manera, la actividad de serina proteasa puede determinarse en un ensayo basado en el corte de un sustrato específico o en un ensayo que utiliza cualquier sustrato que contiene proteína con o sin un inhibidor específico de serina proteasas bajo condiciones adecuadas.

65 La expresión "actividad de serina proteasa" tal como se utiliza en la invención se refiere a actividad hidrolítica sobre sustratos que contienen proteínas, por ejemplo caseína, hemoglobina y ASB. Los métodos de análisis de la actividad proteolítica son bien conocidos de la literatura y se hace referencia a ellos en, por ejemplo, Gupta *et al.* (2002).

Las serina proteasas se sintetizan en forma de precursores zimogénicos inactivos o zimógenos en forma de un preproenzima, que resulta activado mediante la eliminación de la secuencia de señal (péptido o prepéptido de señal de secreción) y la prosequencia (propéptido), rindiendo una forma madura activa de la enzima (Chen e Inouye, 2008). Este proceso de activación implica la acción de proteasas y puede resultar del procesamiento autodigestivo o autocatalítico limitado de la serina proteasa, por ejemplo durante las etapas post-traduccionales de la producción o en el medio de cultivo agotado, o durante el almacenamiento del medio de cultivo o preparación de enzima. La activación del proenzima también puede llevarse a cabo mediante la adición de una enzima proteolítica capaz de convertir la proenzima inactiva en enzima maduro activo en el medio de cultivo durante o después del cultivo del organismo huésped. El acortamiento de la enzima también puede llevarse a cabo mediante, por ejemplo, el truncado del gen codificante del polipéptido antes de transformarlo en el huésped de producción. La "forma prepro" de la serina proteasa en la presente invención se refiere a una enzima que comprende los pre- y pro-péptidos. La "proforma" se refiere a una enzima que comprende el propéptido pero que no presenta el prepéptido (secuencia de señal).

El término "maduro" se refiere a la forma de la enzima serina proteasa que, tras la eliminación de la secuencia de señal (prepéptido) y el propéptido comprende los aminoácidos esenciales para la actividad enzimática o catalítica. En los hongos filamentosos es la forma nativa secretada al medio de cultivo. El primer aminoácido de la secuencia madura puede determinarse mediante secuenciación N-terminal de la proteasa secretada. En el caso de que no se disponga de datos bioquímicos, la localización del extremo N-terminal puede estimarse mediante alineación de la secuencia de aminoácidos con la secuencia o secuencias de aminoácidos maduras de la proteína o proteínas homólogas. La alineación puede llevarse a cabo utilizando, por ejemplo, la alineación de ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>).

El grupo más grande de serina proteasas comerciales son las "serina proteasas alcalinas", que se refiere a que las enzimas se encuentran activas y son estables a un pH de entre 9 y 11 o incluso de entre 10 y 12,5 (Shimogaki *et al.*, 1991) y presentan un punto isoeléctrico de aproximadamente 9. La determinación del pH óptimo de la actividad catalítica puede llevarse a cabo en un tampón adecuado a diferentes valores del pH mediante el seguimiento de la actividad sobre un sustrato proteína. Típicamente las proteasas de detergente funcionan óptimamente en el caso de que el valor del pH de la solución de detergente en la que trabaja sea aproximadamente igual al valor del pI de la enzima. El pI puede determinarse mediante enfoque isoeléctrico en un gel de gradiente de pH inmovilizado compuesto de poliácridamida, almidón o agarosa o mediante la estimación del pI a partir de la secuencia de aminoácidos, por ejemplo mediante la utilización de la herramienta de pI/PM en el servidor de ExPASy (http://expasy.org/tools/pi_tool.html; Gasteiger *et al.*, 2003).

Las masas moleculares de las serina proteasas alcalinas maduras se encuentran comprendidas entre 15 y 35 kDa, típicamente entre aproximadamente 25 y 30 kDa (Rao *et al.*, 1998). La masa molecular de la serina proteasa puede determinarse mediante espectrometría de masas o en SDS-PAGE según Laemmli (1970). La masa molecular también puede predecirse a partir de la secuencia de aminoácidos de la enzima.

Los óptimos de temperatura de la mayoría de serina proteasas naturales se encuentran en torno a 60°C (Rao *et al.*, 1998). El óptimo de temperatura de una serina proteasa puede determinarse en un tampón adecuado a diferentes temperaturas con el sustrato caseína, tal como se indica en el Ejemplo 3 o mediante la utilización de otros sustratos y sistemas de tampón indicados en la literatura (Gupta *et al.*, 2002).

La serina proteasa de *Malbranchea* recombinante madura según la invención presenta un peso molecular de aproximadamente 29 kDa, una temperatura óptima de aproximadamente 70°C a pH 8,5 utilizando un tiempo de reacción de 30 min. y caseína como sustrato y activa en un intervalo de pH alcalino, tal como pH 10, a 50°C utilizando un tiempo de reacción de 30 min. y caseína como sustrato. La serina proteasa de *Malbranchea* recombinante presenta un buen comportamiento en presencia de detergentes con propiedades altamente variables, en amplios intervalos de temperatura, es decir, de baja a moderada e incluso alta temperatura. La serina proteasa de *Malbranchea* recombinante, dependiendo de las condiciones de lavado y los ingredientes auxiliares y aditivos en los detergentes, resulta útil particularmente a temperaturas iguales o inferiores a 60°C.

Con el fin de mejorar el comportamiento de la serina proteasa de *Malbranchea* en diversas aplicaciones industriales, tal como en detergentes, resulta deseable mejorar las propiedades de la enzima nativa. Entre estas propiedades se incluyen, por ejemplo, la estabilidad de almacenamiento, la estabilidad en presencia o en ausencia de detergentes, la estabilidad frente al pH, la estabilidad o resistencia oxidativa frente a agentes blanqueadores y la especificidad de sustrato. La actividad autoproteolítica de la enzima presenta un efecto sobre la estabilidad de almacenamiento y debe ser tan baja como resulte posible. También resulta evidente que, por ejemplo en composiciones para lavandería y lavado de vajillas, el rendimiento de lavado de la proteasa modificada no debe resultar perjudicado en comparación con la enzima proteasa parental o precursor. En otras palabras, resulta deseable que las variantes de la enzima presenten un rendimiento de lavado y propiedades de eliminación de manchas similares o incluso mejorados en comparación con la serina proteasa parental.

Las enzimas proteasas producidas, en particular las serina proteasas, pueden purificarse mediante la utilización de

métodos convencionales de la química de las enzimas, tales como la preparación de sales, la ultrafiltración, la cromatografía de intercambio iónico, la cromatografía de afinidad, la filtración en gel y la cromatografía de interacción hidrofóbica. Puede llevarse a cabo un seguimiento de la purificación mediante la determinación de las proteínas, ensayos de actividad enzimática y mediante electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida. Pueden determinarse la actividad y estabilidad enzimáticas de la enzima purificada a diversas temperaturas y valores del pH, así como la masa molecular y punto isoelectrico.

En el Ejemplo 4 se demuestra la purificación de una serina proteasa recombinante de la presente invención. El sobrenadante de cultivo centrifugado y filtrado se aplicó a una columna desaladora HiPrep 26/10 (de GE Healthcare) equilibrada en MES 20 mM, pH 5,3. Se aplicó una muestra filtrada en gel a una columna de 1 ml de S Sepharose HP (de GE Healthcare) equilibrada en MES 20 mM, pH 5,3. Se eluyeron las proteínas utilizando un gradiente creciente de NaCl (0,5 M). Se agruparon las fracciones que contenían proteasa y se concentraron utilizando dispositivos de filtración centrífuga Amicon Ultra-4 10.000 CO Millipore. Se purificó adicionalmente una muestra utilizando una columna de filtración en gel Superdex 75 equilibrada con MES 20 mM, NaCl 150 mM, pH 5,3. Se agruparon las fracciones que contenían proteasa. Se analizó una muestra final en gel de SDS-PAGE, figura 4. Naturalmente resulta posible separar la enzima de la presente invención mediante la utilización alternativa de otros métodos de purificación conocidos o adicionalmente a los métodos descritos en la presente memoria. La serina proteasa recombinante se purificó tal como se indica en el Ejemplo 4 y se utilizó para la caracterización de los perfiles de pH y temperatura tal como se indica en el Ejemplo 5.

La actividad de las proteasas se basa generalmente en la degradación de los sustratos solubles. En las aplicaciones de detergentes, las proteasas deben trabajar sobre sustancias que son por lo menos parcialmente insolubles. De esta manera, un parámetro importante para una proteasa de detergente es la capacidad de adsorber e hidrolizar dichos fragmentos insolubles.

La enzima serina proteasa de la invención puede obtenerse de cualquier organismo, incluyendo bacterias, arqueobacterias, hongos, levaduras e incluso eucariotas superiores, tales como plantas. Preferentemente dicha enzima se origina de un hongo, incluyendo hongos filamentosos y levaduras, por ejemplo de un género seleccionado del grupo que comprende *Malbranchea*. Las proteasas alcalinas fúngicas resultan ventajosas para las proteasas bacterianas debido a la facilidad de procesamiento posterior para producir una enzima o composición de enzimas libres de microorganismos. Los micelios pueden eliminarse rápidamente mediante técnicas de filtración previamente a la purificación de la enzima.

El olor moderado de los productos fúngicos de fermentación de la presente invención es una ventaja respecto a los productos obtenidos de *Bacillus*, que típicamente presentan un olor desagradable. Por lo tanto, se requiere menos perfume para la composición final para enmascarar el olor, lo que hace que el producto resulte adecuado también para aplicaciones en las que no resulta deseable la utilización de perfumes.

Se proporciona una serina proteasa fúngica, que presenta un buen rendimiento en presencia de detergentes con propiedades altamente variables, en amplios intervalos de temperatura, es decir, en intervalos de temperatura baja a moderada, de entre 0°C y 90°C, preferentemente a temperaturas comprendidas entre 5°C y 60°C, y particularmente preferentemente a temperaturas de entre 10°C y 40°C.

En la presente invención, un buen comportamiento en presencia de detergente se refiere a que la enzima, en este caso la serina proteasa fúngica recombinante de la invención, funciona en intervalos de temperatura más baja que muchas subtilisinas comerciales. En otras palabras, un buen comportamiento se refiere a que la enzima es capaz de degradar o eliminar manchas o material proteico en intervalos de temperatura baja a moderada, aunque especialmente en intervalos de temperatura más baja que los presentes productos comerciales de subtilisina, por ejemplo el producto enzima subtilisina comercial Savinase® o Savinase® Ultra 16L (Novozymes A/S, Dinamarca).

La serina proteasa fúngica de la invención, dependiendo de las condiciones de lavado y los ingredientes auxiliares y aditivos en los detergentes, resulta particularmente útil a temperaturas de 60°C o inferiores. La enzima también funciona a 50°C o menos, a 40°C o menos, a 30°C o menos, a 20°C o menos y a 10°C o menos. Resulta particularmente inesperado que una enzima termofílica con un óptimo de temperatura de aproximadamente 70°C resulte eficaz y útil a temperaturas inferiores a 40°C, incluso a temperaturas inferiores a 30°C.

En presencia de un detergente, la serina proteasa fúngica de la invención funciona a temperaturas tales como las definidas anteriormente y particularmente dicha serina proteasa fúngica presenta un buen rendimiento en presencia de detergente a 40°C o menos. El comportamiento de eliminación de manchas de la serina proteasa fúngica de *Malbranchea* bajo condiciones de ensayo variables, sobre diferentes manchas, medida como deltaL* es muy superior que el comportamiento de los productos comerciales Savinase® o Savinase® Ultra 16L (Novozymes A/S, Dinamarca). Se muestran los resultados en los Ejemplos 6 a 8 y en las figuras 6 a 10.

Según una forma de realización, la enzima serina proteasa recombinante fúngica es un polipéptido que presenta una actividad de serina proteasa y que comprende una secuencia de aminoácidos de la proteasa madura de *Malbranchea* ALKO4122 tal como se define en SEC ID nº 18 o una secuencia de aminoácidos que presenta una

identidad de por lo menos 66% respecto a la secuencia de aminoácidos de la proteasa madura de *Malbranchea* ALKO4122 tal como se define en SEC ID nº 18. Las enzimas preferidas muestran una identidad de por lo menos 66%, preferentemente de por lo menos 70%, más preferentemente de por lo menos 75% y todavía más preferentemente de por lo menos 80%. Todavía más preferentemente, las secuencias de aminoácidos muestran una

5 identidad de por lo menos 85% o de por lo menos 90% o 95%, más preferentemente de por lo menos 98%, todavía más preferentemente de 99% respecto a la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 18. Convenientemente, las

La serina proteasa de la presente invención puede obtenerse de *Malbranchea*, preferentemente de *Malbranchea cinnamomea* (Lib.) Oorschot de Hoog (sinónimo de *Malbranchea pulchella* var. *sulfurea* (Miehe) Cooney y R. Emers.), que es un miembro de EC3.4.21. Según la forma de realización particularmente preferente de la enzima serina proteasa de la invención puede obtenerse de la cepa *Malbranchea* ALKO4122 depositada con el número de acceso CBS 128533 o de la cepa *Malbranchea* ALKO4178 depositada con el número de acceso CBS 128564. La proteasa de *Malbranchea* ALKO4178 es esencialmente idéntica a la proteasa de la cepa *Malbranchea* ALKO4122.

El término "identidad" se refiere en la presente memoria a la identidad entre dos secuencias de aminoácidos comparadas entre sí dentro de la región de secuencia correspondiente que presenta aproximadamente el mismo número de aminoácidos. Por ejemplo, puede compararse la identidad de una secuencia de longitud completa o madura de las dos secuencias de aminoácidos. Las secuencias de aminoácidos de las dos moléculas que deben compararse pueden diferir en una o más posiciones, las cuales, sin embargo, no alteran la función o la estructura biológica de las moléculas. Dicha variación puede producirse naturalmente debido a diferentes organismos huésped o mutaciones en la secuencia de aminoácidos o pueden producirse mediante mutagénesis específica. La variación puede resultar de la delección, sustitución, inserción, adición o combinación de una o más posiciones en la secuencia de aminoácidos. La identidad de las secuencias se mide mediante la utilización de la alineación de ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) con los parámetros por defecto (matriz de peso de proteína: Gonnet; apertura de hueco: 10, extensión de hueco: 0,20, distancias de hueco: 5).

Una forma de realización preferente de la invención es una enzima serina proteasa madura fúngica que presenta una actividad de serina proteasa y una secuencia de aminoácidos de la proteasa de *Malbranchea* ALKO4122 tal como se define en SEC ID nº 18. La enzima madura no presenta la secuencia de señal o prepéptido y la prosequencia o propéptido. La serina proteasa madura de la invención incluye los aminoácidos Ala121 a Arg401 de la proteasa de longitud completa caracterizada en SEC ID nº 14. De esta manera, dentro del alcance de la invención también se encuentra la enzima proteasa de *Malbranchea* ALKO4122 de longitud completa que presenta SEC ID nº 14 que incluye la secuencia de señal (prepéptido) y el propéptido, así como la forma proenzima que no presenta la secuencia de señal (prepéptido), que de esta manera presenta la secuencia SEC ID nº 16.

La presente invención se refiere a una enzima serina proteasa fúngica, la forma madura del cual presenta una masa molecular o un peso molecular de entre 20 y 35 kDa, preferentemente de entre 25 y 33 kDa, más preferentemente de entre 28 y 30 kDa. El PM más preferente es la masa molecular predicha de 29 kDa para el polipéptido maduro obtenido mediante la utilización de la herramienta Compute pI/MW en el servidor ExPAS (Gasteiger *et al.*, 2003).

La enzima de la invención resulta eficaz para degradar material proteico en un amplio intervalo de temperaturas. La serina proteasa fúngica presenta un óptimo de temperatura en el intervalo de entre 30°C y 80°C (por lo menos aproximadamente 10% de la actividad máxima), preferentemente de entre 40°C y 80°C (por lo menos aproximadamente 20% de la actividad máxima) y más preferentemente de entre 50°C y 80°C (por lo menos aproximadamente 40% de la actividad máxima), todavía más preferentemente de entre 60°C y 80°C (por lo menos aproximadamente 65% de la actividad máxima), observándose la actividad máxima a 70°C, medida a pH 8,5 utilizando un tiempo de reacción de 30 min. y caseína como sustrato, tal como se indica en el Ejemplo 5.

La enzima presenta un óptimo de pH comprendido en el intervalo de entre 6 y por lo menos 10 a 50°C utilizando un tiempo de reacción de 30 min. y caseína como sustrato, tal como se indica en el Ejemplo 5. En particular, el óptimo de pH es de entre 6 y 10 (por lo menos aproximadamente 60% de la actividad máxima) y más preferentemente de entre 9 y 10 (por lo menos aproximadamente 70% de la actividad máxima) y más preferentemente de aproximadamente 10.

La serina proteasa, convenientemente la serina proteasa fúngica de la invención, presenta un "buen rendimiento en presencia de detergente", es decir, es capaz de degradar o eliminar las manchas o material proteico en presencia de detergente en intervalos de temperatura bajos, concretamente en intervalos de temperatura más bajos que los presentes productos comerciales de subtilisina, por ejemplo el producto enzimático comercial Savinase® o Savinase®Ultra 16L (Novozymes A/S, Dinamarca). En presencia de un detergente, la enzima de la invención funciona bien entre 5°C y 60°C, preferentemente a 50°C o menos. La enzima también funciona a temperaturas de 40°C o menos, o a 30°C o menos.

Según una forma de realización preferida de la invención, la enzima serina proteasa fúngica se encuentra codificada por una secuencia polinucleótida aislada que se hibrida bajo condiciones restrictivas con una secuencia polinucleótida o de sonda incluida en el plásmido pALK3092 que comprende la secuencia de nucleótidos SEC ID nº

11 en *E. coli* RF8758, depositada en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) con el número de acceso DSM 24426.

5 De manera similar, la enzima serina proteasa fúngica (obtenida de *Malbranchea* ALKO4178) de la invención se encuentra codificado por una secuencia polinucleótida aislada que se hibrida bajo condiciones restrictivas con una secuencia polinucleótida incluida en el plásmido pALK3093 que comprende la secuencia de nucleótidos SEC ID nº 12, depositada en *E. coli* RF8759 con el número de acceso DSM 24427.

10 Además, la enzima serina proteasa fúngica de la invención se encuentra codificada por una secuencia polinucleótida aislada que se hibrida bajo condiciones restrictivas con una secuencia polinucleótida incluida en el plásmido pALK3094 que comprende la secuencia de nucleótidos SEC ID nº 17, depositada en *E. coli* RF8791 con el número de acceso DSM 24410.

15 En la presente invención, se aisló el gen de proteasa de *Malbranchea* con una sonda preparada mediante PCR utilizando la hibridación restrictiva tal como se indica en el Ejemplo 1d. Pueden utilizarse métodos estándares de biología molecular para el aislamiento del ADNc o el ADN genómico del organismo huésped, por ejemplo los métodos descritos en los manuales de biología molecular, tales como Sambrook y Russell, 2001.

20 La hibridación con una sonda de ADN, tal como, por ejemplo, SEC ID nº 11, SEC ID nº 12 o SEC ID nº 17, que consiste en más de 100 a 200 nucleótidos, habitualmente se lleva a cabo bajo condiciones "de alta astringencia", es decir, la hibridación a una temperatura que es 20°C a 25°C inferior a la temperatura de fusión (T_f) calculada de un híbrido perfecto, la T_f calculada según Bolton y McCarthy (1962). Habitualmente la prehibridación y la hibridación se llevan a cabo por lo menos a 65°C en 6xSSC (o 6xSSPE), 5x reactivo de Denhardt, SDS al 0,5% (p/v), 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón fragmentado y desnaturalizado. La adición de formamida al 50% baja las temperaturas de prehibridación e hibridación a 42°C. Los lavados se llevan a cabo a bajas concentraciones salinas, por ejemplo en 2xSSC-SDS al 0,5% (p/v) durante 15 minutos a temperatura ambiente (TA), seguido de 2xSSC-SDS al 0,1% (p/v) a TA, y finalmente en 0,1xSSC-SDS al 0,1% (p/v) por lo menos a 65°C, o bajo las condiciones indicadas en el Ejemplo 1d.

30 Según una forma de realización, la enzima serina proteasa fúngica se encuentra codificado por una molécula aislada de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos caracterizada en SEC ID nº 18, o un polipéptido que presenta una identidad de por lo menos 66% respecto a la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 18. Las enzimas muestran una identidad de por lo menos 66%, preferentemente de por lo menos 70%, más preferentemente de por lo menos 75%, todavía más preferentemente de por lo menos 80%. Según la invención, 35 las secuencias de aminoácidos muestran una identidad de por lo menos 85% o de por lo menos 90% o 95%, más preferentemente de por lo menos 98%, más preferentemente de 99% respecto a la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 18. Las identidades de las enzimas se comparan utilizando las regiones de secuencia maduras correspondientes.

40 De esta manera, se encuentra comprendido dentro del alcance de la invención una secuencia polipeptídica que se encuentra codificada por una molécula de ácidos nucleicos codificante de la secuencia de aminoácidos de la serina proteasa de longitud completa de la invención que incluye el prepéptido (secuencia de señal) y el péptido además de la forma madura de la enzima, y cuya secuencia de aminoácidos se caracteriza en SEC ID nº 14.

45 Además, se encuentra comprendido dentro del alcance de la invención una secuencia polipeptídica que está codificada por una molécula de ácidos nucleicos codificante de la forma propéptido de la enzima serina proteasa de la invención que incluye el propéptido además de la forma madura de la enzima, y cuya secuencia de aminoácidos se caracteriza en SEC ID nº 16.

50 Una forma de realización preferente de la invención es la enzima serina proteasa fúngica codificada por una molécula de ácidos nucleicos aislada que comprende la secuencia de nucleótidos codificante de la forma madura de la serina proteasa de *Malbranchea* ALKO4122 que presenta la secuencia SEC ID nº 18.

55 Según una forma de realización preferente, la enzima serina proteasa fúngica de la invención se encuentra codificado por una molécula aislada de ácidos nucleicos que comprende la secuencia de nucleótidos SEC ID nº 17 codificante de la forma madura de la enzima de *Malbranchea* ALKO4122 (SEC ID nº 18).

60 De esta manera, se encuentra comprendido dentro del alcance de la invención el polipéptido codificado por la molécula de ácidos nucleicos que presenta la secuencia de nucleótidos SEC ID nº 13 que comprende la "secuencia codificante" de la enzima. La expresión "secuencia codificante" se refiere a la secuencia de nucleótidos que se inicia en el codón de inicio de traducción (ATG) y se detiene en el codón de parada de traducción (TAA, TAG o TGA). El polipéptido de longitud completa traducido se inicia habitualmente con metionina y puede comprender regiones intrónicas.

65 Además, se encuentra comprendido dentro del alcance de la invención una enzima serina proteasa fúngica codificada por una molécula de ácidos nucleicos que comprende la secuencia de nucleótidos SEC ID nº 15, que

codifica la forma proenzima de *Malbranchea* ALKO4122.

Según otra forma de realización preferente de la invención, la serina proteasa fúngica se encuentra codificada por la secuencia polinucleótida incluida en el plásmido pALK3094 que comprende la secuencia de nucleótidos SEC ID nº 13 en *E. coli* RF8791, depositada con el número de acceso DSM 24410.

Una forma de realización de la invención es la enzima serina proteasa producida a partir de un vector de expresión recombinante que comprende la molécula de ácidos nucleicos, que codifica la enzima serina proteasa fúngica tal como se ha caracterizado anteriormente, operablemente ligado a secuencias reguladoras capaces de dirigir la expresión de dicha enzima serina proteasa en un huésped adecuado. La construcción de dicho vector de expresión recombinante y la utilización de dicho vector se describen en mayor detalle en el Ejemplo 2.

Los huéspedes adecuados para la producción de la enzima serina proteasa fúngica son huéspedes homólogos o heterólogos, tales como los huéspedes microbianos, incluyendo bacterias, levaduras y hongos. Los hongos filamentosos, tales como *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Humicola*, *Chrysosporium*, *Neurospora*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Myceliophthora* y *Mortierella*, son huéspedes de producción preferentes debido a la facilidad de procesamiento posterior y recuperación del producto enzima. Entre los huéspedes adecuados se incluyen especies tales como los tipos de cepa de *T. reesei*, *A. niger*, *A. oryzae*, *A. sojae*, *A. awamori* o *A. japonicus*, o *F. venenatum* o *F. oxysporum*, *H. insolens* o *H. lanuginosa*, *N. crassa* y *C. lucknowense*, algunos de los cuales se listan como organismos huésped de producción de enzima en, por ejemplo, la lista AMFEP 2009 de enzimas comerciales (<http://www.amfep.org/list.html>). Más preferentemente, la enzima se produce en un huésped hongo filamentoso del género *Trichoderma* o *Aspergillus*, tal como *T. reesei* o *A. niger*, *A. oryzae* o *A. awamori*. Según la forma de realización más preferente de la invención, la enzima serina proteasa fúngica es producida en *T. reesei*.

La presente invención se refiere además a una molécula aislada de ácidos nucleicos que comprende una secuencia polinucleótida codificante de la enzima serina proteasa seleccionada de entre el grupo que consiste en:

(g) una molécula de ácidos nucleicos codificante de un polipéptido que presenta una actividad de serina proteasa y que comprende la secuencia de aminoácidos descrita en SEC ID nº 18,

(h) una molécula de ácidos nucleicos codificante de un polipéptido que presenta una actividad de serina proteasa y una identidad de por lo menos 66% respecto a la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 18,

(i) una molécula de ácidos nucleicos que comprende la secuencia codificante de la secuencia de nucleótidos tal como se ilustra en SEC ID nº 17,

(j) una molécula de ácidos nucleicos que comprende la secuencia codificante de la secuencia polinucleótida contenida en DSM 24410,

(k) una molécula de ácidos nucleicos la secuencia codificante de la cual difiere de la secuencia codificante de una molécula de ácidos nucleicos de cualquiera de entre (c) a (d) debido a la degeneración del código genético, y

(l) una molécula de ácidos nucleicos que se hibrida bajo condiciones restrictivas con una molécula de ácidos nucleicos contenida en DSM 24426, o SEC ID nº 17 codificante de un polipéptido que presenta una actividad de serina proteasa y una secuencia de aminoácidos que muestra una identidad de por lo menos 66% respecto a la secuencia de aminoácidos descrita en SEC ID nº 18.

La molécula de ácidos nucleicos de la invención puede ser ARN o ADN, en la que el ADN puede constituir ADN genómico o ADNc.

Pueden utilizarse métodos estándares de biología molecular en los tratamientos de aislamiento y enzimáticos de la secuencia polinucleótida codificante de la serina proteasa fúngica de la invención, incluyendo el aislamiento del ADN genómico y plasmídico, la digestión del ADN para producir fragmentos de ADN, la secuenciación, las transformaciones de *E. coli*, etc. Los métodos básicos se describen en manuales estándares de biología molecular, por ejemplo Sambrook y Russell, 2001.

El aislamiento del gen de proteasa de *Malbranchea* codificante del polipéptido de *Malbranchea* ALKO4122 se describe en el Ejemplo 1. Brevemente, se utilizó el fragmento de PCR obtenido mediante la utilización de los cebadores oligonucleótidos degenerados (SEC ID nº 5 y SEC ID nº 4) en la reacción de PCR para aislar el gen de proteasa de *Malbranchea* ALKO4122. El fragmento genómico que incluía el gen de proteasa se ligó en el vector pBluescript II KS+. El gen de proteasa de *Malbranchea* de longitud completa se incluyó en el plásmido pALK3094 en *E. coli* y depositado en la colección de cultivos del DSMZ con el número de acceso DSM 24410. La secuencia de aminoácidos deducida de la serina proteasa se analizó a partir de la secuencia de ADN.

La secuencia de nucleótidos de la proteasa de *Malbranchea* ALKO4122 (SEC ID nº 13), sus secuencias de promotor

parcial y de terminador y la secuencia de aminoácidos deducida (SEC ID nº 14) se presentan en la figura 1A-B. La longitud del gen es de 1.436 pb (incluyendo el codón de parada). Se encontraron tres intrones putativos que presentaban longitudes de 72, 87 y 71 pb. La secuencia de proteína deducida consistía de 401 aminoácidos, incluyendo una secuencia de señal predicha de 20 aminoácidos (SignalP V3.0; Nielsen *et al.*, 1997, y Nielsen y Krogh, 1998) y un propéptido predicho entre Gly21 y Asp120. La masa molecular predicha era de 28,5 kDa para el polipéptido maduro y el pI predicho era de 6,15. Estas predicciones se realizaron utilizando la herramienta Compute pI/MW en el servidor ExPASy (Gasteiger *et al.*, 2003). La secuencia de aminoácidos deducida contenía tres posibles sitios de N-glucosilación (Asn134, Asn172 y Asn277), aunque según el servidor de CBS NetNGlyc V1.0, sólo son probables dos sitios, Asn134 y Asn277. Se buscaron las homologías respecto a la secuencias de proteasa publicadas utilizando el programa BLASTP, versión 2.2.25 en el NCBI (National Center for Biotechnology Information) (Altschul *et al.*, 1990). Los valores de identidad de la secuencia de proteasa madura de *Malbranchea* respecto a las regiones correspondientes de las secuencias más homólogas se obtuvieron mediante la utilización de la alineación de ClustalW2 (Matriz: Gonnet, apertura de hueco: 10, extensión de hueco: 0,20, distancias de hueco: 5; disponibles en, por ejemplo, www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/). Se muestran los resultados en la Tabla 2.

Los valores de identidad más altos obtenidos de la búsqueda de BLASTP para la proteasa madura de *Malbranchea* ALKO4122 de la presente invención (SEC ID nº 18) fueron los siguientes: 66% para *Coccidioides posadasii* proteasa putativa similar a subtilisina (EER24932.1) y *Coccidioides immitis* proteína hipotética CIMG_09197 (XP_001239485.1), 65% para *Uncinocarpus reesii* proteína hipotética UREG_05170 (EEP80328.1), 64% para *Coccidioides immitis* proteína hipotética CIMB_01394 (XP_001247623.1), *Coccidioides posadasii* proteasa putativa similar a subtilisina (EER23662.1), *Uncinocarpus reesii* proteína hipotética (EEP81307.1) y proteinasa alcalina de *Arthroderma otae* (EEQ28657.1). Las identidades más altas para las secuencias en la división de patente fueron 55% para SEC ID nº 2 en la patente US nº 5962765 (AAE30270.1; proteasa de *Metarhizium anisopliae*) y SEC ID nº 15 en el documento WO 8807581 (AAA54276.1; proteasa de *Tritirachium album*). La secuencia de proteasa madura de *Malbranchea* ALKO4122 (SEC ID nº 18) se alineó con las secuencias maduras de las secuencias homólogas anteriormente indicadas utilizando una alineación de ClustalW2. Los valores de identidad (% de puntuación) obtenidos mediante la utilización de la alineación de ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) obtenidos fueron de entre 63% y 65%.

De esta manera, se encuentra comprendido dentro del alcance de la invención una secuencia polinucleótida aislada o una molécula de ácidos nucleicos aislada que codifica una enzima serina proteasa o polipéptido fúngica que comprende la secuencia de aminoácidos de la forma madura de la enzima de *Malbranchea* ALKO4122 caracterizado en SEC ID nº 18, nº 15, es decir los aminoácidos Ala121 a Arg401 de la serina proteasa de longitud completa de SEC ID nº 14.

La molécula de ácidos nucleicos preferentemente es una molécula que comprende la secuencia codificante descrita en SEC ID nº 17, que codifica la forma madura de la enzima serina proteasa fúngica de la presente invención.

La molécula aislada de ácidos nucleicos de la invención puede ser una molécula que comprende la secuencia codificante de la secuencia polinucleótida contenida en DSM 24410, DSM 24426 o DSM 24427. DSM 24426 porta la secuencia de nucleótidos del fragmento de PCR (SEC ID nº 11) utilizada en la clonación del gen de proteasa de *Malbranchea* ALKO4122 de longitud completa. DSM 24427 porta la secuencia de nucleótidos del fragmento de PCR (SEC ID nº 12) obtenida de *Malbranchea* ALKO4178. DSM 24410 porta la secuencia de nucleótidos del gen de proteasa de *Malbranchea* ALKO4122 de longitud completa (SEC ID nº 13).

La molécula de ácidos nucleicos de la invención también puede ser un análogo de la secuencia de nucleótidos caracterizada anteriormente. La "degeneración" se refiere a análogos de la secuencia de nucleótidos que difieren en uno o más nucleótidos o codones pero que codifican la proteasa recombinante de la invención.

La molécula de ácidos nucleicos también puede ser una molécula de ácidos nucleicos que se hibrida bajo condiciones restrictivas con una sonda de PCR contenida en el plásmido pALK3092 o pALK3093 en *E. coli* depositado bajo los números de acceso DSM 24426 y DSM 24427, respectivamente, o una secuencia de ADN, SEC ID nº 17, codificante de un polipéptido maduro que presenta una actividad de serina proteasa y una secuencia de aminoácidos. El ADN hibridante puede originarse en un hongo perteneciente al género *Malbranchea* o puede originarse en otra especie fúngica.

De esta manera, se encuentra comprendido dentro del alcance de la invención una molécula aislada de ácidos nucleicos que comprende una secuencia de nucleótidos tal como se ilustra en SEC ID nº 17 y análogos de la misma.

La presente invención se refiere además a un vector de expresión recombinante o constructo de expresión recombinante, que puede utilizarse para propagar o expresar la secuencia de ácidos nucleicos codificante de la serina proteasa seleccionada en un huésped procariótico o eucariótico adecuado. El vector de expresión recombinante comprende secuencias de ADN o de ácidos nucleicos que facilitan o dirigen la expresión y secreción de la secuencia codificante de serina proteasa en un huésped adecuado, tal como promotores, intensificadores, terminadores (incluyendo señales de terminación de la transcripción y de la traducción) y secuencias de señal operablemente ligadas a la secuencia polinucleótida codificante de dicha serina proteasa. El vector de expresión

puede comprender además genes marcadores para la selección de las cepas transformantes o puede introducirse el marcador de selección en el huésped en otro constructo de vector mediante cotransformación. Dichas secuencias reguladoras pueden ser homólogas o heterólogas respecto al organismo de producción o pueden originarse en el organismo a partir del que se aísla el gen codificante de la serina proteasa.

Son ejemplos de promotores para expresar la serina proteasa de la invención en huéspedes de hongo filamentoso, los promotores de la amilasa TAKA de *A. oryzae*, la proteasa alcalina ALP y la triosa fosfato isomerasa, la lipasa de *Rhizopus miehei*, la glucoamilasa (glaA) de *Aspergillus niger* o *A. awamori*, la proteasa similar a tripsina de *Fusarium oxysporum*, el promotor de la celobiohidrolasa 1 de *Chrysosporium lucknowense*, la celobiohidrolasa I de *Trichoderma reesei* (Cel7A), etc.

En las levaduras, por ejemplo los promotores de la enolasa de *S. cerevisiae* (ENO-1), la galactoquinasa (GAL1), la alcohol deshidrogenasa (ADH2) y la 3-fosfoglicerato quinasa pueden utilizarse para proporcionar la expresión.

Son ejemplos de secuencias de promotor para dirigir la transcripción de la serina proteasa de la invención en un huésped bacteriano, el promotor del operón *lac* de *Escherichia coli*, el promotor *dagA* de la agarasa de *Streptomyces coelicolor*, el promotor del gen alfa-amilasa (*amyL*) de *B. licheniformis*, el promotor del gen de la amilasa maltogénica (*amyM*) de *B. stearothermophilus*, los promotores de los genes *xylA* y *xylB* de *B. subtilis*, etc.

Entre los terminadores adecuados se incluyen los genes anteriormente indicados o cualesquiera otras secuencias de terminador caracterizadas.

Entre los marcadores de transformación o selección adecuados se incluyen los que complementan un defecto en el huésped, por ejemplo los genes *dal* de *B. subtilis* o *B. licheniformis* o *amdS* y *niaD* de *Aspergillus*. La selección puede basarse también en un marcador que confiera resistencia a un antibiótico, tal como resistencia a ampicilina, canamicina, cloranfenicol, tetraciclina, fleomicina o higromicina.

Resulta preferible la expresión extracelular de la serina proteasa de la invención. De esta manera, el vector recombinante comprende secuencias que facilitan la secreción en el huésped seleccionado. La secuencia de señal de la serina proteasa de la invención o la presecuencia o prepéptido puede incluirse en el vector de expresión recombinante o la secuencia de señal natural puede sustituirse por otra secuencia de señal capaz de facilitar la expresión en el huésped seleccionado. De esta manera, la secuencia de señal seleccionada puede ser homólogo o heterólogo respecto al huésped de expresión. Además, puede sustituirse un propéptido natural por otro propéptido. El propéptido puede ser homólogo o heterólogo respecto al huésped de expresión.

Son ejemplos de secuencias de señal adecuadas las procedentes de organismos fúngicos o de levadura, por ejemplo secuencias de señal de genes bien expresados. Dichas secuencias de señal son bien conocidas en la literatura.

El vector recombinante puede comprender además secuencias que faciliten la integración del vector en el ADN cromosómico del huésped con el fin de obtener una expresión estable y/o facilitar la dirección a una posición determinada en el genoma del huésped.

La proteasa de *Malbranchea* ALKO4122 de la invención con su propia secuencia de señal se expresó a partir del promotor de *T. reesei cbh1* (*cel7A*) tal como se indica en el Ejemplo 2. El constructo de expresión utilizado para transformar el huésped *T. reesei* incluía también el terminador *cbh1* y el marcador *amdS* sintético para la selección de los transformantes separándolos de las células no transformadas.

La presente invención se refiere además a células huésped que comprenden el vector de expresión recombinante tal como se ha indicado anteriormente. Los huéspedes adecuados para la producción de la enzima serina proteasa fúngica son huéspedes homólogos o heterólogos, tales como los huéspedes microbianos, incluyendo bacterias, levaduras y hongos. También resultan posibles sistemas de producción en células vegetales o de mamífero.

Los hongos filamentosos, tales como *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Humicola*, *Chrysosporium*, *Neurospora*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Myceliophthora* y *Mortierella*, son huéspedes de producción preferentes debido a la facilidad del procesamiento posterior y recuperación del producto enzima. Los sistemas huésped de expresión y producción adecuados son, por ejemplo, el sistema de producción desarrollado para el huésped hongo filamentoso *Trichoderma reesei* (patente EP nº 244234) o los sistemas de producción de *Aspergillus*, tales como las cepas de tipo *A. oryzae* o *A. niger* (documento WO 97/08325 y patentes US nº 5.843.745 y nº 5.770.418), *A. awamori*, *A. sojae* y *A. japonicus*, o el sistema de producción desarrollado para *Fusarium*, tal como *F. oxysporum* (Malardier et al., 1989) o *F. venenatum*, y para *Neurospora crassa*, *Rhizopus miehei*, *Mortierella alpinis*, *H. lanuginosa* o *H. insolens* o para *Chrysosporium lucknowense* (patente US nº 6.573.086). Los sistemas de producción adecuados desarrollados para las levaduras son sistemas desarrollados para *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* o *Pichia pastoris*. Los sistemas de producción adecuados que se han desarrollado para bacterias son un sistema de producción desarrollado para *Bacillus*, por ejemplo *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*, para *E. coli*, o para el actinomiceto *Streptomyces*. Preferentemente, la serina proteasa de la invención es producida en un huésped hongo

filamentoso del género *Trichoderma* o *Aspergillus*, tales como las cepas de tipo *T. reesei* o *A. niger*, *A. oryzae*, *A. sojae*, *A. awamori* o *A. japonicus*. Según la forma de realización más preferente de la invención, la enzima serina proteasa fúngica es producida en *T. reesei*.

Se proporciona un procedimiento para producir un polipéptido que presenta una actividad de serina proteasa, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de cultivar la célula huésped natural o recombinante portador del vector de expresión recombinante para una serina proteasa de la invención bajo condiciones adecuadas y aislar opcionalmente dicha enzima. El medio de producción puede ser un medio adecuado para cultivar el organismo huésped y que contiene inductores para la expresión eficiente. Los medios adecuados son bien conocidos en la literatura.

Se proporciona un polipéptido que presenta una actividad de serina proteasa, estando codificado dicho polipéptido por la molécula de ácidos nucleicos de la invención y que puede obtenerse mediante el procedimiento indicado anteriormente.

Además, se proporciona un procedimiento para obtener una preparación de enzima que comprende un polipéptido, la cual presenta una actividad de serina proteasa, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de cultivar una célula huésped que porta el vector de expresión de la invención y recuperar el polipéptido a partir de las células o separar las células del medio de cultivo y obtener el sobrenadante que presenta una actividad de serina proteasa.

Además, se proporciona una preparación de enzima que comprende la enzima serina proteasa caracterizada anteriormente. La preparación o composición de enzima presenta una actividad de serina proteasa y puede obtenerse mediante el procedimiento según la invención.

Se encuentra comprendida dentro de la invención una preparación de enzima así como una composición que comprende la serina proteasa de la invención.

La preparación o composición de enzima (por ejemplo una formulación de detergente) que contiene la enzima proteasa de la invención puede comprender además otras enzimas seleccionadas de entre el grupo que consisten de proteasas (otras proteasas diferentes de las de la invención), amilasas, lipasas, celulasas, cutinasas, pectinasas, mananasas, xilanasas y oxidasas, tales como una lacasa o peroxidasa con o sin un mediador. Se espera que estas enzimas incrementen el comportamiento de las serina proteasas de la invención, por ejemplo eliminando los carbohidratos y aceites o grasas presentes en el material que debe manipularse. Dichas enzimas pueden ser enzimas naturales o recombinantes producidas por la cepa huésped o pueden añadirse al sobrenadante de cultivo tras el procedimiento de producción.

Dicha preparación o composición de enzima puede comprender además uno o más aditivos adecuados seleccionados de entre el grupo que consiste en surfactantes o agentes activos en superficie, tampones, agentes anticorrosión, estabilizadores, agentes blanqueadores, mediadores, mejoradores de detergente, agentes cáusticos, abrasivos y conservantes, abrillantadores ópticos, agentes anti-redeposición, tintes, pigmentos, perfumes, etc.

Los surfactantes resultan útiles para emulsionar grasas y humectar superficies. El surfactante puede ser no iónico, incluyendo semipolar y/o aniónico y/o catiónico y/o zwitteriónico.

Pueden añadirse tampones a la preparación o composición de enzima para modificar el pH o afectar el comportamiento o estabilidad de los demás ingredientes.

Entre los estabilizadores adecuados se incluyen polioles, tales como propilenglicol o glicerol, un azúcar o alcohol de azúcar, ácido láctico, ácido bórico, o derivados de ácido bórico, péptidos, etc.

Se utiliza agente blanqueador para oxidar y degradar los compuestos orgánicos. Son ejemplos de sistemas blanqueadores químicos adecuados, las fuentes de H₂O₂, tales como perborato o percarbonato con o sin activadores de blanqueamiento formadores de perácido, tales como tetraacetiletilendiamina, o alternativamente, peroxiácidos, por ejemplo de tipo amida, imida o sulfona. Los oxidantes químicos pueden sustituirse parcial o completamente mediante la utilización de enzimas oxidantes, tales como lacasas o peroxidasas. Muchas lacasas no funcionan eficazmente en ausencia de mediadores.

Entre los mejoradores o agentes acomplejantes se incluyen sustancias, tales como zeolita, difosfato, trifosfato, carbonato, citrato, etc. La preparación de enzima puede comprender además uno o más polímeros, tales como carboximetilcelulosa, poli(etilenglicol), poli(alcohol vinílico), poli(vinilpirrolidona), etc. Además, pueden añadirse suavizantes, agentes cáusticos, conservantes para evitar el deterioro de otros ingredientes, abrasivos y sustancias modificadoras de las propiedades espumantes y de viscosidad.

Según una forma de realización preferente de la invención, dicha preparación o composición de enzima que comprende dicha enzima se encuentra en forma de líquido, polvos, granulado o tabletas. Según una forma de realización preferente de la invención, dicha composición es una formulación de detergente en forma de líquido,

polvos, granulado o tabletas. Además, la enzima en la preparación o composición puede encontrarse en forma de enzima inmovilizada.

La serina proteasa de la presente invención puede, al igual que otras proteasas, particularmente las proteasas alcalinas, utilizarse en las industrias de los detergentes, proteínas, del sector cervecero, cárnica, de la fotografía, del cuero, láctea y farmacéutica (Kalisz, 1988; Rao *et al.*, 1998). Por ejemplo, puede utilizarse como alternativa a los compuestos químicos para convertir los residuos de proteína fibrosa (por ejemplo cuernos, plumas, uñas y cabellos) en biomasa útil, concentrado de proteínas o aminoácidos (Anwar y Saleemuddin, 1998). La utilización de la serina proteasa de la presente invención puede, al igual que con otras enzimas, presentar éxito en la mejora de la calidad del cuero y en la reducción de la contaminación medioambiental y permitiendo ahorros energéticos y puede, al igual que con las proteasas alcalinas, resultar útil en la síntesis de péptidos y en la resolución de la mezcla de D,L-aminoácidos. La subtilisina en combinación con los antibióticos de amplio espectro en el tratamiento de quemaduras y heridas es un ejemplo de la utilización de las serina proteasas en la industria farmacéutica; por lo tanto, la serina proteasa fúngica de la presente invención también puede encontrar dicha utilidad y también puede resultar aplicable, al igual que las proteasas alcalinas, a la eliminación de sangre sobre los equipos quirúrgicos y el lavado de lentes de contacto o dentaduras. Al igual que la proteasa alcalina de *Conidiobolus coronatus*, la serina proteasa fúngica de la presente invención puede utilizarse para sustituir la tripsina en los cultivos de células animales. Las proteasas de la invención también pueden utilizarse en la limpieza de membranas y en la destrucción de los biofilms. En el horneado, las proteasas pueden utilizarse, por ejemplo, para la destrucción de la red del gluten y en otras aplicaciones alimentarias en la hidrólisis de las proteínas de los alimentos, por ejemplo de las proteínas en la leche. También pueden utilizarse en, por ejemplo, el tratamiento de las levaduras, el procesamiento cárnico (para extraer más proteínas de los huesos animales), la creación de nuevos sabores, la reducción del amargor, la modificación de las propiedades de emulsión, la generación de péptidos bioactivos y la reducción de la alergenicidad de las proteínas. Entre los sustratos se incluyen proteínas animales, vegetales y microbianos.

La industria de los detergentes, en particular la industria de los detergentes para la ropa, se ha convertido en el consumidor principal de proteasas activas en el intervalo de pH elevados (Anwar y Saleemuddin, 1998). La proteasa de detergente ideal debe presentar una especificidad de sustrato amplia para facilitar la eliminación de una gran diversidad de manchas debidas a alimentos, hierba, sangre y otras secreciones corporales. Debe ser activa al pH y fuerza iónica de la solución de detergente, a la temperatura y pH de lavado y debe tolerar la manipulación mecánica, así como los agentes quelantes y oxidantes añadidos a los detergentes. Debido a la conciencia en relación al ahorro energético, actualmente resulta deseable utilizar la proteasa a temperaturas más bajas.

La presente invención se refiere además a la utilización de la enzima serina proteasa o la preparación de enzima para detergentes, el tratamiento de fibras textiles, para el tratamiento de materiales proteicos, tales como lana, cabello, seda, cuero, para el tratamiento de piensos o alimentos, o para cualquier aplicación que implique la modificación, degradación o eliminación de material proteico.

Por lo tanto, una forma de realización preferente de la invención es la utilización de la enzima serina proteasa tal como se ha caracterizado anteriormente como aditivo detergente útil para detergentes de lavandería y composiciones lavavajillas, incluyendo composiciones de lavavajillas automático.

El término "detergente" se utiliza para referirse a sustancia o material destinado a ayudar en la limpieza o que presenta propiedades limpiadoras. El término "detergencia" se refiere a la presencia o grado de la propiedad de limpieza. El grado de la propiedad de limpieza puede someterse a ensayo en diferentes materiales de sustrato proteicos o que contienen proteínas o manchas o mezclas de manchas unidas a un portador sólido insoluble en agua, tal como fibras textiles o vidrio. El material proteico típico incluye sangre, leche, tinta, huevo, hierba y salsas. Con fines de ensayo se dispone comercialmente de una diversidad de manchas proteicas. La función de la enzima del detergente es degradar y eliminar las manchas que contienen proteínas. Los resultados del ensayo dependen del tipo de mancha, de la composición del detergente y de la naturaleza y estado de los textiles utilizados en el ensayo de lavado (Maurer, 2004).

La expresión "temperatura baja" en el contexto de la presente solicitud se refiere a intervalos de temperatura de entre 10°C y 30°C, que según los Experimentos no resultan óptimos para el rendimiento de muchas de las preparaciones enzimáticas actualmente disponibles, en particular las preparaciones enzimáticas de detergente. La expresión "temperatura moderada" se refiere a un intervalo de temperatura de entre 30°C y 60°C.

La expresión "aplicable a intervalos de temperatura baja o moderada" incluye aplicaciones industriales en las que resulta deseable que la enzima funcione eficazmente en intervalos de temperatura baja o moderada (entre 10°C y 60°C). Entre dichas aplicaciones se incluyen la utilización del mismo en las industrias alimentaria, de piensos y del cuero, farmacéutica, diagnósticos, gestión de residuos y recuperación de plata. Tal como se indica en la presente memoria, dichas aplicaciones excluyen la utilización de la enzima serina proteasa de la invención como agente de control biológico de hongos y nemátodos patógenos en plantas.

En la presente invención, la expresión "estabilidad del detergente" se refiere a que la enzima o variante de enzima conserva suficientemente su actividad en solución de detergente durante el almacenamiento y/o lavado. Por lo tanto,

es eficiente en la degradación o eliminación de manchas o material proteico en presencia de un detergente tal como el detergente de referencia de etiqueta ecológica, de lavado ligero (wfk Testgewebe GmbH) o el detergente líquido comercial tal como se indica en la Tabla 3 del Ejemplo 6. La estabilidad puede someterse a ensayo mediante la determinación de la actividad residual por ejemplo tras varios días de incubación (a 37°C) en detergente. La actividad de proteasa residual puede determinarse utilizando el método indicado en el Ejemplo 3 o cualquier otro método dado a conocer en la literatura (Gupta *et al.*, 2002).

La expresión "cantidad eficaz" de una serina proteasa se refiere a la cantidad de la enzima proteasa necesaria para conseguir la actividad enzimática en la composición de detergente específica. Preferentemente la composición de detergente de la invención comprende entre aproximadamente 0,0001% y aproximadamente 10% en peso de la composición de detergente de una variante de proteasa de la invención, más preferentemente entre 0,001% y aproximadamente 1%, todavía más preferentemente entre 0,001% y aproximadamente 0,5%.

Típicamente, el rendimiento de lavado de la proteasa se mide como "eficiencia de eliminación de manchas" o "efecto de eliminación de manchas" o "grado de la propiedad de limpieza", referida a un incremento visible y medible de la luminosidad o cambio de color del material manchado, por ejemplo en áreas artificialmente ensuciadas o en telas de ensayo. Los valores de luminosidad o cambio de color pueden medirse, por ejemplo, mediante la medición del color como valores de reflectancia utilizando un espectrofotómetro, utilizando las coordenadas espaciales de color L^*a^*b , tal como se indica en los Ejemplos 6 a 8. El desvanecimiento o eliminación de una mancha proteica indicativo del rendimiento de la proteasa (eficiencia de eliminación de manchas) se calcula como, por ejemplo, ΔL^* , que significa valor de luminosidad L^* del textil tratado con enzima menos el valor de luminosidad L^* del textil tratado con solución de lavado sin la enzima (blanco de enzima o control). La presente de detergente puede mejorar el rendimiento de la enzima en la eliminación de las manchas. La serina proteasa de la presente invención degrada diversos tipos de mancha proteica bajo condiciones alcalinas en presencia de detergentes con diferentes composiciones (Ejemplos 6 a 8).

Tal como se muestra en el Ejemplo 6, la serina proteasa de la invención eliminó la mancha de sangre/leche/tinta a una temperatura de entre 10°C y 50°C y especialmente a 30°C o menos en detergente líquido comercial de manera considerablemente mejor que las preparaciones comerciales de proteasa Savinase® 16 L y Savinase® Ultra 16L (figuras 6 y 8). Las preparaciones de enzima se dosificaron como unidades de actividad. Se observó el mismo efecto también al calcular la dosificación como cantidad de proteína añadida (figura 8). Resulta inesperado que la proteasa de *Malbranchea* ALKO4122 muestre un rendimiento óptimo de eliminación de manchas en un intervalo de temperaturas muy amplio y especialmente a temperaturas bajas, de entre 10°C y 30°C, a pesar de su óptimo a alta temperatura bajo condiciones analíticas sobre sustrato de caseína (aprox. 70°C, figura 5A). Savinase® presenta un perfil de temperatura similar bajo condiciones analíticas (figura 5A) y mostró un rendimiento claramente inferior a temperaturas de lavado frías. Los resultados de estos ensayos indican que la proteasa según la invención presenta un rendimiento excelente con detergente líquido en un intervalo amplio de temperaturas e incluso a temperaturas de lavado muy frías.

Además de las diferentes manchas de sangre/leche/tinta, la proteasa de *Malbranchea* ALKO4122 resultó eficaz en la eliminación de manchas tales como de hierba y de cacao al someterla a ensayo en detergente líquido a 30°C y a 60°C. Los tratamientos se llevaron a cabo con un aparato ATLAS LP-2 Launder-O-meter y enzima dosificada como actividad. Los resultados (figuras 9A-H) demuestran que la proteasa de *Malbranchea* resultó eficaz sobre varias manchas tanto a 30°C como a 60°C y demostró un mejor rendimiento de eliminación de manchas que Savinase® Ultra 16L. *Malbranchea* ALKO4122 también resultó eficaz sobre manchas de aceite de cacahuete/leche y de yema de huevo.

El comportamiento de la proteasa de *Malbranchea* ALKO4122 se sometió a ensayo también con detergente tradicional comercial en polvo que contenía agentes limpiadores y abrillantadores ópticos y con el detergente de referencia ECE 77 sin abrillantadores ópticos y agentes limpiadores a 50°C a pH 10,5 o 10, respectivamente, tal como se indica en el Ejemplo 8. Se sometió a ensayo la capacidad de la enzima de eliminación de la mancha de sangre/leche/tinta sobre material de poliéster-algodón. Tal como se muestra en las figuras 10A y B, la proteasa de la invención también resulta adecuada para detergentes en polvo bajo condiciones muy alcalinas y el efecto fue similar en comparación con Savinase® Ultra 16L, al dosificar cada preparación de enzima como unidades de actividad.

Además de durante el lavado, la enzima de la presente invención conserva suficientemente su actividad también durante el almacenamiento, incluso al almacenarlo en detergentes líquidos, tal como se muestra en los Ejemplos 9 y 10. La proteasa de *Malbranchea* ALKO4122 presenta una estabilidad de almacenamiento a 37°C en comparación con, por ejemplo, la proteasa de *Fusarium* Fe_RF6318 (documento WO 2010/125174A1) (figuras 11A y 11B). Las figuras 12A y 12B muestran que la proteasa de *Malbranchea* presenta una estabilidad especialmente buena en el detergente de referencia de etiqueta ecológica, para lavado suave (wfk Testgewebe GmbH) y detergente líquido comercial (Tabla 3) en comparación con la proteasa de *Fusarium* y una estabilidad similar en etiqueta ecológica en comparación con la proteasa bacteriana comercial Savinase® 16L. Una buena estabilidad de la proteasa según la invención a temperaturas elevadas la convierte en especialmente adecuada para las formulaciones de detergente líquido en países de clima cálido.

Según una forma de realización preferente de la invención, la serina proteasa fúngica de la invención resulta útil en detergentes líquidos y en detergente en polvo, tal como se muestra en los Ejemplos 6 a 10. La enzima de la preparación de enzima de la invención puede formularse para la utilización en lavandería a mano o a máquina o puede formularse para la utilización en la limpieza doméstica de superficies duras o preferentemente en el lavado de la vajilla a mano o a máquina.

En conclusión puede observarse que se proporciona una nueva enzima serina proteasa fúngica termoestable, originada en un microorganismo termofílico, y que actúa particularmente bien a temperaturas bajas y es compatible y estable en composiciones de detergente líquido, de manera que resultan necesarios menos aditivos estabilizadores y de otro tipo.

La invención se ilustra con los ejemplos a continuación, referentes a algunas formas de realización de la invención. Sin embargo, la invención no pretende limitarse exclusivamente a dichos ejemplos.

Ejemplos

Ejemplo 1

Síntesis de sondas para la clonación de genes de proteasa de *Malbranchea* y clonación del gen de proteasa de las cepas de *Malbranchea* ALKO4122 y ALKO4178.

(a) Aislamiento de ADN y métodos de biología molecular utilizados

Se utilizaron métodos estándares de biología molecular en el aislamiento y tratamientos enzimáticos de ADN (por ejemplo el aislamiento de ADN plasmídico, la digestión del ADN para producir fragmentos de ADN), en transformaciones de *E. coli*, la secuenciación, etc. Los métodos básicos utilizados fueron los indicados por el fabricante de la enzima, reactivo o kit, o tal como se indica en los manuales estándares de biología molecular, por ejemplo Sambrook y Russell (2001). El aislamiento del ADN genómico a partir de hongos filamentosos se llevó a cabo tal como se indica en detalle en Raeder y Broda (1985).

(b) Cebadores para la preparación de sondas

Las sondas para la clonación de los genes codificantes de proteasas de *Malbranchea* se sintetizaron mediante PCR. Se planificaron los oligos sentido y antisentido degenerados basándose en la secuencias de aminoácidos de consenso de las proteasas fúngicas (por ejemplo *Fusarium equiseti* RF6318, *Fusarium acuminatum* RF7182, *T. reesei* Prb1 en los documentos WO 2010/125174, WO 2010/125175 y WO 2011/003968, Ab Enzymes Oy, respectivamente). Se sintetizó un cebador 5' adicional (DET5) según una región seleccionada de entre la secuencia N-terminal publicada de la termomicolina de *Malbranchea cinnamomea* (conjuntamente 34 aminoácidos; Swiss-Prot número de acceso P13858.1). Se utilizaron los aminoácidos 20 a 28 de la secuencia anteriormente indicada para diseñar DET5. Las secuencias de los cebadores y las secuencias del péptido utilizadas para su diseño se muestran en la Tabla 1, posteriormente (SEC ID nº 1 a nº 5 y SEC ID nº 6 a nº 10, respectivamente). El nombre del oligo, SEC ID nº, longitud, degeneración y secuencia de nucleótidos se incluyen en la tabla, así como las secuencias peptídicas utilizadas en la planificación de los cebadores y las SEC ID nº 6 a nº 10 de los mismos.

Tabla 1. Oligonucleótidos (SEC ID nº 1 a nº 5) utilizados como cebadores de PCR en la amplificación de sondas.

Oligo	SEC ID nº	Longitud (nt)	Degeneración	Secuencia ^(a)	Péptido	SEC ID nº
DET1	1	17	256	GGNCAYGGNACNCAYGT (s)	GHGTHV	6
DET2	2	20	128	AAYTGGGCNGTNAAYGAYAT (s)	NWAVNDI	7
DET3	3	20	3.072	NCCRTARTTNGTRAANSWNG (as)	ASFTNYG	8
DET4	4	20	6.912	NGCCATNSWNGTNCCNSWDA (as)	ISGTSMA	9
DET5	5	26	6.144	CARGCNGGNATHMGNGAYTAYCAYTA (s)	QAGIRDYHY	10

^(a) N=A, T, C o G; R=A o G; Y=T o C; H=A, C o T; M=A o C; "s" y "as" entre paréntesis después de la secuencia de nucleótidos=cadena sentido y antisentido, respectivamente.

(c) Reacciones de PCR y selección de sondas para la clonación de genes de proteasa de longitud completa

Se utilizaron preparaciones de ADN genómico aisladas a partir de *Malbranchea* ALKO4122 y ALKO4178 como moldes en las reacciones de PCR. *Malbranchea* ALKO4122 ha sido identificado por el servicio de identificación de CBS (Utrecht, Países Bajos) como *Malbranchea cinnamomea* (Lib.) Oorschot de Hoog (sinónimo de *Malbranchea pulchella* var. *sulfurea* (Miehe) Cooney y R. Emers.) en enero de 2011. *Malbranchea* ALKO4178 ha sido depositado en la colección de cultivos de Roal Oy como *Malbranchea sulfurea*, pero ninguna identificación adicional de este aislado ha sido llevada a cabo por CBS u otro instituto especializado en la identificación de hongos filamentosos.

Para el aislamiento de los ADN genómicos, se cultivaron micelios de *Malbranchea* ALKO4122 y ALKO4178 mediante el cultivo de las cepas a 37°C durante 4 días a 250 rpm en 50 ml de medio de glucosa-extracto de levadura (25 g de glucosa, 27,5 g de extracto de levadura, pH 6,5). Se recolectaron los micelios y se aislaron los ADN genómicos y se utilizaron como moldes para la síntesis de sondas. Las mezclas de reacción de PCR contenía tampón de CG Phusion® (Finnzymes/Fisher Scientific, Finlandia), dNTP 0,2 mM, 50 pmoles de cada cebador, DMSO (1/10 del volumen) y 1 unidad de polimerasa Phusion® (Finnzymes/Fisher Scientific) y aproximadamente 0,5 a 1 µg de ADN genómico por cada 50 µl de volumen de reacción. Las condiciones de las reacciones de PCR eran: 1 min. de desnaturalización inicial a 98°C, seguido de 28 ciclos de 10 s a 98°C, 30 s de hibridación a 45°C, 47°C, 52°C y 57°C, 30 s de extensión a 72°C y una extensión final a 72°C durante 5 min. La combinación de cebadores DET5 (SEC ID nº 5) y DET4 (SEC ID nº 4) produjo, a las tres temperaturas de hibridación más bajas (ver anteriormente), un producto de ADN que presentaba un tamaño de aproximadamente 0,8 kb. Este tamaño corresponde al tamaño que se esperaba obtener a partir de un gen de proteasa, según los cálculos basados en las secuencias publicadas de proteasa fúngica. Se obtuvo un producto de tamaño similar al utilizar como molde ADN genómico de ALKO4122 o de ALKO4178. Se aislaron los productos de ADN y se purificaron a partir de las mezclas de reacción de PCR y se ligaron al vector pCR®4 Blunt-TOPO siguiendo las instrucciones del fabricante (Invitrogen, USA). Los plásmidos resultantes se denominaron pALK3092 (producto de PCR de ALKO4122 como inserción) y pALK3093 (producto de PCR de ALKO4178 como inserción). Se secuenciaron las inserciones a partir de tanto pALK3092 (SEC ID nº 11) como de pALK3093 (SEC ID nº 12). Se observó que ambas inserciones presentaban una longitud de 791 pb y sólo mostraban una diferencia de un nucleótido entre sí en la región sintetizada (no considerando las secuencias de cebador). El nucleótido 323 en la inserción pALK3092 era C y en la inserción pALK3093 era T. Las cepas de *E. coli* RF8758 y RF8759 que incluían los plásmidos pALK3092 y pALK3093, respectivamente, se depositaron en la colección de DSMZ bajo los números de acceso DSM 24426 y DSM 24427, respectivamente.

Se llevó a cabo una búsqueda de BLASTP con las secuencias obtenidas utilizando la versión del programa 2.2.23 e en el NCBI (National Center for Biotechnology Information) con los parámetros por defecto (Altschul *et al.*, 1990). Las secuencias de aminoácidos codificadas mostraban homología respecto a, por ejemplo, las proteínas hipotéticas e hipotéticas conservadas de *Uncinocarpus reesii* (XP_002584481.1 y XP_002583205.1, respectivamente) y respecto a una proteína putativa similar a subtilisina de *Coccidioides posadasii* (EER24932.1) y la proteína hipotética de *Coccidioides immitis* (XP_001239485.1) con identidades de 59% a 65%. De esta manera, los resultados indican que los fragmentos de ADN obtenidos a partir de las reacciones de PCR eran partes de genes codificantes de proteasa y, de esta manera, resultaban útiles como sondas para cribar el gen o genes de proteasa de longitud completa de *Malbranchea*. La secuencia de aminoácidos codificada que seguía la secuencia codificada por el cebador DET5 no era, sin embargo, idéntica a la secuencia de la termomicolina publicada de *Malbranchea* (aminoácidos 29 a 34, número de acceso P13858).

(d) Clonación del gen de proteasa de longitud completa de *Malbranchea* ALKO4122

Se digirieron ADN genómicos de *Malbranchea* ALKO4122 y ALKO4178 con varias enzimas de restricción para el análisis de transferencia southern. Las digestiones se hicieron migraron en gel y se llevó a cabo transferencia southern e hibridación. La sonda para las transferencias southern se marcó mediante PCR utilizando los cebadores inverso de M13 y directo de M13 y pALK3092 (Ejemplo 1c) como molde. La secuencia de la sonda incluía SEC ID nº 11 (Ejemplo 1c). El marcaje de la sonda utilizando la mezcla de marcaje de PCR DIG (digoxigenina) y la hibridación se llevaron a cabo siguiendo las instrucciones del proveedor (Roche, Alemania). La hibridación se llevó a cabo durante la noche a 68°C. Tras la hibridación, se lavaron los filtros de la manera siguiente: 2x lavados de 5 min. a temperatura ambiente utilizando 2xSSC-SDS al 0,1%, seguido de 2x lavados de 15 min. a 68°C utilizando 0,1xSSC-SDS al 0,1%.

Se detectaron varios fragmentos hibridantes en los digeridos de ADN genómico de *Malbranchea* ALKO4122 y ALKO4178. La mayoría de las digestiones proporcionó resultados idénticos con los dos genomas. Se obtuvo un fragmento hibridante de aproximadamente 2,7 kb a partir de la digestión genómica con XbaI. Se analizó el fragmento XbaI observando que contenía el gen de proteasa de longitud completa (mediante doble digestión del ADN genómico con XbaI y PstI incluidos en la secuencia de sonda y mediante cálculos del tamaño basados en las secuencias publicadas de proteasa fúngica). Los fragmentos de ADN se aislaron a partir de la gestión genómica con XbaI de ALKO4122, a partir del intervalo de tamaños del fragmento hibridante (aproximadamente 2,7 kb). El aislamiento se llevó a cabo a partir de un gel de agarosa. Los fragmentos genómicos aislados se clonaron en el vector pBluescript II KS+ (Stratagene, USA) cortado con XbaI. La mezcla de ligación se transformó en células de *Escherichia coli* XL10-Gold (Stratagene) y se sembraron en placas con LB (Luria-Bertani) que contenían 50 µg/ml de ampicilina. Se cribaron las colonias de *E. coli* positivas utilizando hibridación colonial con inserción de pALK3092 marcada con PCR a modo de sonda. La hibridación se llevó a cabo tal como se ha indicado para las digestiones de ADN genómico. Conjuntamente se recolectaron 20 clones de las placas y de éstas, se demostró mediante digestión de restricción con XbaI e hibridación de transferencia southern (llevada a cabo tal como se ha indicado para la hibridación genómica) que ocho contenían inserciones que presentaban el tamaño esperado e hibridantes con la sonda pALK3092. Se secuenció la inserción XbaI (2.961 pb) y se confirmó que contenía un gen de proteasa de longitud completa de *Malbranchea* ALKO4122 (SEC ID nº 13). El plásmido que contenía el fragmento genómico XbaI anteriormente indicado se denominó pALK3094. La cepa *E. coli* RF8791 que incluía el plásmido pALK3094 se

deposító en la colección del DSMZ con el número de acceso DSM 24410.

(e) Caracterización del gen codificante de la proteasa de *Malbranchea* ALKO4122 y secuencia de aminoácidos deducida de la proteasa

La secuencia génica (SEC ID nº 13), sus secuencias parciales de promotor y terminador y la secuencia de aminoácidos deducida de la proteasa codificada (SEC ID nº 14) se muestran en la figura 1. La longitud del gen es de 1.436 pb (incluyendo el codón de parada). Se encontraron tres intrones putativos con longitudes de 72, 87 y 71 pb. Los intrones presentaban las secuencias limítrofes 5' y 3' de consenso, así como las secuencias de consenso internas de acuerdo con las identificadas a partir de varios intrones fúngicos (Gurr *et al.*, 1987). La secuencia deducida de la proteína (SEC ID nº 14) consistía de 401 aminoácidos, incluyendo una secuencia de señal predicha de 20 aminoácidos (SignalP V3.0; Nielsen *et al.*, 1997, y Nielsen y Krogh, 1998) y una prosequencia predicha de 100 aminoácidos. Se estimó la localización del extremo N-terminal de la proteasa madura, Ala 121, según las comparaciones realizadas con otras secuencias de proteasa fúngica. La masa molecular predicha de la proteasa madura era de 28.530 Da y el pI predicho era de 6,15. Se calcularon estas predicciones utilizando la herramienta Compute pI/MW en el servidor ExPASy (Gasteiger *et al.*, 2003). La secuencia de aminoácidos madura deducida contenía tres posibles sitios de N-glucosilación en las posiciones de aminoácido Asn134, Asn172 y Asn277 de la secuencia madura (posiciones aminoácidas 254, 292 y 397 en la figura 1) aunque de acuerdo con el servidor de CBS NetNGlyc V1.0 sólo son probables los sitios en las posiciones Asn134 y Asn277.

La secuencia N-terminal de la proteasa de *Malbranchea* ALKO4122 correspondía sólo parcialmente a la secuencia N-terminal de la termomicolina de *M. cinnamonea* publicada (P13858): sólo los primeros 28 aminoácidos eran idénticos en estas dos secuencias.

Se observó una diferencia de nucleótido en la secuencia de sonda del gen de proteasa de *Malbranchea* ALKO4122 en pALK3092 en comparación con la secuencia genómica del gen de proteasa de ALKO4122 (en la región correspondiente). Sin embargo, la secuencia genómica del gen de proteasa de ALKO4122 era idéntica a la secuencia de la sonda de proteasa de ALKO4178 en pALK3093 (en la región correspondiente). De esta manera, la única diferencia de nucleótido en la inserción pALK3092 (Ejemplo 1c) más probablemente resultó de una mutación en la reacción de PCR de la sonda.

(f) Clonación del gen de proteasa de *Malbranchea* ALKO4178

Se diseñaron los cebadores DET27 (SEC ID nº 19) y DET28 (SEC ID nº 20) para sintetizar el gen de proteasa de longitud completa de *Malbranchea* ALKO4178 mediante PCR. DET27 es un cebador sentido entre el promotor (desde el nucleótido -44 hasta -24 a partir de ATG) y DET28 es un cebador antisentido desde el terminador (entre los nucleótidos 55 y 36 a partir del codón de parada) del gen de proteasa de *Malbranchea* ALKO4122 (figura 1). Las mezclas de reacción de PCR contenían tampón de HF 1XPhusion® (Finnzymes/Fisher Scientific, Finlandia), dNTP 0,2 mM, 75 pmoles de cada cebador y 2 unidades de polimerasa Phusion® (Finnzymes/Fisher Scientific) y aproximadamente 1,5 µg de ADN genómico por cada 200 µl de volumen de reacción. Las condiciones para las reacciones de PCR eran: 30 s de desnaturalización inicial a 98°C, seguido de 24 ciclos de 10 s a 98°C, 30 s de hibridación a 60°C y a 65°C, 60 s de extensión a 72°C y una extensión final a 72°C durante 7 min. A partir de las reacciones se obtuvieron fragmentos de la longitud esperada (~1,5 kb). Se aislaron fragmentos de dos reacciones separadas de PCR y se ligaron en los vectores pCR4®Blunt-TOPO®. Las inserciones se secuenciaron a partir de los clones separados. Las secuencias de las inserciones en ambos clones eran idénticas entre sí y respecto al gen de proteasa de *Malbranchea* ALKO4122, su promotor parcial y terminador (figura 1). El plásmido que contenía el gen de proteasa de *Malbranchea* ALKO4178 (el fragmento de PCR obtenido) se denominó pALK3147. El clon de *E. coli* que incluía dicho plásmido se almacenó en la colección de Roal Oy con el nombre RF9332.

(g) Estudios de homología, identidad y alineación

La secuencia de aminoácidos de la proteasa madura de *Malbranchea* ALKO4122 (SEC ID nº 18) se utilizó para buscar secuencias de proteasa homólogas en fuentes públicas. Se realizó una búsqueda tanto en las secuencias de proteína redundantes como en las secuencias de proteína en la división de patentes de GenBank. En la búsqueda se utilizó el programa BLASTP versión 2.2.25 en el NCBI (National Center for Biotechnology Information) con los parámetros por defecto (Altschul *et al.*, 1990). Las identidades más altas obtenidas con todas las secuencias redundantes fueron de 66% para la proteasa putativa similar a subtilisina de *Coccidioides posadasii* (EER24932.1) y la proteína hipotética CIMG_09197 de *Coccidioides immitis* (XP_001239485.1), 65% para la proteína hipotética UREG_05170 de *Uncinocarpus reesi* (EEP80328.1), 64% para la proteína hipotética CIMB_01394 de *Coccidioides immitis* (XP_001247623.1), la proteasa putativa similar a subtilisina de *Coccidioides posadasii* (EER23662.1), la proteína hipotética de *Uncinocarpus reesi* (EEP81307.1) y la proteinasa alcalina de *Arthroderma otae* (EEQ28657.1). La EER24932.1 y XP_001239485.1 sólo difieren entre sí en tres aminoácidos y XP_001247623.1 y EER23662.1 difieren entre sí únicamente en un aminoácido. La secuencia de la proteasa de *Malbranchea* ALKO4122 se alineó con las secuencias homólogas anteriormente indicadas utilizando la alineación de ClustalW2. En la alineación se utilizaron las secuencias maduras putativas de cada proteasa. Se compararon las secuencias maduras de cada proteasa entre sí. Los valores de identidad (puntuación en %) obtenidos mediante la utilización de

la alineación de ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) se muestran en la Tabla 2. Las secuencias de aminoácidos maduras, excluyendo los péptidos de señal y propéptidos, se alinearon utilizando los parámetros por defecto (matriz de peso de proteína: Gonnet; apertura de hueco: 10, extensión de hueco: 0,20, distancias de hueco: 5). SEC ID nº 18 es la secuencia de aminoácidos madura de la proteasa de ALKO4122. Los valores de identidad (porcentaje en %) obtenidos eran de entre 63% y 65%.

Las identidades más altas para las secuencias en la división de patentes fueron de 55% para SEC ID nº 2 en la patente US nº 5.962.765 (AAE30270.1; proteasa de *Metarhizium anisopliae*) y SEC ID nº 15 en el documento nº WO88/07581 (AAA54276.1; proteasa de *Tritirachium album*).

Tabla 2. Valores de identidad (puntuación en %) obtenidos en la alineación de múltiples secuencias de ClustalW2.1 de las secuencias de aminoácidos deducidas de proteasa

Secuencia	1	2	3	4	5	6	7	8
1=SEC ID nº 18	100							
2=EER24932.1	65	100						
3=XP_001239485.1	65	99	100					
4=EEP80328.1	64	73	72	100				
5=XP_001247623.1	63	59	59	60	100			
6=EER23662.1	63	59	59	61	99	100		
7=EEP81307.1	63	59	59	63	62	61	100	
8=EE128657.1	64	58	58	58	57	57	62	100

Ejemplo 2

Producción de la proteasa recombinante de *Malbranchea* ALKO4122 en *Trichoderma reesei*

(a) Preparación del vector de producción y cepas de producción

Se construyó el plásmido de expresión pALK3097 para la producción de la proteasa recombinante de *Malbranchea* ALKO4122 en *Trichoderma reesei*. El gen con su propia secuencia de señal se fusionó exactamente con el promotor *cbh1* de *T. reesei* (*cel7A*) mediante PCR. Los cebadores utilizados en la reacción de PCR se denominaron DET17 (cebador 5', SEC ID nº 21) y DET18 (cebador 3', SEC ID nº 22). El cebador DET17 contiene un promotor *cbh1* parcial entre el sitio *SacII* (posición -16 desde ATG) y la posición -1 y el inicio del gen de proteasa de *Malbranchea* (26 nucleótidos, incluyendo el codón de inicio ATG) y 3 nucleótidos adicionales en el extremo 5'. El cebador DET18 contenía 26 nucleótidos desde el extremo del gen de proteasa de *Malbranchea* (incluyendo el codón de parada) y un conector que incluía un sitio *BamHI* para fusionar el gen desde su extremo 3' con el conector pALK2777 (terminador *cbh1*, ver posteriormente). El terminador nativo del gen de proteasa no se encuentra incluido en la construcción.

Se extrajo el gen de proteasa del fragmento de PCR mediante digestión con *SacII*-*BamHI* y se fusionó con el esqueleto de vector de expresión pALK2777 cortado con las mismas enzimas (figura 2). El plásmido pALK2777 contiene el promotor *cbh1* (hasta el sitio *SacII*), conector que incluye, por ejemplo, el sitio *BamHI*, el terminador *cbh1* y un gen *amdS* sintético para el cribado de los transformantes. El gen *amdS* sintético en pALK2777 contiene un terminador acortado (hasta el sitio *XbaI*) en comparación con el gen *amdS* nativo (Kelly y Hynes, 1985). Además, los intrones del gen *amdS* nativo han sido extraídos y los sitios de restricción seleccionados desde el promotor *amdS* y el gen han sido modificados para facilitar la construcción y aislamiento de los casetes de expresión. Sin embargo, la secuencia de aminoácidos codificada por el gen *amdS* sintético es idéntica a la codificada por el gen *amdS* de tipo salvaje.

El casete de expresión lineal de 7,2 kb (presentado en la figura 3) se aisló a partir del esqueleto del vector tras la digestión con *NotI* y se utilizó para transformar protoplastos de *Trichoderma reesei*. La cepa huésped de *T. reesei* utilizada no produce ninguna de las cuatro celulasas principales de *T. reesei* (CBHI, CBHII, EGI, EGII). Las transformaciones se llevaron a cabo tal como en Penttilä *et al.* (1987) con las modificaciones indicadas en Karhunen *et al.* (1993). Los transformantes se purificaron en placas de selección a partir de conidios individuales antes de la esporulación sobre PD.

(b) Producción de proteasa en matraces de agitación y biorreactor a escala de laboratorio

Los transformantes se inocularon a partir de los cultivos inclinados de PD en matraces de agitación que contenían 50 ml de medio inductor complejo de celulosa basado en lactosa (Joutsjoki *et al.*, 1993) tamponado con KH_2PO_4 al 5% y pH 6,0. Se analizó la producción de proteasa de los transformantes a partir de los sobrenadantes de cultivo tras cultivar los transformantes durante 5 días a 30°C, 250 rpm. En geles de SDS-PAGE, se detectó una banda principal de proteína en aproximadamente 30 kDa correspondiente a la masa esperada de proteasa recombinante a partir de los sobrenadantes de cultivo agotado. Se sometió a ensayo la actividad de proteasa de las muestras utilizando caseína como sustrato tal como se indica en el Ejemplo 3. Se midieron actividades claramente

incrementadas en comparación con el huésped en los sobrenadantes de cultivo. La integración del casete de expresión en los genomas fúngicos se confirmó con los transformantes seleccionados mediante la utilización de análisis de transferencia southern en el que se utilizaron varias digestiones genómicas y se utilizó el casete de expresión pALK3097 como sonda.

Los transformantes de *T. reesei* que produjeron las actividades de proteasa más elevadas en los cultivos en matraz de agitación se seleccionaron para el cultivo en biorreactores a escala de laboratorio. En los cultivos se utilizó medio complejo inductor de celulasa. El medio de cultivo agotado obtenido a partir de los cultivos o muestras concentradas se utilizó como material de partida para la purificación y caracterización bioquímica adicional de la proteasa recombinante de *Malbranchea* ALKO4122 (Ejemplos 3 a 5), así como para los ensayos de aplicación presentados en los Ejemplos 6 a 10.

Ejemplo 3

Ensayo de actividad de proteasa

Se midió la actividad de proteasa utilizando caseína como sustrato. Se midió la tasa de degradación de la caseína por una proteasa mediante el seguimiento de la liberación de fragmentos peptídicos solubles en ácido como función del tiempo. Los péptidos solubles en ácido se cuantificaron espectrofotométricamente. Se expresa el resultado como 1 µg de tirosina por min por ml (o g).

En primer lugar se prepararon todas las soluciones de reactivos requeridas en el ensayo en agua desionizada, Milli-Q o equivalente, de la manera siguiente.

Agua corriente sintética (ACS):

Se prepararon las soluciones madre siguientes:

- (A) 5,8 g de $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ / 200 ml de H_2O
- (B) 2,8 g de $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ / 200 ml de H_2O
- (C) 4,2 g de NaHCO_3 / 200 ml de H_2O

Se añadieron 10 ml de dichas soluciones en el orden indicado a 300 ml de H_2O bajo agitación, y después enrasando a 1 litro con H_2O . La solución resultante se denominó agua corriente sintética.

Solución Tris, 0,3 M en agua corriente sintética:

Se disolvieron 36,3 g de base Trizma (SIGMA T-1503) en agua corriente sintética y se enrasó a 1 litro.

Solución de caseína:

Se añadieron 6 g de caseína (Hammarsten Usb. 12840) a 350 ml de agua corriente sintética y se disolvieron bajo agitación magnética durante 10 min. Se añadieron 50 ml de solución de Tris y la solución se agitó durante 10 min. adicionales. A continuación, la solución se calentó a 70°C. Seguidamente se dejó que la temperatura se redujese a 50°C y se ajustó el pH a 8,5 con NaOH 0,1 M. Se continuó la agitación hasta alcanzar la temperatura ambiente. Se enrasó la solución a 500 ml con agua corriente sintética. Se almacenó la solución de sustrato durante un máximo de 3 días en la nevera (o se almacenó en estado congelado).

Reactivo de ácido tricloroacético 110 mM (solución de parada de reacción):

Se disolvieron 18 g de ATC (Merck 807) en H_2O y se enrasó a 1 litro.

Na_2CO_3 0,5 M:

Se disolvieron 53 g de Na_2CO_3 en H_2O y se enrasó a 1 litro.

Solución de folina:

Se diluyeron 25 ml de reactivo de fenol de Folin-Ciocalteu 2 N (Sigma, F 9252) hasta 100 ml con H_2O .

Tampón de dilución de muestras:

Se diluyó la muestra en tampón de Tris-HCl 50 mM, pH 8,5.

La dilución más adecuada rindió una absorbancia de entre 0,4 y 0,8 en la reacción.

Ensayo:

Se inició el ensayo calentando 2,5 ml de solución de sustrato en probetas durante 5 min. a 50°C. A continuación, se añadieron 0,5 ml de solución diluida de enzima, se mezclaron con un mezclador vórtex y se llevó a cabo la reacción a 50°C durante exactamente 30 min. Se preparó el blanco de enzima como la muestra pero se añadió la solución de parada de reacción (ATC 110 mM) a la probeta antes que la muestra. Tras la reacción, se añadieron 2,5 ml de solución de parada a las probetas (no a la del blanco); se mezcló el contenido y se dejó en reposo durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugaron los tubos a 4.000 rpm durante 10 minutos (Hettich Rotanta 460). Se mezcló un ml de sobrenadante transparente con 2,5 ml de Na₂CO₃ 0,5 M y 0,5 ml de reactivo de Folin. Tras esperar durante 10 min. (desarrollo de color), se midió la absorbancia de la mezcla (color) a 660 nm frente a un blanco de enzima.

En cada medición se utilizaron por lo menos dos muestras en paralelo.

Ejemplo 4Purificación de la proteasa recombinante

Se separaron las células y los sólidos del medio de cultivo agotado obtenido de la fermentación (Ejemplo 2) mediante centrifugación durante 30 min., 50.000 g a +4°C (Sorvall RC6 plus). Se utilizaron 8 ml del sobrenadante para la purificación de la proteasa. Todas las etapas de purificación se llevaron a cabo en una sala fría. Tras la centrifugación, la muestra se filtró a través de un filtro de 0,44 µm (Millex HV Millipore) antes de aplicar en una columna desaladora HiPrep 26/10 (de GE Healthcare) equilibrada en MES 20 mM, pH 5,3. Se aplicó la muestra filtrada en el gel a una columna S Sepharose HP de 1 ml (de GE Healthcare) equilibrada en MES 20 mM, pH 5,3. Se eluyeron las proteínas utilizando un gradiente creciente de NaCl (0,5 M). Se agruparon las fracciones que contenían proteasa y se concentraron utilizando dispositivos de filtración centrífuga Amicon Ultra-4 10.000 CO (Millipore). Se purificó adicionalmente la muestra utilizando una columna de filtración en gel Superdex 75 equilibrada con MES 20 mM, NaCl 150 mM, pH 5,3. Se agruparon las fracciones que contenían proteasa y se utilizaron para la caracterización de los perfiles de pH y temperatura. Se analizó la muestra final en gel de SDS-PAGE (figura 4).

Ejemplo 5Caracterización de la proteasa recombinantePerfil de temperatura

Se obtuvo el perfil de temperatura para la proteasa recombinante de *Malbranchea* y Savinase® 16L mediante la utilización del ensayo indicado en el Ejemplo 3. Se muestra el resultado en la figura 5A. La proteasa presentaba un óptimo de temperatura de aproximadamente 70°C.

Perfil de pH

Se determinó el perfil de pH de la proteasa de *Malbranchea* y de Savinase® 16L a 50°C utilizando caseína como sustrato tal como se indica en el Ejemplo 3, excepto en que las muestras de enzima se diluyeron y la caseína se disolvió en tampón de Britton-Robinson 40 mM; el pH de la reacción se ajustó a pH 6-10, el tiempo de reacción fue de 30 min. y las reacciones de la enzima se detuvieron utilizando una solución de ATC 0,11 M que contenía acetato sódico 0,22 M y ácido acético 0,33 M. Se muestran los resultados en la figura 5B. La proteasa recombinante mostraba una actividad relativa superior a 50% entre pH 6 y 10, con una actividad óptima a aproximadamente pH 10.

Ejemplo 6Comportamiento de eliminación de manchas de la proteasa de *Malbranchea* ALKO4122 con detergente líquido a diferentes temperaturas

Se sometió a ensayo la proteasa de *Malbranchea* ALKO4122 producida en *Trichoderma*, tal como se indica en el Ejemplo 2 (b), para su capacidad de eliminar manchas estándares de sangre/leche/tinta a 10°C, 20°C, 30°C y 50°C en presencia de detergente líquido comercial (Tabla 3) a una concentración de 5 g/l. Se utilizaron manchas estándares, tela de ensayo artificialmente ensuciada Art. 117 (sangre/leche/tinta, poliéster + algodón, nº de serie 11-08 o 10-07, EMPA Testmaterialen AG, Suiza) como material de ensayo. Para la comparación se utilizaron las preparaciones de proteasa comercial Savinase® 16L y Savinase® Ultra 16L (contiene un inhibidor de proteasa, 4-FBPA) y el tratamiento sin enzima (control). Cada preparación de enzima se dosificó a 0-8 o 0-16 unidades de actividad (µg de tirosina/min) por cada ml de solución líquida de lavado. Se midió la actividad tal como se ha indicado en el Ejemplo 3.

Tabla 3. Composición del detergente líquido comercial

Ingrediente	%
Surfactantes aniónicos	15 a 30
Surfactantes no iónicos, jabón	5 a 15
Fosfonato, policarboxilato	5
Abrillantadores ópticos y perfumes	
pH 8,2 a 8,6	

Se disolvieron 5 g de detergente líquido comercial en 1 litro de agua corriente ($\text{dH} \leq 4$), se mezcló bien con un agitador magnético y se calentaron hasta la temperatura de lavado. El pH de la solución líquida de lavado era de aprox. 8. La tela manchada en primer lugar se cortó en trozos de 1,5 cm x 1,5 cm y los trozos se redondearon recortando las esquinas. Se introdujeron los trozos en pocillos de placas de microtitulación (Nunc 150200). En cada pocillo de 2 cm de diámetro se añadieron 1,5 ml de solución líquida de lavado que contenía detergente y dilución de enzima en agua (aprox. 50 μl) sobre la tela. Las placas con muestras se incubaron en un incubador-agitador Infors Ecotron a 10°C, 20°C, 30°C y 50°C durante 60 min. a 130 rpm. A continuación, los trozos se enjuagaron cuidadosamente bajo agua corriente (aprox. a la temperatura de lavado) y se secaron durante la noche en aire interior, sobre una rejilla, protegidos de la luz diurna.

Se evaluó el efecto de eliminación de las manchas mediante la medición del color como valores de reflectancia con un espectrofotómetro Minolta CM 2500 utilizando las coordenadas espaciales de color L^*a^*b (iluminante D65/2°). Se midió el color desde ambas caras de los trozos después del tratamiento. Cada valor era la media de por lo menos 2 muestras de tela paralelas medidas en ambas caras de la tela. El desvanecimiento de la mancha de sangre/leche/tinta, indicativa del comportamiento de la proteasa (eficiencia de eliminación de manchas) se calculó como ΔL^* (delta L^*), es decir valor de luminosidad L^* de la tela tratada con enzima menos el valor de luminosidad L^* de la tela tratada con solución líquida de lavado sin enzima (blanco de enzima, control).

Los resultados mostrados en las figuras 6A-6D indican que la proteasa de *Malbranchea* ALKO4122 presenta un efecto considerablemente mejor sobre la mancha de sangre/leche/tinta (Art. 117, nº de serie 11-08) a todas las temperaturas sometidas a ensayo en comparación con las preparaciones comerciales de Savinase®. Se observó que el lote más antiguo (nº de serie 10-07) de mancha de sangre/leche/tinta era más difícil de eliminar sin enzima (con sólo detergente) y, por lo tanto, la contribución de la enzima (ΔL^*) era significativamente más alta en comparación con los ensayos realizados con el lote más nuevo, nº 11-08. La preparación de *Malbranchea* resultó incluso más eficiente sobre este material de mancha más antigua y difícil en comparación con Savinase® (figuras 7A-7D). Además, en el caso de que la administración se calcule como cantidad de proteína añadida (figuras 8A-8D), la eficiencia de eliminación de manchas era más elevada con proteasa de *Malbranchea sulfurea* ALKO4122. Se determinó la cantidad de proteína de las preparaciones de enzima mediante el ensayo de proteína Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) utilizando gamma-globulina bovina (Bio-Rad) como estándar.

Resulta inesperado que la proteasa de *Malbranchea* ALKO4122 muestre un comportamiento óptimo de eliminación de manchas en un intervalo de temperaturas muy amplio y especialmente a temperaturas bajas, tales como 10°C a 30°C, a pesar de su óptimo de temperatura elevada bajo condiciones analíticas sobre sustrato de caseína (aprox. 70°C, figura 5A). Savinase®, que presenta un perfil de temperaturas similar bajo condiciones analíticas (figura 5A), muestra un comportamiento claramente inferior a temperaturas de lavado frías. Los resultados de estos ensayos indican que la proteasa de *Malbranchea* ALKO4122 presenta un comportamiento excelente con detergente líquido en un intervalo de temperaturas amplio e incluso a temperaturas de lavado muy bajas.

Ejemplo 7

Ensayos de Launder de proteasa de *Malbranchea* ALKO4122 con detergente líquido y diferentes manchas

Se sometió a ensayo la proteasa de *Malbranchea* ALKO4122 producida en *Trichoderma*, tal como se ha indicado en el Ejemplo 2 (b), para su capacidad de eliminar diferentes manchas con detergente líquido comercial a 30°C y a 60°C en comparación con la preparación comercial de proteasa Savinase® Ultra 16L. Se utilizaron las telas de ensayo artificialmente ensuciadas de EMPA siguientes: sangre/leche/tinta (Art. 117, nº de serie 11-08 y 10-07, poliéster + algodón), sangre/leche/tinta (Art. 116, nº de serie 18-16, algodón), hierba (Art. 164, nº de serie 23-03, algodón) y cacao (Art. 112, nº de serie 31-06, algodón). Se cortó la tela en trozos de 6 cm x 6 cm y los bordes se arreglaron con puntadas en zig-zag.

Los tratamientos de eliminación de manchas se llevaron a cabo en un LP-2 Launder-O-Meter de la manera siguiente. En primer lugar el Launder O-Meter se precalentó a 30°C o a 60°C. A continuación, se añadieron 0, 2, 5, 10 y 20 (40) unidades de actividad de enzima por cada ml de solución líquida de lavado en recipientes de 1,2 litros que contenían 250 ml de solución líquida de lavado caliente y los trozos con manchas. Se midió la actividad (μg de tirosina/min.) tal como se ha indicado en el Ejemplo 3. La solución líquida de lavado contenía 5 g de detergente líquido comercial (Tabla 3) por cada litro de agua corriente ($\text{dH} \leq 4$) y pH de aprox. 8. Se hizo funcionar el Launder O-

Meter a 30°C durante 60 min. con una velocidad de rotación de 42 rpm. Después, los trozos se enjuagaron cuidadosamente bajo agua corriente (aprox. 20°C) y se secaron durante la noche en aire interior, sobre una rejilla, protegidos de la luz diurna.

Se midió el color de los trozos después del tratamiento con un espectrofotómetro Minolta CM 2500 utilizando las coordenadas especiales de color L^*a^*b y el efecto de eliminación de manchas calculado como ΔL^* tal como se ha indicado en el Ejemplo 6. Se midió el color de ambas caras de los trozos después del tratamiento. Cada valor era la media de por lo menos 12 mediciones en cada trozo. Se evitó realizar mediciones en áreas con arrugas formadas durante el tratamiento debido al pliegue de la tela (en manchas sobre algodón Art. 116 y Art. 112).

Los resultados mostrados en las figuras 9A-9H indican que la proteasa de *Malbranchea* ALKO4122 presentaba un mejor efecto sobre la mancha de hierba (Art. 164, nº de serie 23-03) y diferentes manchas de sangre/leche/tinta (Art. 117, nº de serie 11-08 y 10-07; Art. 116, nº de serie 18-16) tanto a 30°C como a 6 0°C en comparación con la preparación de proteasa comercial Savinase® Ultra 16L. La dosis de 10 a 20 unidades Savinase® Ultra 16L por volumen de solución salina de lavado era igual a una dosis de aproximadamente 0,4% a 0,7% de preparación de enzima por peso de detergente, que es en el uso típico el intervalo utilizado para las enzimas de detergente.

Además, los resultados obtenidos con la mancha de cacao fueron superiores con *Malbranchea* que con Savinase® Ultra 16L (datos no mostrados). En ensayos de Launder adicionales (datos no mostrados), se encontró que la proteasa de *Malbranchea* resultaba eficaz a 30°C también sobre las manchas siguientes del CFT (Center for Testmaterials BV, Países Bajos: aceite de cacahuete, pigmentos, leche rica en grasas (C-10), yema de huevo, pigmento, envejecido (CS-38), extracto de hierba (CS-08). Se utilizó el mismo detergente líquido comercial en todos los ensayos. Los resultados de estos ensayos indican que la proteasa de *Malbranchea* resulta eficiente sobre varias manchas en un amplio intervalo de temperaturas, de 30°C a 60°C.

Ejemplo 8

Comportamiento de eliminación de manchas de la proteasa de *Malbranchea* ALKO4122 con detergente en polvo

La capacidad de la proteasa de *Malbranchea* ALKO4122 producida en *Trichoderma* de eliminar una mancha estándar de sangre/leche/tinta en presencia de detergente (5 g/l) se sometió a ensayo a 50°C utilizando un sistema de ensayo similar tal como se indica en el Ejemplo 7, excepto en que se utilizó detergente tradicional comercial en polvo que contenía agentes blanqueadores, abrillantadores ópticos y fosfatos/fosfonatos y detergente de referencia ECE 77 sin abrillantador óptico y agentes blanqueadores (Art. 601, EMPA). Además, se midió el color de los trozos después del tratamiento utilizando un espectrofotómetro Minolta CM 2500 utilizando las coordenadas espaciales de color L^*a^*b , calculado como ΔL^* , tal como se indica en el Ejemplo 6.

Los resultados (figuras 10A y 10B) demuestran que la proteasa de *Malbranchea* ALKO4122 también pueden utilizarse con detergente en polvo bajo condiciones altamente alcalinas (pH de aprox. 10 a 10,5).

Ejemplo 9

Estabilidad de almacenamiento de la proteasa de *Malbranchea* ALKO4122

El almacenamiento de la proteasa de *Malbranchea* ALKO4122 producida en *Trichoderma* a 37°C se sometió a ensayo utilizando las recetas de formulación siguientes: 1) Proxel LV al 0,2% (p/p) (conservante, Arch Biosides, Reino Unido), pH ajustado a 6; 2) propilenglicol al 20%, pH ajustado a 6; 3) propilenglicol al 50%, pH ajustado a 5,5. Las muestras se empaquetaron en probetas de Sarstedt (13 ml) y se incubaron a 37°C. Se midió la actividad (tal como se ha indicado en el Ejemplo 3) en determinados intervalos y se comparó con resultados anteriores obtenidos con la proteasa de *Fusarium* Fe_RF6318 (documento nº WO2010/125174A1) bajo condiciones similares.

La figura 11 muestra que la proteasa de *Malbranchea* ALKO4122 presenta una excelente estabilidad de almacenamiento a temperaturas elevadas (37°C) en comparación con la proteasa de *Fusarium* de tipo salvaje Fe_RF6318. Al utilizar propilenglicol para la estabilización, la actividad residual de la proteasa de *Fusarium* era de aproximadamente 20% tras 7 días de incubación, mientras que la proteasa de *Malbranchea* no había perdido actividad en ese tiempo.

Ejemplo 10

Estabilidad de la proteasa de *Malbranchea* ALKO4122 en detergentes líquidos

Se sometió a ensayo la estabilidad de la proteasa de *Malbranchea* ALKO4122 producida en *Trichoderma* a 37°C en detergente líquido comercial (Tabla 3) y en detergente de referencia de etiqueta ecológica, para lavado suave (nº 196-391, wfk Testgewebe GmbH). Como referencias se utilizaron las proteasas Savinase® 16L y la de *Fusarium* Fe_RF6318 (documento nº WO2010/125174A1).

Se utilizaron los sistemas de ensayo siguientes: se mezclaron bien 0,4 g de preparación de enzima y 9,6 g de solución de detergente en probetas de Sarstedt (13 ml). Se añadió 0,2% de Proxel LV como conservante en el detergente antes de mezclarlo con los demás componentes. El valor de pH de las muestras preparadas en detergente líquido comercial era de aproximadamente 8. Los pH de las muestras preparadas en detergente de referencia de etiqueta ecológica era de aprox. 7,2. Las probetas se incubaron a 37°C y se midió la actividad de la proteasa en determinados intervalos siguiendo el método indicado en el Ejemplo 3.

La figura 12 muestra que la proteasa de *Malbranchea* ALKO4122 presenta una muy buena estabilidad de almacenamiento a temperaturas elevadas (37°C) en detergentes líquidos en comparación con la proteasa de *Fusarium* de tipo salvaje Fe_RF6318 (documento nº WO2010/125174A1). La proteasa de *Malbranchea* presentaba una estabilidad similar a la de Savinase® 16L en detergente de referencia de etiqueta ecológica.

A temperatura ambiente se observó una estabilidad excelente (datos no mostrados).

Referencias

Abu-Shady MR, El-Gindy AA, Saad RR, Ibrahim ZM. 2001. production, Partial Purification and Some Properties of Thermostable Alkaline Protease from *Malbranchea sulfurea* and its Compatibility with Commercial Detergents. *Afr. J. Mycol. And Biotech.* 9 (3) (17-26).

Altschul SF, W Gish, W Miller, EW Myers and DJ Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215:403-410.

AMFEP, 2009. Association of Manufacturers and Formulators of Enzyme products, List of enzymes at <http://www.amfep.org/list.html> (updated October 2009).

Anwar, A and M Saleemuddin. 1998. Alkaline proteases: A review. *Bioresource Technology* 64:175-183.

Bolton, ET and BJ McCarthy. 1962. A general method for the isolation of RNA complementary to DNA. *Proc. Nat. Acad. Sci.USA* 48:1390-1397.

Chen, Y-J, and M Inouye, 2008. The intramolecular chaperone-mediated protein folding. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 18: 765-770.

Cherry, J. R., and Fidantsef, A. L. 2003. Directed evolution of industrial enzymes: an update. *Curr. Opin. Biotechnol.* 14: 438-443.

Gasteiger, E, A Gattiker, C Hoogland, I Ivanyi, RD Appel and A Bairoch. 2003. Gaucher G M, Stevenson K J 2004. *Thermomycolin. Handbook of Proteolytic Enzymes* 2nd Ed. : 1834-1835

ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res.* 31:3784-3788.

Gupta, R, QK Beg, S Khan and B Chauhan. 2002. An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline protease. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60: 381-395.

Gurr, SJ, Uncles, SE, and Kinghorn JR. 1987. The structure and organization of nuclear genes in filamentous fungi. pp 93-139. In (JR Kinghorn, ed.) *Gene Structure in Eukaryotic Microbes*. IRL Press, Oxford.

Joutsjoki, VV, TK Torkkeli, and KMH Nevalainen. 1993. Transformation of *Trichoderma reesei* with the *Hormoconis resinae* glucoamylase P (gamP) gene: production of a heterologous glucoamylase by *Trichoderma reesei*. *Curr. Genet.* 24:223-228.

Kalisz, HM. 1988. Microbial proteinases. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 36:1-65. Karhunen T, A Mäntylä, KMH Nevalainen, and PL Suominen. 1993. High frequency one-step gene replacement in *Trichoderma reesei*. I. Endoglucanase I overproduction. *Mol. Gen. Genet.* 241:515-522.

Kelly and Hynes 1985. Transformation of *Aspergillus niger* by the *amdS* gene of *Aspergillus nidulans*. *The EMBO Journal* 4(2):475-479.

Laemmli, UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.

Malardier L, MJ Daboussi, J Julien, F Roussel, C Scazzocchio and Y Brygoo. 1989. Cloning of the nitrate reductase gene (*niaD*) of *Aspergillus nidulans* and its use for transformation of *Fusarium oxysporum*. *Gene* 78:147-156.

Maurer, K-H. 2004. Detergent proteases. *Curr. Opin. Biotechnol.* 15: 330-334.

Maurer, K-H, 2010. Enzymes, Detergent. pp. 1-17. In (MC Flickinger ed.) Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology, John Wiley & Sons, Inc.

- 5 Nielsen H, J Engelbrecht, S Brunak and G von Heijne. 1997. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. Protein Engineering 10:1-6.

10 Nielsen H and A Krogh. 1998. Prediction of signal peptides and signal anchors by a hidden Markov model. In: Proceedings of the Sixth International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology (ISMB 6), AAAI Press, Menlo Park, California, pp. 122-130.

Ong PH and Gaucher GM, 1975. Production, purification and characterization of thermomycolase, the extracellular serine protease of the thermophilic fungus *Malbranchea pulchella* var. *sulfurea*. Can. J. Microbiol. 22: 165-175.

- 15 Penttilä M, H Nevalainen, M Rättö, E Salminen, and J Knowles. 1987. A versatile transformation system for the cellulolytic filamentous fungus *Trichoderma reesei*. Gene 61:155-164.

Raeder U and P Broda. 1985. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. Lett. Appl. Microbiol. 1:17-20.

- 20 Rao, MB, AM Tanksale, MS Ghatge and VV Deshpande. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62:597-635. Sambrook J and DW Russell. 2001. Molecular cloning, a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, US.

- 25 Shimogaki, H, K Takenchi, T. Nishino, M. Ohdera, T. Kudo, K. Ohba, MV Iwama and M Irie. 1991. Purification and properties of a novel surface active agent and alkaline-resistant protease from *Bacillus* sp. Y. Agric. Biol. Chem. 55:2251-2258.

Listado de secuencias

- 30 <110> AB Enzymes Oy

<120> Proteasas fúngicas y uso de las mismas

<130> B1005PFI

- 35 <160> 22

<170> Patent In versión 3.5

- 40 <210> 1
<211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

- 45 <220>
<223> Secuencia del cebador sentido DET1 utilizado en la PCR para la síntesis de sonda de proteasa de *Malbranchea*

- 50 <220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> n is a, c, g o t

- 55 <220>
<221> misc_feature
<222> (9) .. (9)
<223> n is a, c, g o t

- 60 <220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> n is a, c, g o t

- <400> 1

- 65 ggncayggna cncaygt 17

<210> 2
 <211> 20
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Secuencia del cebador sentido DET2 utilizado en la PCR para la síntesis de sonda de proteasa de
 10 *Malbranchea*
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (9) .. (9)
 <223> n i s a, c, g o t
 15
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (12) .. (12)
 <223> n i s a, c, g o t
 20
 <400> 2
 aaytgggcng tnaaygayat 20
 25 <210> 3
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> Secuencia del cebador sentido DET3 utilizado en la PCR para la síntesis de sonda de proteasa de
Malbranchea
 <220>
 35 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (1)
 <223> n i s a, c, g o t
 <220>
 40 <221> misc_feature
 <222> (10) .. (10)
 <223> n i s a, c, g o t
 <220>
 45 <221> misc_feature
 <222> (16) .. (16)
 <223> n i s a, c, g o t
 <220>
 50 <221> misc_feature
 <222> (19) .. (19)
 <223> n i s a, c, g o t
 <400> 3
 55 nccrtarttn gtraanswng 20
 <210> 4
 <211> 20
 60 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia del cebador sentido DET4 utilizado en la PCR para la síntesis de sonda de proteasa de
 65 *Malbranchea*

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> n is a, c, g o t
 5
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> n is a, c, g o t
 10
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> n is a, c, g o t
 15
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (13)..(13)
 <223> n is a, c, g o t
 20
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (16)..(16)
 <223> n is a, c, g o t
 25
 <400> 4
 ngccatnswn gtnccnswda 20
 30 <210> 5
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Secuencia del cebador sentido DET5 utilizado en la PCR para la síntesis de sonda de proteasa de *Malbranchea*
 40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> n is a, c, g o t
 45 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (9) .. (9)
 <223> n is a, c, g o t
 50 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (15)..(15)
 <223> n is a, c, g o t
 55 <400> 5
 cargcnggna thmgngayta ycayta 26
 60 <210> 6
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 65 <220>
 <223> Secuencia de una secuencia de péptido de consenso utilizada para el diseño del cebador sentido DET1.
 <400> 6

Gly His Gly Thr His Val
1 5

5 <210> 7
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Secuencia de una secuencia de péptido de consenso utilizada para el diseño del cebador sentido DET2.

<400> 7

Asn Trp Ala Val Asn Asp Ile
1 5

15 <210> 8
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Secuencia de una secuencia de péptido de consenso utilizada para el diseño del cebador antisentido DET3.

<400> 8

25 Ala Ser Phe Thr Asn Tyr Gly
1 5

30 <210> 9
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Secuencia de una secuencia de péptido de consenso utilizada para el diseño del cebador antisentido DET4.

<400> 9

Ile Ser Gly Thr Ser Met Ala
1 5

40 <210> 10
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Secuencia de una secuencia de péptido utilizada para el diseño del cebador sentido DET5.

<400> 10

Gln Ala Gly Ile Arg Asp Tyr His Tyr
1 5

50 <210> 11
<211> 791
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> Secuencia del fragmento de PCR obtenido utilizando DET5 y DET4 en una reacción de PCR y ADN genómico de *Malbranchea* ALKO4122 como molde. Dicho fragmento contiene un gen parcial de proteasa de *Malbranchea* y es una inserción en el plásmido pALK3092.

60 <400> 11


```

caggcgggaa ttagggatta tcactacgat gactccgccg gtgaaggcgt catcgtctat      60
gatgttgaca ccggtattga catcagccat ccggtattcg agggccgtgc tatatgggggt      120
tccaacccatg tcgaccgcgt taaccaggat cagaatggcc atgggacaca cgttgctggt      180
actattggtg gaagggcgta cggagtcgcc aagaaggcca caatagtggc tgtcaagggt      240
ctcgacgccc aggggtcagg tactatcagc ggtattattg ctggtcttga ctggagtgtc      300
aatcatgctc gacagaatgg agccactaga agagcggctt tgaacatgag ccttggcggt      360
gggcgcagta tctctttcaa tcaggctgct gcaagtgtg tccaagccgg attgttcgtc      420
gcggttgctg ccggaaatga aggggtaagt gacttctttc tggcccctcc tatccgtacc      480
tgcagaagct aaccagattg ctcttatttt ttttcttttt tcaaaatata gcaaaatgca      540
ggtaacactt cccagcctc agagccttct gtttgcacag taggggcaac ctcatcgaat      600
gatgccgcca catcctggtc caactatggc tcagttggtg cgtagggctc ggttttattt      660
attacttctt ccccatgctc gatcagaccg gccgctgact atatttagtt gacgtttacg      720
ctcccggaga cgcaattgtc tctacctggc ccggtggcgg ttccaggtct ctcaccggca      780
cctcgatggc t                                                                791

```

<210> 12
 <211> 791
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia del fragmento de PCR obtenido utilizando DET5 y DET4 en una reacción de PCR y ADN genómico de *Malbranchea* ALKO4178 como molde. Dicho fragmento contiene un gen parcial de proteasa de *Malbranchea* y es una inserción en el plásmido pALK3093.

<400> 12

```

caagccggaa ttagtgatta ccactacgat gactccgccg gtgaaggcgt catcgtctat      60
gatgttgaca ccggtattga catcagccat ccggtattcg agggccgtgc tatatgggggt      120
tccaacccatg tcgaccgcgt taaccaggat cagaatggcc atgggacaca cgttgctggt      180
actattggtg gaagggcgta cggagtcgcc aagaaggcca caatagtggc tgtcaagggt      240
ctcgacgccc aggggtcagg tactatcagc ggtattattg ctggtcttga ctggagtgtc      300
aatcatgctc gacagaatgg agtcactaga agagcggctt tgaacatgag ccttggcggt      360
gggcgcagta tctctttcaa tcaggctgct gcaagtgtg tccaagccgg attgttcgtc      420
gcggttgctg ccggaaatga aggggtaagt gacttctttc tggcccctcc tatccgtacc      480
tgcagaagct aaccagattg ctcttatttt ttttcttttt tcaaaatata gcaaaatgca      540
ggtaacactt cccagcctc agagccttct gtttgcacag taggggcaac ctcatcgaat      600

```

<210> 13
 <211> 1436
 <212> ADN
 <213> *Malbranchea cinnamomea*

<220>
 <221> misc_feature
 <223> secuencia genómica

ES 2 585 652 T3

<400> 13

```

atggggtctc tcagcaaact cttgtatctg tcttttgcag tcacggcctc tgtcaatgcc      60
ggtgaaatcc tttcagtcgc caacaaggac agtggtatcc ctgacacgta tatcgtggtg      120
ttgaaggaag gagtttcaac ccaggagttc aatgctcata aaaactgggt gaacgagatt      180
catcgcacca acctcacgag gcgtgacctg ggtttcactg gcgagttaaa gcatagctat      240
gattttggtg gacatggact gaagggctac agcggcaagt ttgatgccac tgccattcag      300
gaaattgcc aatgatcctaa tgtatgcttg ttaagaattc ttcccagcga gatattctca      360
tgcaagccat gcaattgctg acaggtgaat taggtggcct acgtcgaacc ggaccaggag      420
gtgaagcttg atgcattggt gacgcagagt aatgcaccat cctggggcct tggccgtatt      480
tccaaccgac aggctggtat tcgtgattac cactacgatg actccgccgg tgaaggcgtc      540
atcgtctatg atgttgacac cgttattgac atcagccatc cggatttcga gggccgtgct      600
atatggggtt ccaaccatgt cgaccgcgtt aaccaggatc agaattggcca tgggacacac      660
gttgctggtg ctattggtgg aagggcgtac ggagtcgcca agaagccac aatagtggct      720
gtcaaggttc tcgacgcca ggggtcaggt actatcagcg gtattattgc tggctctgac      780
tggagtgtca atcatgctcg acagaatgga gtcactagaa gagcggcttt gaacatgagc      840
cttggcgtg ggcgcagtat ctctttcaat caggctgctg caagtgctgt ccaagccgga      900
ttgttcgtcg cggttgctgc cggaaatgaa ggggtaagtg acttctttct ggcccctcct      960
atccgtacct gcagaagcta accagattgc tcttattttt tttctttttt caaaatatag     1020
caaaatgcag gtaacacttc cccagcctca gagccttctg tttgcacagt aggggcaacc     1080
tcacgaatg atgccgccac atcctggtcc aactatggct cagttggtac gtagggctcg     1140
gttttattta ttacttcttc cccacatgcg atcagaccgg ccgctgacta tatttagttg     1200
acgtttacgc tcccggagac gcaattgtct ctacctggcc cggtgggcgt tccaggtctc     1260
tctcaggcac atcgatggct tctccacacg tcgccggcct gggtgcatat ctcatcgctc     1320
tggagggcat tagcggaggc agtgtatgtg accgtatcaa agagctggct caacctgtcg     1380

```

5 tccagcctgg tccaggcacc accaaccgtc ttatctacaa cggcagtggc cgctaa 1436

<210> 14

<211> 401

<212> PRT

10 <213> *Malbranchea cinnamomea*

<220>

<221> misc_feature

<223> secuencia genómica

15

<400> 14

ES 2 585 652 T3

Met	Gly	Val	Phe	Ser	Lys	Leu	Leu	Tyr	Leu	Ser	Phe	Ala	Val	Thr	Ala	1	5	10	15
Ser	Val	Asn	Ala	Gly	Glu	Ile	Leu	Ser	Val	Ala	Asn	Lys	Asp	Ser	Val	20	25	30	
Ile	Pro	Asp	Thr	Tyr	Ile	Val	Val	Leu	Lys	Glu	Gly	Val	Ser	Thr	Gln	35	40	45	
Glu	Phe	Asn	Ala	His	Lys	Asn	Trp	Val	Asn	Glu	Ile	His	Arg	Thr	Asn	50	55	60	
Leu	Thr	Arg	Arg	Asp	Leu	Gly	Phe	Thr	Gly	Glu	Leu	Lys	His	Ser	Tyr	65	70	75	80
Asp	Phe	Gly	Gly	His	Gly	Leu	Lys	Gly	Tyr	Ser	Gly	Lys	Phe	Asp	Ala	85	90	95	
Thr	Ala	Ile	Gln	Glu	Ile	Ala	Asn	Asp	Pro	Asn	Val	Ala	Tyr	Val	Glu	100	105	110	
Pro	Asp	Gln	Glu	Val	Lys	Leu	Asp	Ala	Leu	Val	Thr	Gln	Ser	Asn	Ala	115	120	125	
Pro	Ser	Trp	Gly	Leu	Gly	Arg	Ile	Ser	Asn	Arg	Gln	Ala	Gly	Ile	Arg	130	135	140	
Asp	Tyr	His	Tyr	Asp	Asp	Ser	Ala	Gly	Glu	Gly	Val	Ile	Val	Tyr	Asp	145	150	155	160
Val	Asp	Thr	Gly	Ile	Asp	Ile	Ser	His	Pro	Asp	Phe	Glu	Gly	Arg	Ala	165	170	175	
Ile	Trp	Gly	Ser	Asn	His	Val	Asp	Arg	Val	Asn	Gln	Asp	Gln	Asn	Gly				

ES 2 585 652 T3

180	185	190
His Gly Thr His Val Ala Gly Thr Ile Gly Gly Arg Ala Tyr Gly Val 195 200 205		
Ala Lys Lys Ala Thr Ile Val Ala Val Lys Val Leu Asp Ala Gln Gly 210 215 220		
Ser Gly Thr Ile Ser Gly Ile Ile Ala Gly Leu Asp Trp Ser Val Asn 225 230 235 240		
His Ala Arg Gln Asn Gly Val Thr Arg Arg Ala Ala Leu Asn Met Ser 245 250 255		
Leu Gly Gly Gly Arg Ser Ile Ser Phe Asn Gln Ala Ala Ala Ser Ala 260 265 270		
Val Gln Ala Gly Leu Phe Val Ala Val Ala Ala Gly Asn Glu Gly Gln 275 280 285		
Asn Ala Gly Asn Thr Ser Pro Ala Ser Glu Pro Ser Val Cys Thr Val 290 295 300		
Gly Ala Thr Ser Ser Asn Asp Ala Ala Thr Ser Trp Ser Asn Tyr Gly 305 310 315 320		
Ser Val Val Asp Val Tyr Ala Pro Gly Asp Ala Ile Val Ser Thr Trp 325 330 335		
Pro Gly Gly Gly Ser Arg Ser Leu Ser Gly Thr Ser Met Ala Ser Pro 340 345 350		
His Val Ala Gly Leu Gly Ala Tyr Leu Ile Ala Leu Glu Gly Ile Ser 355 360 365		
Gly Gly Ser Val Cys Asp Arg Ile Lys Glu Leu Ala Gln Pro Val Val 370 375 380		
Gln Pro Gly Pro Gly Thr Thr Asn Arg Leu Ile Tyr Asn Gly Ser Gly 385 390 395 400		

Arg

<210> 15

<211> 1376

<212> ADN

<213> *Malbranchea cinnamomea*

<220>
<221> misc_feature
<223> secuencia genómica

5 <400> 15

```

ggtgaaatcc tttcagtcgc caacaaggac agtgttatcc ctgacacgta tatcgtggtg      60
ttgaaggaag gagtttcaac ccaggagttc aatgctcata aaaactgggt gaacgagatt      120
catcgcacca acctcacgag gcgtgacctg ggtttcactg gcgagttaaa gcatagctat      180
gattttggtg gacatggact gaagggctac agcggcaagt ttgatgccac tgccattcag      240
gaaattgcc aatgatcctaa tgtatgcttg ttaagaattc ttcccagcga gatattctca      300
tgcaagccat gcaattgctg acaggtgaat taggtggcct acgtcgaacc ggaccaggag      360
gtgaagcttg atgcattggt gacgcagagt aatgcaccat cctggggcct tggccgtatt      420
tccaaccgac aggctggtat tcgtgattac cactacgatg actccgccgg tgaaggcgctc      480
atcgtctatg atgttgacac cggatttgac atcagccatc cggatttcga gggccgtgct      540
atatgggggt ccaaccatgt cgaccgcgtt aaccaggatc agaatggcca tgggacacac      600
gttgctggta ctattggtgg aagggcgtag ggagtcgcca agaagggcac aatagtggct      660
gtcaagggtt tcgacgcccc ggggtcaggt actatcagcg gtattattgc tggctcttgac      720
tggagtgctc atcatgctcg acagaatgga gtcactagaa gagcggcttt gaacatgagc      780
cttggcggtg ggcgcagtat ctctttcaat caggctgctg caagtgctgt ccaagccgga      840
ttgttcgctg cggttgctgc cggaaatgaa ggggtaagtg acttctttct ggcccctcct      900
atccgtacct gcagaagcta accagattgc tcttattttt tttctttttt caaaatatag      960
caaaatgcag gtaacacttc cccagcctca gagccttctg tttgcacagt aggggcaacc     1020
tcatcgaatg atgccgccac atcctggtcc aactatggct cagttggtac gtagggctcg     1080
gttttattta ttacttcttc cccacatgag atcagaccgg ccgctgacta tatttagttg     1140
acgtttacgc tcccggagac gcaattgtct ctacctggcc cggtgggcgt tccaggtctc     1200
tctcaggcac atcgatggct tctccacacg tcgccggcct gggtcgatac ctcatcgctc     1260
tggagggcat tagcggaggc agtgtatgtg accgtatcaa agagctggct caacctgtcg     1320
tccagcctgg tccaggcacc accaaccgtc ttatctacaa cggcagtggc cgctaa         1376

```

10 <210> 16
<211> 381
<212> PRT
<213> *Malbranchea cinnamomea*

15 <220>
<221> misc_feature
<223> secuencia genómica

<400> 16

ES 2 585 652 T3

Gly	Glu	Ile	Leu	Ser	Val	Ala	Asn	Lys	Asp	Ser	Val	Ile	Pro	Asp	Thr	1	5	10	15
Tyr	Ile	Val	Val	Leu	Lys	Glu	Gly	Val	Ser	Thr	Gln	Glu	Phe	Asn	Ala	20	25	30	
His	Lys	Asn	Trp	Val	Asn	Glu	Ile	His	Arg	Thr	Asn	Leu	Thr	Arg	Arg	35	40	45	
Asp	Leu	Gly	Phe	Thr	Gly	Glu	Leu	Lys	His	Ser	Tyr	Asp	Phe	Gly	Gly	50	55	60	
His	Gly	Leu	Lys	Gly	Tyr	Ser	Gly	Lys	Phe	Asp	Ala	Thr	Ala	Ile	Gln	65	70	75	80
Glu	Ile	Ala	Asn	Asp	Pro	Asn	Val	Ala	Tyr	Val	Glu	Pro	Asp	Gln	Glu	85	90	95	
Val	Lys	Leu	Asp	Ala	Leu	Val	Thr	Gln	Ser	Asn	Ala	Pro	Ser	Trp	Gly	100	105	110	
Leu	Gly	Arg	Ile	Ser	Asn	Arg	Gln	Ala	Gly	Ile	Arg	Asp	Tyr	His	Tyr	115	120	125	
Asp	Asp	Ser	Ala	Gly	Glu	Gly	Val	Ile	Val	Tyr	Asp	Val	Asp	Thr	Gly	130	135	140	
Ile	Asp	Ile	Ser	His	Pro	Asp	Phe	Glu	Gly	Arg	Ala	Ile	Trp	Gly	Ser	145	150	155	160
Asn	His	Val	Asp	Arg	Val	Asn	Gln	Asp	Gln	Asn	Gly	His	Gly	Thr	His	165	170	175	
Val	Ala	Gly	Thr	Ile	Gly	Gly	Arg	Ala	Tyr	Gly	Val	Ala	Lys	Lys	Ala	180	185	190	
Thr	Ile	Val	Ala	Val	Lys	Val	Leu	Asp	Ala	Gln	Gly	Ser	Gly	Thr	Ile	195	200	205	
Ser	Gly	Ile	Ile	Ala	Gly	Leu	Asp	Trp	Ser	Val	Asn	His	Ala	Arg	Gln	210	215	220	
Asn	Gly	Val	Thr	Arg	Arg	Ala	Ala	Leu	Asn	Met	Ser	Leu	Gly	Gly	Gly	225	230	235	240

ES 2 585 652 T3

Arg Ser Ile Ser Phe Asn Gln Ala Ala Ala Ser Ala Val Gln Ala Gly
245 250 255

Leu Phe Val Ala Val Ala Ala Gly Asn Glu Gly Gln Asn Ala Gly Asn
260 265 270

Thr Ser Pro Ala Ser Glu Pro Ser Val Cys Thr Val Gly Ala Thr Ser
275 280 285

Ser Asn Asp Ala Ala Thr Ser Trp Ser Asn Tyr Gly Ser Val Val Asp
290 295 300

Val Tyr Ala Pro Gly Asp Ala Ile Val Ser Thr Trp Pro Gly Gly Gly
305 310 315 320

Ser Arg Ser Leu Ser Gly Thr Ser Met Ala Ser Pro His Val Ala Gly
325 330 335

Leu Gly Ala Tyr Leu Ile Ala Leu Glu Gly Ile Ser Gly Gly Ser Val
340 345 350

Cys Asp Arg Ile Lys Glu Leu Ala Gln Pro Val Val Gln Pro Gly Pro
355 360 365

Gly Thr Thr Asn Arg Leu Ile Tyr Asn Gly Ser Gly Arg
370 375 380

<210> 17
<211> 1004
5 <212> ADN
<213> *Malbranchea cinnamomea*

<220>
<221> misc_feature
10 <223> secuencia genómica

<400> 17
gcattggtga cgcagagtaa tgcacccatcc tggggccttg gccgtatttc caaccgacag 60
gctggtattc gtgattacca ctacgatgac tccgccggtg aaggcgatcat cgtctatgat 120
gttgacaccg gtattgacat cagccatccg gatttcgagg gccgtgctat atgggggttcc 180
aaccatgtcg accgcgttaa ccaggatcag aatggccatg ggacacacgt tgctggtact 240
attggtggaa gggcgtagcg agtcgccaag aaggccacaa tagtggctgt caaggttctc 300
gacgcccagg ggtcaggtac tatcagcgtt attattgctg gtcttgactg gactgtcaat 360
catgctcgac agaattggagt cactagaaga gcggctttga acatgagcct tggcggtggg 420
cgcagtatct ctttcaatca ggctgctgca agtgctgtcc aagccggatt gttcgtcgcg 480

ES 2 585 652 T3

```

gttgctgccg gaaatgaagg ggtaagtgaac ttctttctgg cccctcctat ccgtacctgc      540
agaagctaac cagattgctc ttatTTTTTT tcttttttca aaatatagca aaatgcaggt      600
aacacttccc cagcctcaga gccttctgtt tgcacagtag gggcaacctc atcgaatgat      660
gccgccacat cctgggtccaa ctatggctca gttggtacgt agggctcggg tttatttatt      720
acttcttccc cacatgcgat cagaccggcc gctgactata tttagttgac gtttacgctc      780
ccggagacgc aattgtctct acctggcccg gtggcggttc caggtctctc tcaggcacat      840
cgatggcttc tccacacgtc gccggcctgg gtgcatacct catcgctctg gagggcatta      900
gccggaggcag tgtatgtgac cgtatcaaag agctggctca acctgtcgtc cagcctggtc      960
caggcaccac caaccgtctt atctacaacg gcagtggccg ctaa                        1004

```

<210> 18

<211> 281

5 <212> PRT

<213> *Malbranchea cinnamomea*

<220>

<221> misc_feature

10 <223> secuencia genómica

<400> 18

```

Ala Leu Val Thr Gln Ser Asn Ala Pro Ser Trp Gly Leu Gly Arg Ile
1              5              10              15

```

```

Ser Asn Arg Gln Ala Gly Ile Arg Asp Tyr His Tyr Asp Asp Ser Ala
                20              25              30

```

```

Gly Glu Gly Val Ile Val Tyr Asp Val Asp Thr Gly Ile Asp Ile Ser
35              40              45

```

```

His Pro Asp Phe Glu Gly Arg Ala Ile Trp Gly Ser Asn His Val Asp
50              55              60

```

```

Arg Val Asn Gln Asp Gln Asn Gly His Gly Thr His Val Ala Gly Thr
65              70              75              80

```

```

Ile Gly Gly Arg Ala Tyr Gly Val Ala Lys Lys Ala Thr Ile Val Ala
85              90              95

```

```

Val Lys Val Leu Asp Ala Gln Gly Ser Gly Thr Ile Ser Gly Ile Ile
100             105             110

```

```

Ala Gly Leu Asp Trp Ser Val Asn His Ala Arg Gln Asn Gly Val Thr
115             120             125

```


ES 2 585 652 T3

Arg Arg Ala Ala Leu Asn Met Ser Leu Gly Gly Gly Arg Ser Ile Ser
130 135 140

Phe Asn Gln Ala Ala Ala Ser Ala Val Gln Ala Gly Leu Phe Val Ala
145 150 155 160

Val Ala Ala Gly Asn Glu Gly Gln Asn Ala Gly Asn Thr Ser Pro Ala
165 170 175

Ser Glu Pro Ser Val Cys Thr Val Gly Ala Thr Ser Ser Asn Asp Ala
180 185 190

Ala Thr Ser Trp Ser Asn Tyr Gly Ser Val Val Asp Val Tyr Ala Pro
195 200 205

Gly Asp Ala Ile Val Ser Thr Trp Pro Gly Gly Gly Ser Arg Ser Leu
210 215 220

Ser Gly Thr Ser Met Ala Ser Pro His Val Ala Gly Leu Gly Ala Tyr
225 230 235 240

Leu Ile Ala Leu Glu Gly Ile Ser Gly Gly Ser Val Cys Asp Arg Ile
245 250 255

Lys Glu Leu Ala Gln Pro Val Val Gln Pro Gly Pro Gly Thr Thr Asn
260 265 270

Arg Leu Ile Tyr Asn Gly Ser Gly Arg
275 280

<210> 19

<211> 21

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Secuencia del cebador sentido de PCR DET27 utilizado para la clonación del gen de proteasa de *Malbranchea* ALKO4178.

<400> 19

15 gcaggcaatc ccactcagtt c 21

<210> 20

<211> 19

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Secuencia del cebador antisentido de PCR DET28 utilizado para la clonación del gen de proteasa de *Malbranchea* ALKO4178.

25 <400> 20

atcctgcatt gcccgagtc 19

ES 2 585 652 T3

<210> 21
<211> 45
<212> ADN
5 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de cebador sentido de PCR DET17.

10 <400> 21

tccccgcgga ctgcgcatca tgggcgtctt cagcaaactc ttgta 45

<210> 22
15 <211> 35
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
20 <223> Secuencia de cebador antisentido de PCR DET18.

<400> 22

cgcggtatcct tagcgccac tgccgttgta gataa 35
25

REIVINDICACIONES

1. Molécula aislada de ácidos nucleicos que comprende una secuencia polinucleótida que codifica una enzima serina proteasa seleccionada de entre el grupo que consiste en:
 - (a) una molécula de ácidos nucleicos codificante de un polipéptido que presenta una actividad de serina proteasa y que comprende la secuencia de aminoácidos descrita en SEC ID nº 18,
 - (b) una molécula de ácidos nucleicos codificante de un polipéptido que presenta una actividad de serina proteasa y una identidad de por lo menos 85% respecto a la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 18,
 - (c) una molécula de ácidos nucleicos que comprende la secuencia codificante de la secuencia de nucleótidos descrita en SEC ID nº 17,
 - (d) una molécula de ácidos nucleicos que comprende la secuencia codificante de la secuencia polinucleótida incluida en pALK3094 depositada en *Escherichia coli* RF8791 con el número de acceso DSM 24410,
 - (e) una molécula de ácidos nucleicos, la secuencia codificante de la cual difiere de la secuencia codificante de una molécula de ácidos nucleicos según cualquiera de entre (c) a (d) debido a la degeneración del código genético, y
 - (f) una molécula de ácidos nucleicos que comprende una secuencia polinucleótida que se hibrida bajo condiciones restrictivas con una molécula de ácidos nucleicos de SEC ID nº 17.
2. Molécula aislada de ácidos nucleicos según la reivindicación 1, caracterizada por que dicha molécula de ácidos nucleicos que comprende una secuencia polinucleótida se hibrida bajo condiciones restrictivas con una secuencia polinucleótida incluida en el plásmido pALK3092 que comprende la secuencia de nucleótidos SEC ID nº 11 en *E. coli* RF8758, depositada con el número de acceso DSM 24426, o se hibrida bajo condiciones restrictivas con una secuencia polinucleótida incluida en el plásmido pALK3093 que comprende la secuencia de nucleótidos SEC ID nº 12, depositada en *E. coli* RF8759 con el número de acceso DSM 24427.
3. Molécula aislada de ácidos nucleicos según la reivindicación 1 o 2, en la que la molécula de ácidos nucleicos aislada comprende una secuencia polinucleótida que se hibrida bajo condiciones restrictivas con una molécula de ácidos nucleicos de SEC ID nº 17.
4. Vector de expresión recombinante que comprende la secuencia de nucleótidos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 operablemente ligada a unas secuencias reguladoras capaces de dirigir la expresión de dicha enzima serina proteasa en un huésped adecuado.
5. Célula huésped que comprende el vector de expresión recombinante según la reivindicación 4.
6. Célula huésped según la reivindicación 5, caracterizada por que dicho huésped es un huésped microbiano.
7. Célula huésped según la reivindicación 5 o 6, caracterizada por que dicho huésped es un hongo filamentoso.
8. Célula huésped según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, caracterizada por que dicho huésped es del género *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Humicola*, *Chrysosporium*, *Neurospora*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Myceliophthora* y *Mortierella*.
9. Célula huésped según la reivindicación 8, caracterizada por que dicho huésped es *Trichoderma* o *Aspergillus*.
10. Célula huésped según la reivindicación 9, caracterizada por que dicho huésped es *T. reesei*.
11. Procedimiento para producir un polipéptido que presenta una actividad de serina proteasa, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de cultivar la célula huésped según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 10 y de recuperar el polipéptido.
12. Enzima serina proteasa recombinante, caracterizada por que dicha enzima presenta una actividad de serina proteasa y comprende la secuencia de aminoácidos codificada por la molécula de ácidos nucleicos aislada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
13. Enzima serina proteasa recombinante según la reivindicación 12, caracterizada por que dicha enzima comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID nº 18.
14. Enzima serina proteasa recombinante según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 13, caracterizada por que dicha enzima es obtenida a partir de *Malbranchea* ALKO4122 cepa depositada CBS 128533 o a partir de

Malbranchea ALKO4178 cepa depositada CBS 128564.

15. Enzima serina proteasa recombinante según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, caracterizada por que una forma madura de dicha enzima presenta una masa molecular comprendida entre 20 y 35 kDa.
16. Enzima serina proteasa recombinante según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15, caracterizada por que una forma madura de dicha enzima presenta una masa molecular comprendida entre 25 y 33 kDa.
17. Enzima serina proteasa recombinante según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 16, caracterizada por que una forma madura de dicha enzima presenta una masa molecular comprendida entre 28 y 30 kDa.
18. Enzima serina proteasa recombinante según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 17, caracterizada por que dicha enzima presenta un óptimo de temperatura a pH 8,5 utilizando un tiempo de reacción de 30 min. y caseína como sustrato de entre 50°C y 80°C.
19. Enzima serina proteasa recombinante según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 18, caracterizada por que dicha enzima presenta un óptimo de temperatura a pH 8,5 utilizando un tiempo de reacción de 30 min. y caseína como sustrato a 70°C.
20. Serina proteasa recombinante según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 17, caracterizada por que dicha enzima presenta un óptimo de pH a una temperatura de 50°C utilizando un tiempo de reacción de 30 min. y caseína como sustrato a un pH 10.
21. Preparación de enzima, que comprende la enzima serina proteasa recombinante según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 20.
22. Preparación de enzima según la reivindicación 21, caracterizada por que dicha preparación comprende otras enzimas seleccionadas de entre el grupo que consiste en proteasas, amilasas, celulasas, lipasas, xilanasas, mananasas, cutinasas, pectinasas y oxidasas, con o sin un mediador.
23. Preparación de enzima según cualquiera de las reivindicaciones 21 a 22, caracterizada por que dicha preparación comprende uno o más aditivos seleccionados de entre el grupo que consiste en estabilizadores, tampones, surfactantes, mejoradores, agentes blanqueadores, mediadores, agentes anticorrosión, agentes anti-redeposición, agentes cáusticos, abrasivos, abrillantadores ópticos, tintes, perfumes, pigmentos y conservantes.
24. Preparación de enzima según cualquiera de las reivindicaciones 21 a 23, caracterizada por que dicha preparación de enzima se encuentra en forma de líquido, polvos, granulado o tabletas.
25. Utilización de la enzima serina proteasa recombinante según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 20 o la preparación de enzima según cualquiera de las reivindicaciones 21 a 24 para detergentes, para el tratamiento de fibras, para el tratamiento de materiales proteicos, para el tratamiento de alimentos o piensos, o para aplicaciones que implican la modificación, degradación o eliminación de material proteico.
26. Utilización de la enzima serina proteasa recombinante según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 20 o la preparación de enzima según cualquiera de las reivindicaciones 21 a 24, en la que los materiales proteicos se seleccionan de entre lana, cabello, cuero y seda.
27. Utilización de la enzima serina proteasa recombinante según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 17 o la preparación de enzima según cualquiera de las reivindicaciones 21 a 24 como aditivo detergente.
28. Utilización de una enzima serina proteasa recombinante según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 20 o la preparación de enzima según cualquiera de las reivindicaciones 21 a 24 en detergentes líquidos, en detergente en polvo y en pastillas de detergente.
29. Composición de detergente, caracterizada por que dicha composición comprende unos surfactantes, la enzima serina proteasa recombinante según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 20 o la preparación de enzima según cualquiera de las reivindicaciones 21 a 24, y unos aditivos seleccionados de entre el grupo que consiste en estabilizadores, tampones, mejoradores, agentes blanqueadores, mediadores, agentes anticorrosión, agentes anti-redeposición, agentes cáusticos, abrasivos, abrillantadores ópticos, tintes, perfumes, pigmentos y conservantes.
30. Composición de detergente según la reivindicación 29, caracterizada por que dicha composición comprende otras enzimas seleccionadas de entre el grupo que consiste en proteasas, amilasas, celulasas, lipasas, xilanasas, mananasas, cutinasas, pectinasas y oxidasas, con o sin un mediador.

1 tcatgagcag gcaatccac tcagttcaat tttgttgatc tacattaatc atgggcgtct
1 DET27 (s) m g v

61 tcagcaaact cttgtatctg tcttttgcag tcacggcctc tgtcaatgcc ggtgaaatcc
4 f s k l l y l s f a v t a s v n a g e i

121 tttcagtcgc caacaaggac agtggttatcc ctgacacgta tatcgtggtg ttgaaggaag
24 l s v a n k d s v i p d t y i v v l k e

181 gagtttcaac ccaggagttc aatgctcata aaaactgggt gaacgagatt catcgcacca
44 g v s t q e f n a h k n w v n e i h r t

241 acctcacgag gcgtgacctg ggttttcaactg gcgagttaaa gcatagctat gatttttggtg
64 n l t r r d l g f t g e l k h s y d f g

301 gacatggact gaagggctac agcggcaagt ttgatgccac tgccattcag gaaattgcc
84 g h g l k g y s g k f d a t a i q e i a

361 atgatcctaa tgtatgcttg ttaagaattc ttcccagcga gatatcttca tqcaagccat
104 n d p n *Intrón 1*

421 gcaattgctg acaggtgaat taggtggcct acgtcgaacc ggaccaggag gtgaagcttg
108 v a y v e p d q e v k l

481 atGCATTGGT GACGCAGAGT AATGCACCAT CCTGGGGCCT TGGCCGTATT TCCAACCGAC
120 d A L V T Q S N A P S W G L G R I S N R

541 AGGCTGGTAT TCGTGATTAC CACTACGATG ACTCCGCCGG TGAAGGCGTC ATCGTCTATG
140 Q A G I R D Y H Y D D S A G E G V I V Y

601 ATGTTGACAC CGGTATTGAC ATCAGCCATC CGGATTTCTGA GGGCCGTGCT ATATGGGGTT
160 D V D T G I D I S H P D F E G R A I W G

661 CCAACCATGT CGACCGCGTT AACCAGGATC AGAATGGCCA TGGGACACAC GTTGCTGGTA
180 S N H V D R V N Q D Q N G H G T H V A G

721 CTATTGGTGG AAGGGCGTAC GGAGTCGCCA AGAAGGCCAC AATAGTGGCT GTCAAGGTTT
200 T I G G R A Y G V A K K A T I V A V K V

781 TCGACGCCCA GGGGTCAGGT ACTATCAGCG GTATTATTGC TGGTCTTGAC TGGAGTGTCA
220 L D A Q G S G T I S G I I A G L D W S V

841 ATCATGCTCG ACAGAATGGA GTCAGTAGAA GAGCGGCTTT GAACATGAGC CTTGGCGGTG
240 N H A R Q N G V T R R A A L N M S L G G

901 GGCGCAGTAT CTCTTTCAAT CAGGCTGCTG CAAGTGCTGT CCAAGCCGGA TTGTTCTGTCG
260 G R S I S F N Q A A A S A V Q A G L F V

Fig. 1A

ES 2 585 652 T3

961 CGGTTGCTGC CGGAAATGAA GGGgtaagtg acttctttct ggcctcct atccgtacct
 280 A V A A G N E G Intrón 2
 1021 gcagaagcta accagattgc tcttatTTTT tttctTTTTT caaaatatag CAAAATGCAG
 288 Q N A
 1081 GTAACACTTC CCCAGCCTCA GAGCCTTCTG TTTGCACAGT AGGGGCAACC TCATCGAATG
 291 G N T S P A S E P S V C T V G A T S S N
 1141 ATGCCGCCAC ATCCTGGTCC AACTATGGCT CAGTTGgtac gtagggctcg gttttattta
 311 D A A T S W S N Y G S V
 1201 ttacttcttc cccacatgcg atcagaccgg ccgctgacta tatttaTTG ACGTTTACGC
 323 Intrón 3 V D V Y
 1261 TCCCGGAGAC GCAATTGTCT CTACCTGGCC CGGTGGCGGT TCCAGGTCTC TCTCAGGCAC
 327 A P G D A I V S T W P G G G S R S L S G
 1321 ATCGATGGCT TCTCCACACG TCGCCGGCCT GGTGCATAC CTCATCGCTC TGGAGGGCAT
 347 T S M A S P H V A G L G A Y L I A L E G
 1381 TAGCGGAGGC AGTGTATGTG ACCGTATCAA AGAGCTGGCT CAACCTGTCT TCCAGCCTGG
 367 I S G G S V C D R I K E L A Q P V V Q P
 1441 TCCAGGCACC ACCAACCGTC TTATCTACAA CGGCAGTGGC CGCtaaattg atagtagcta
 387 G P G T T N R L I Y N G S G R *
 1501 cagaaggcat agggcttgcg gcgactcggg caatgcagga tatttt
 DET28 (as)

Fig. 1B

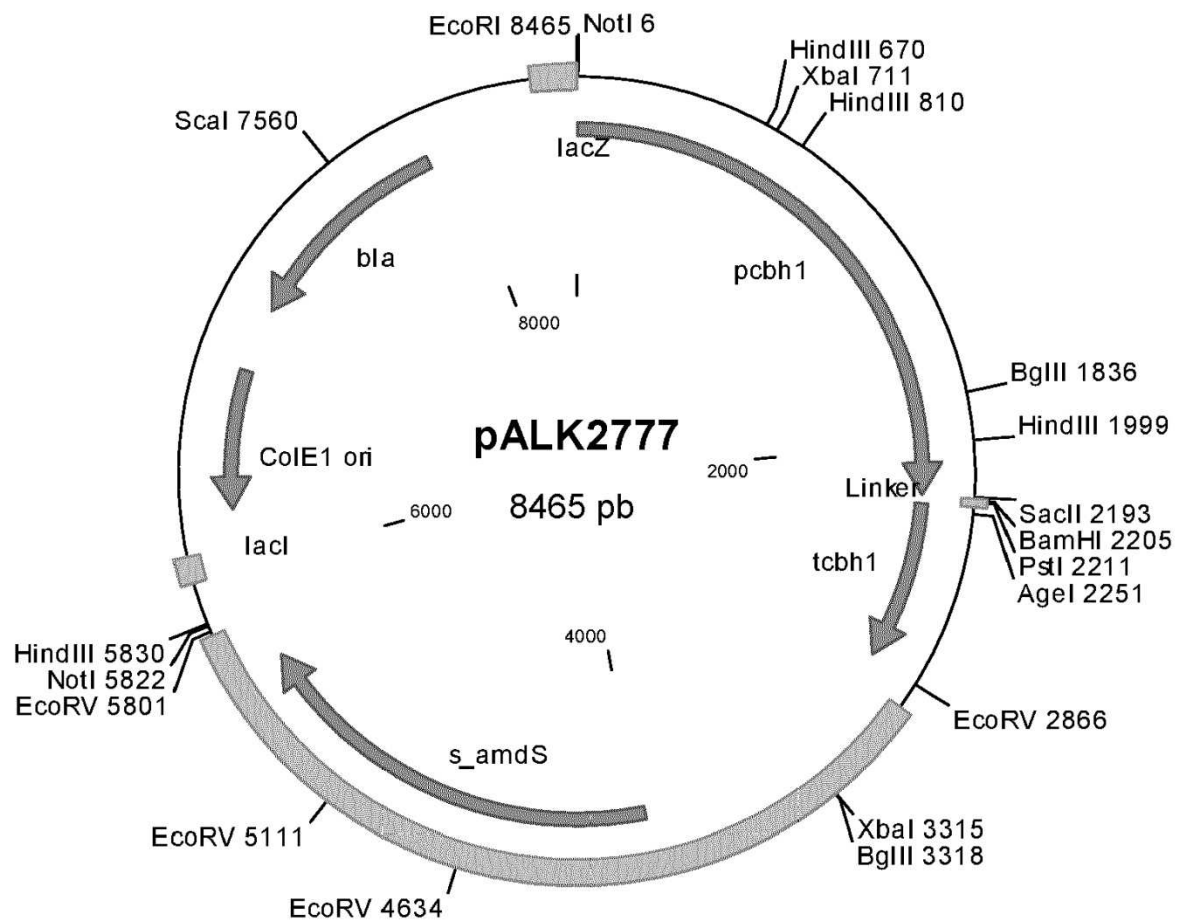


Fig. 2

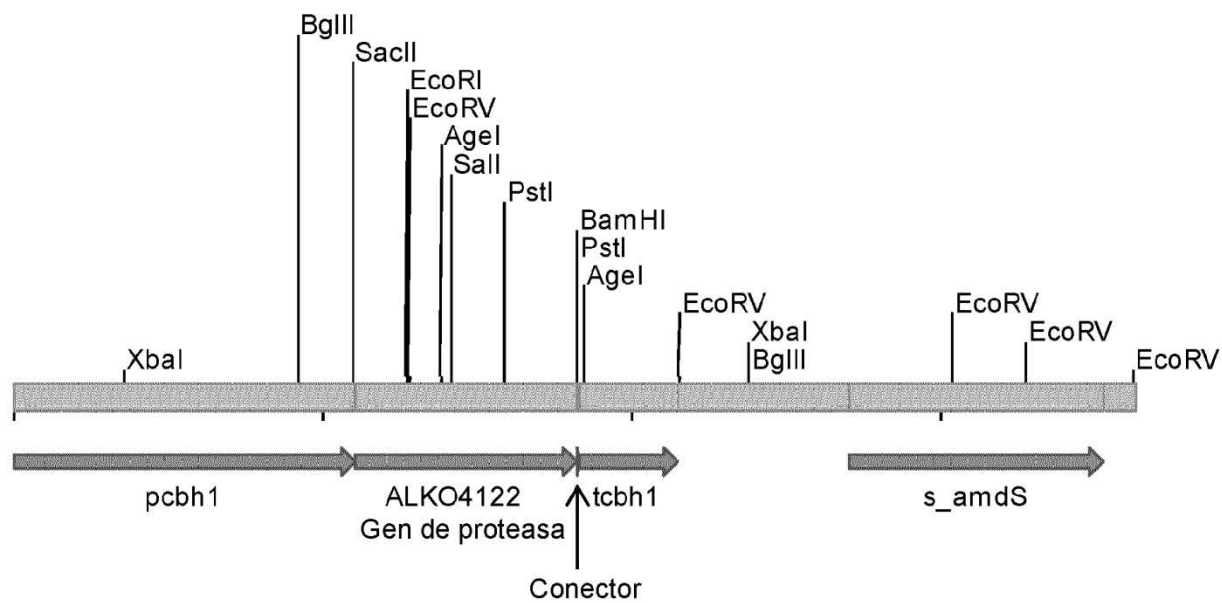


Fig. 3

Carril 1 Carril 2

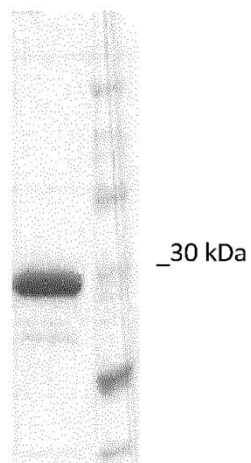


Fig. 4

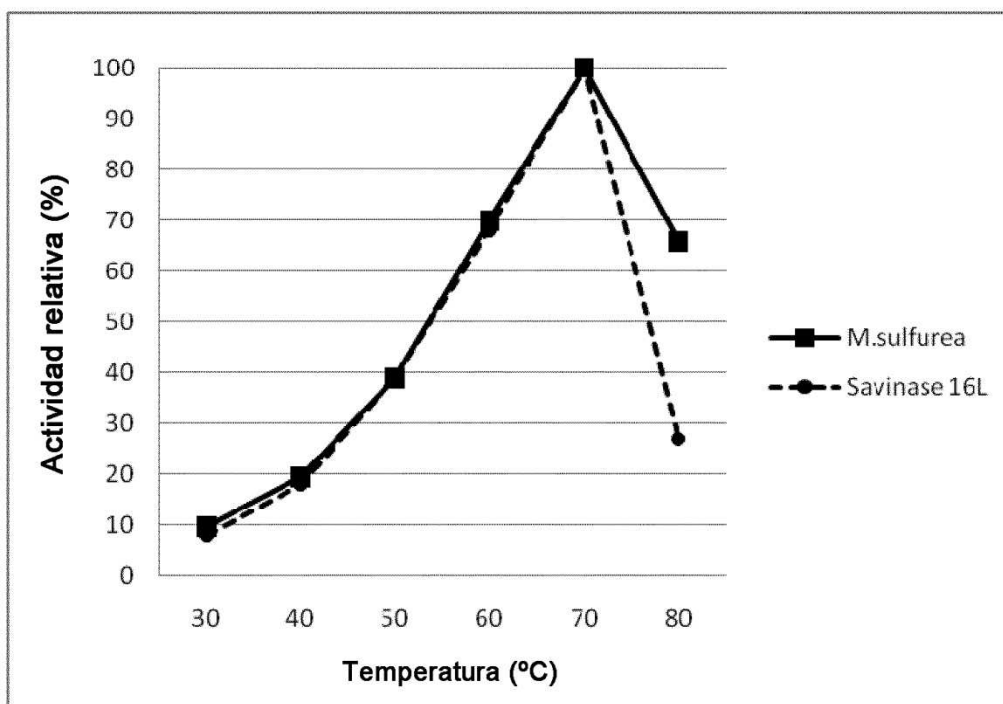


Fig. 5A

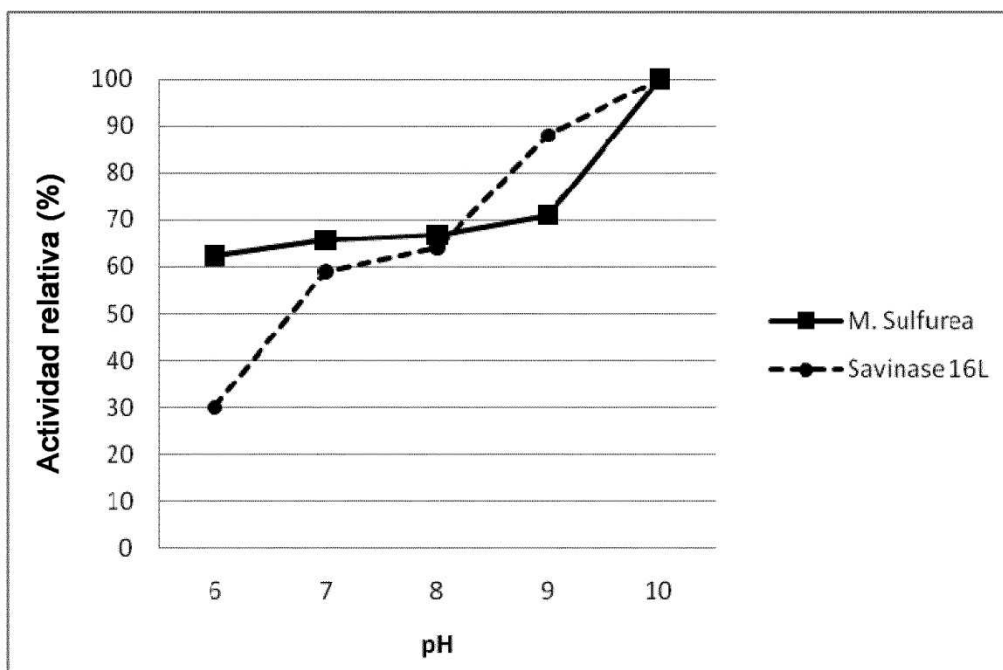


Fig. 5B

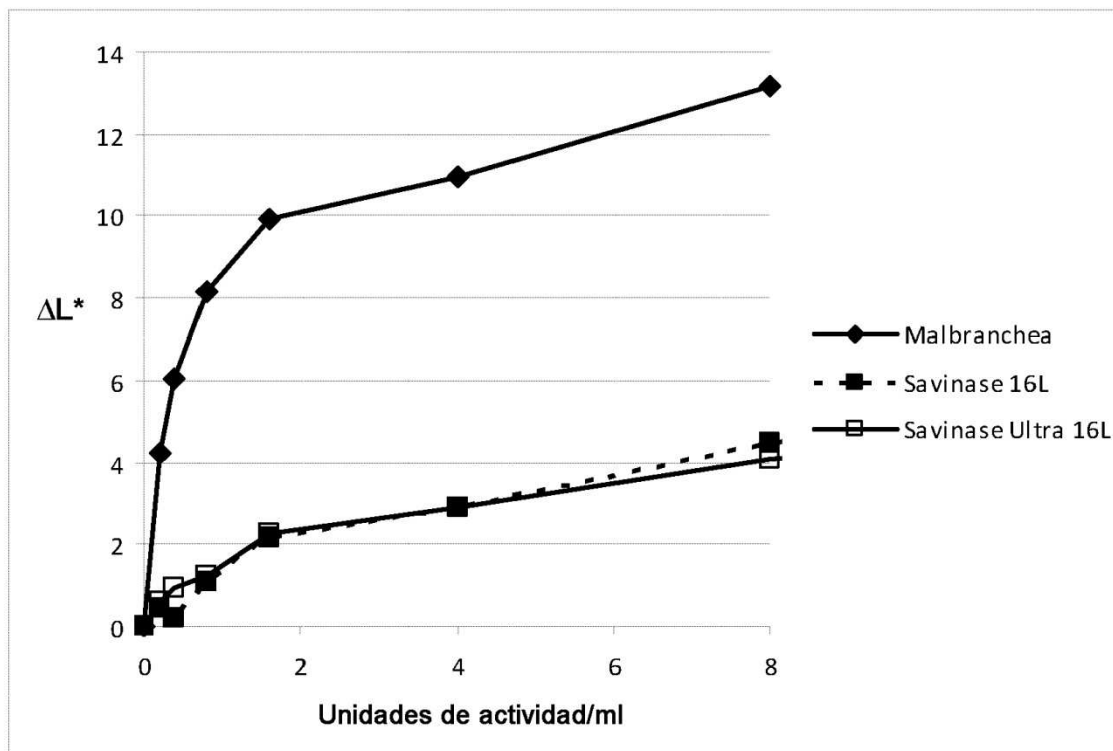


Fig. 6A

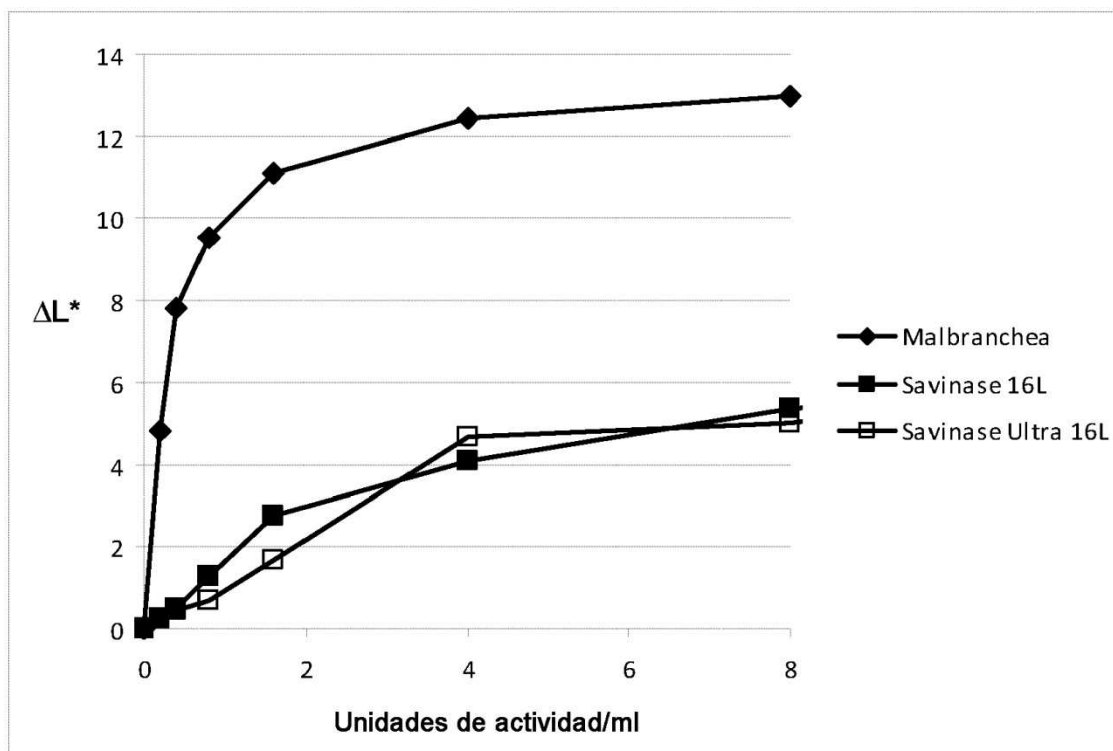


Fig. 6B

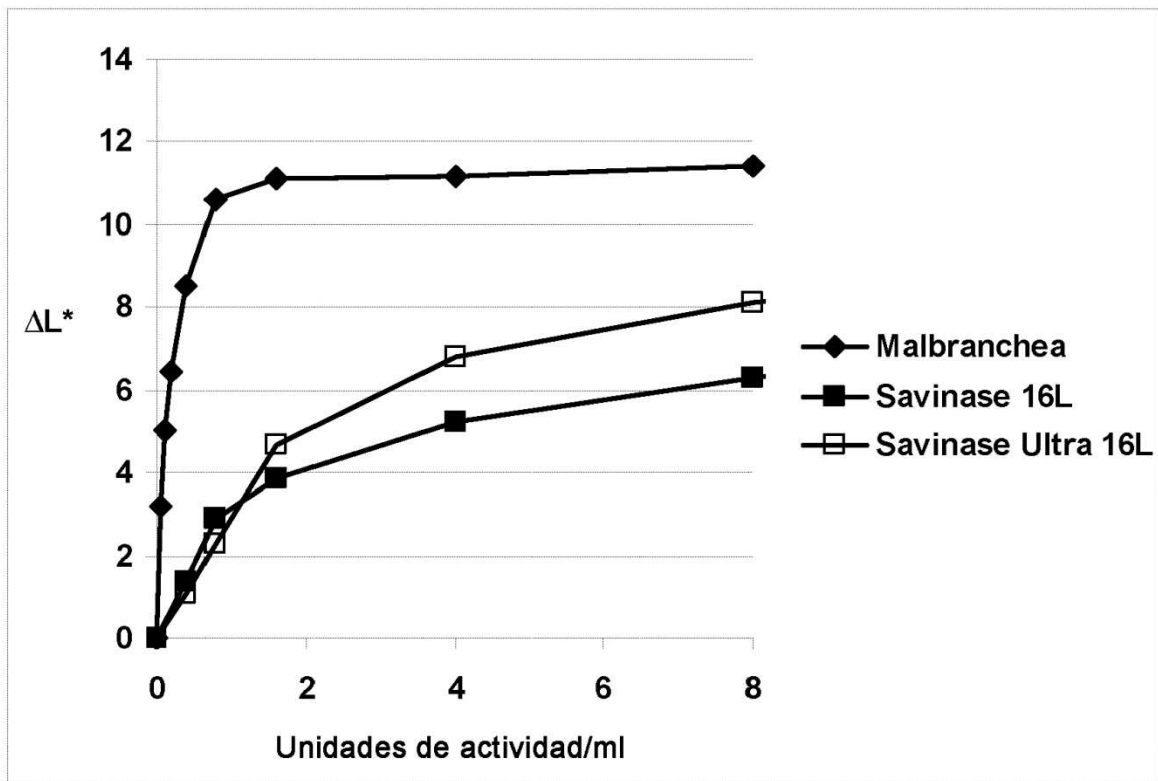


Fig. 6C

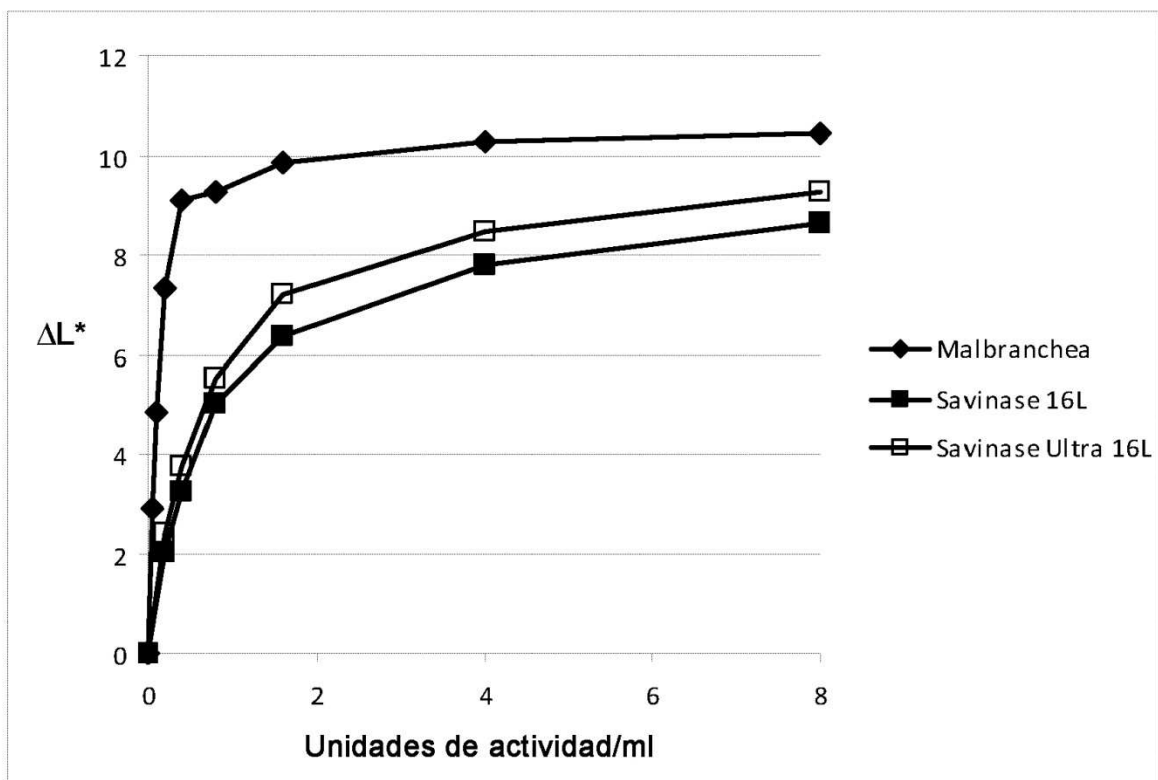


Fig. 6D

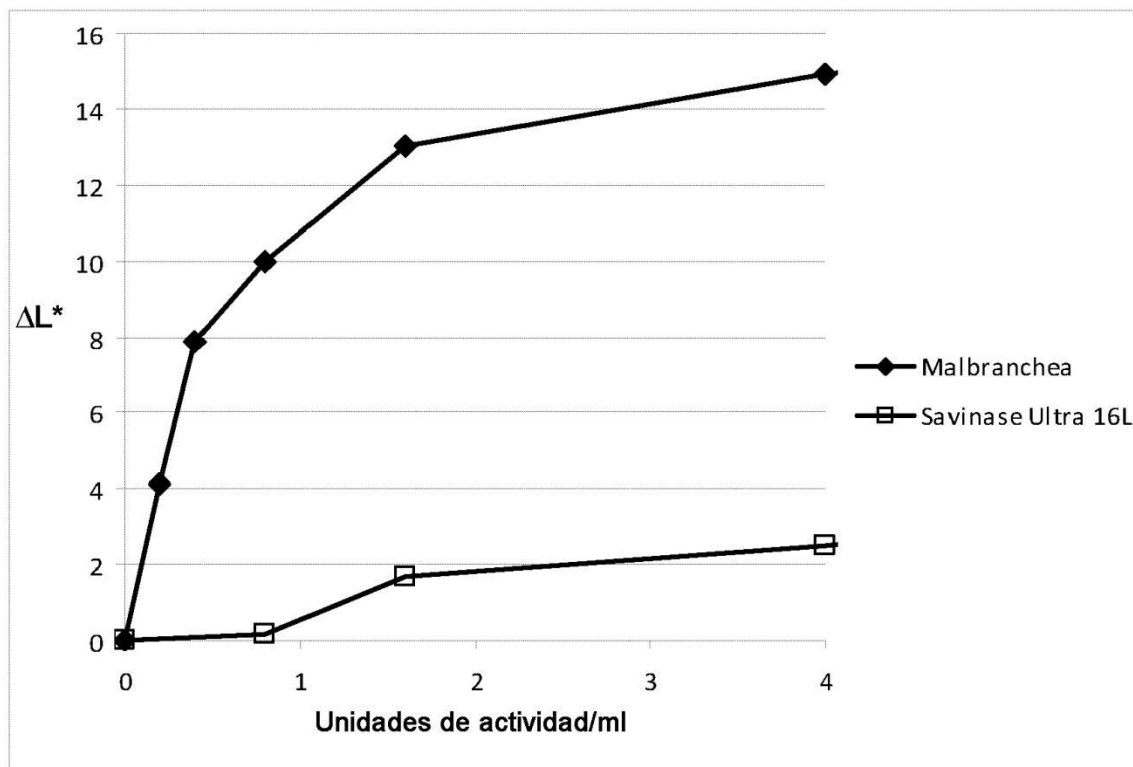


Fig. 7A

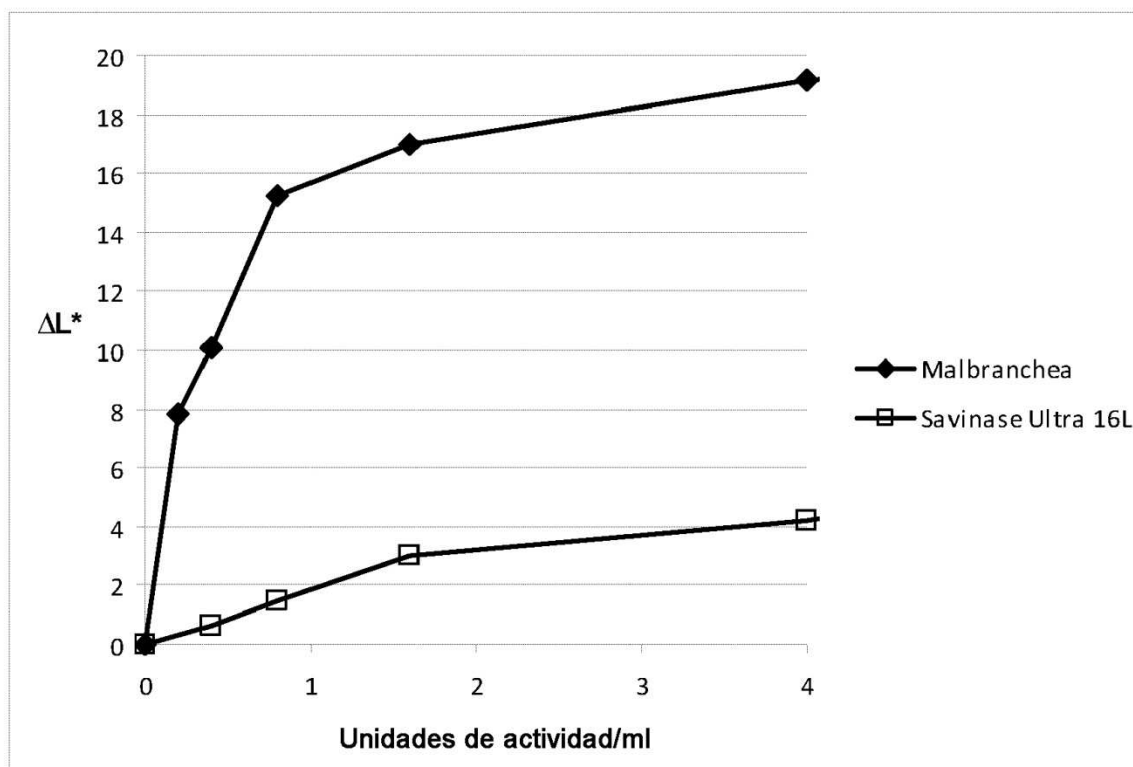


Fig. 7B

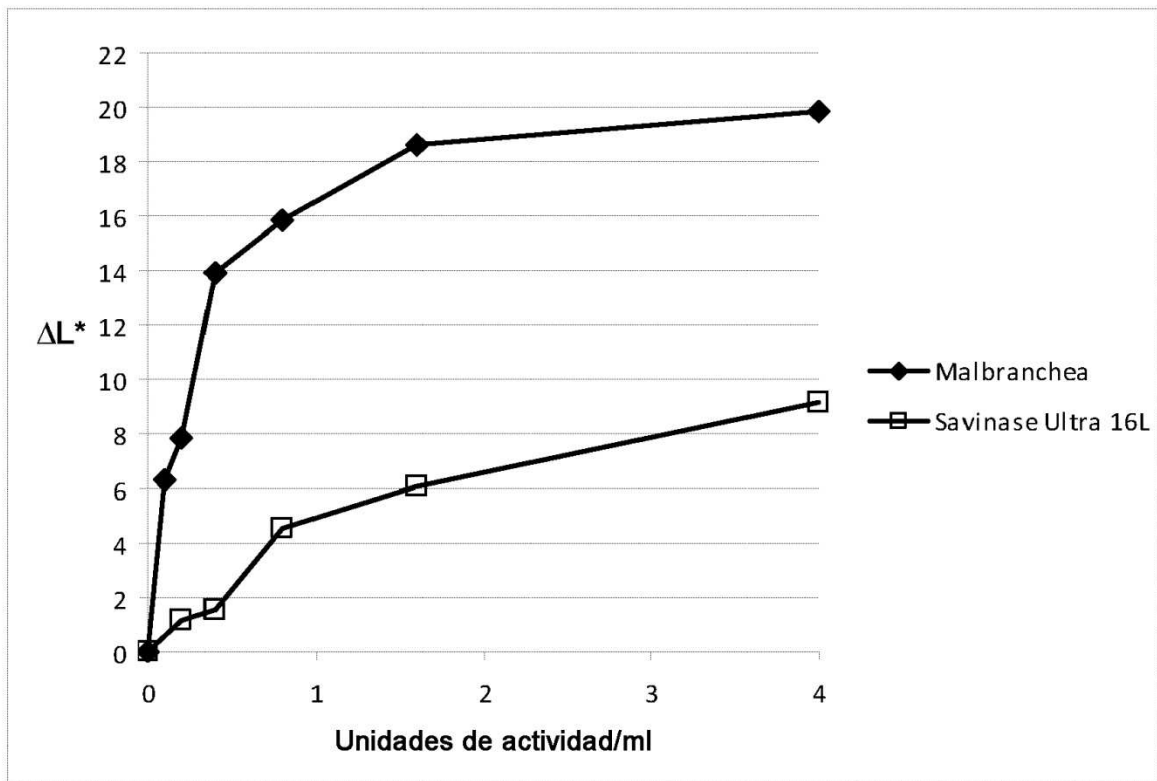


Fig. 7C

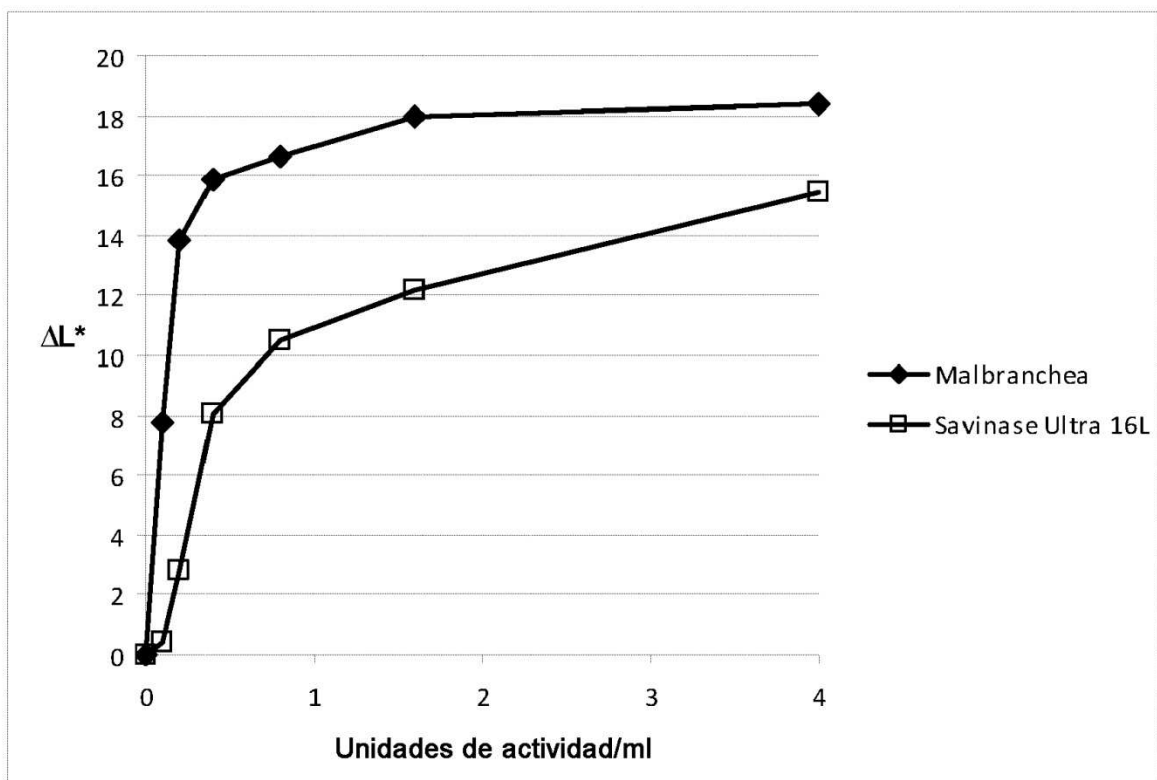


Fig. 7D

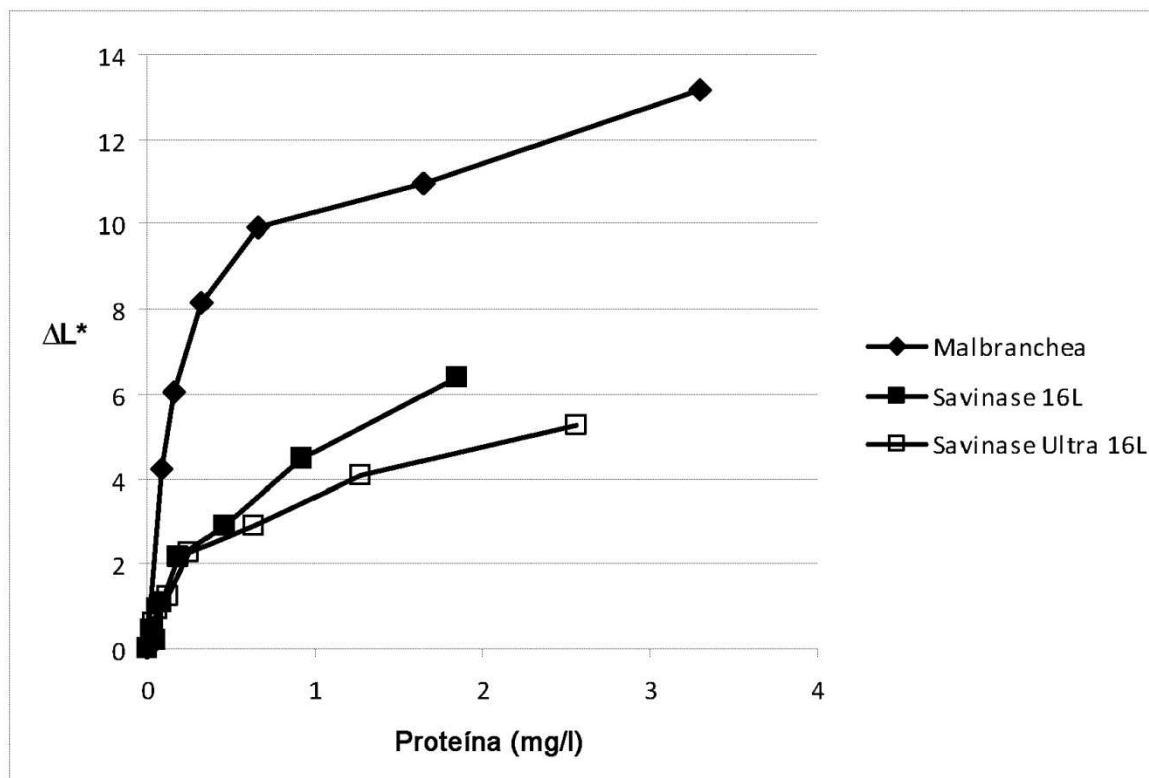


Fig. 8A

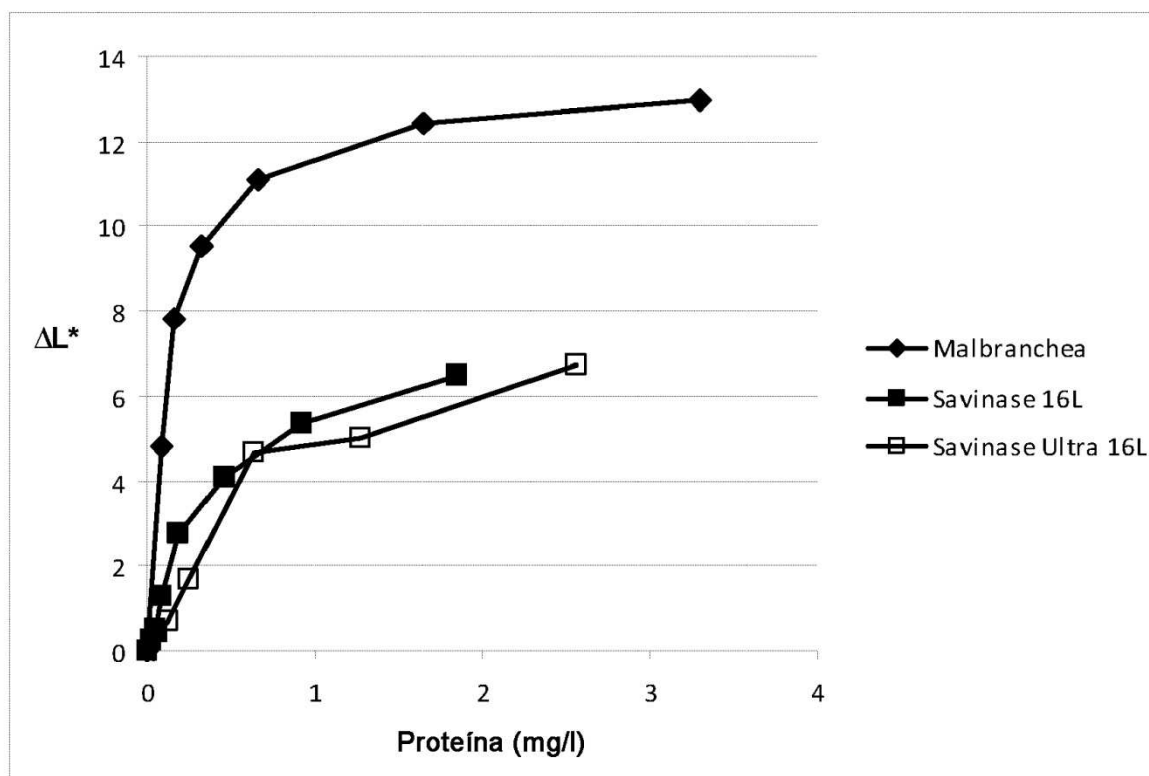


Fig. 8B

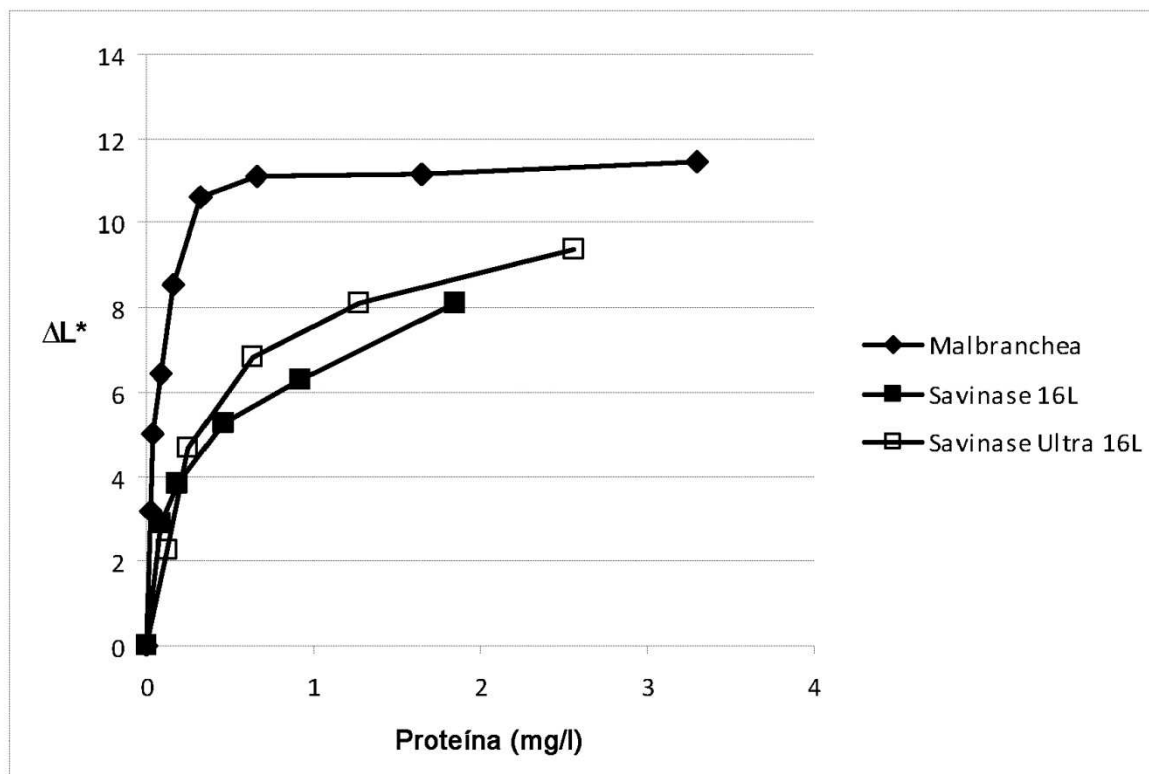


Fig. 8C

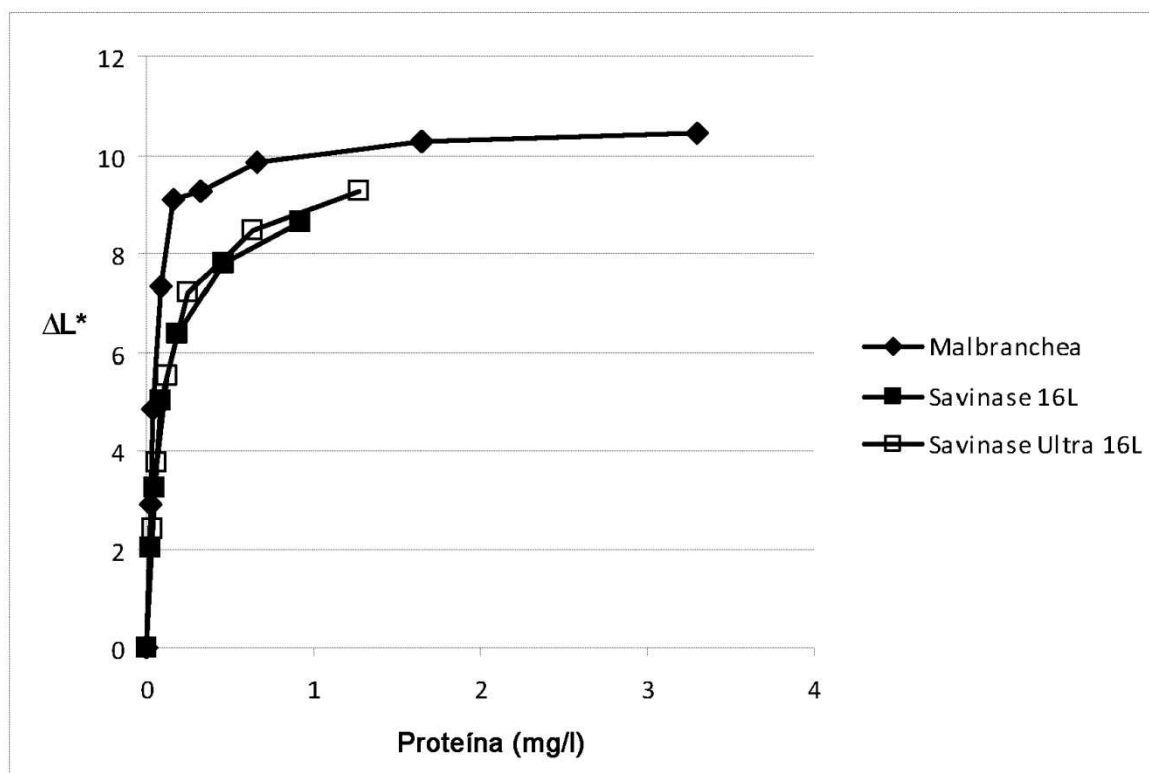


Fig. 8D

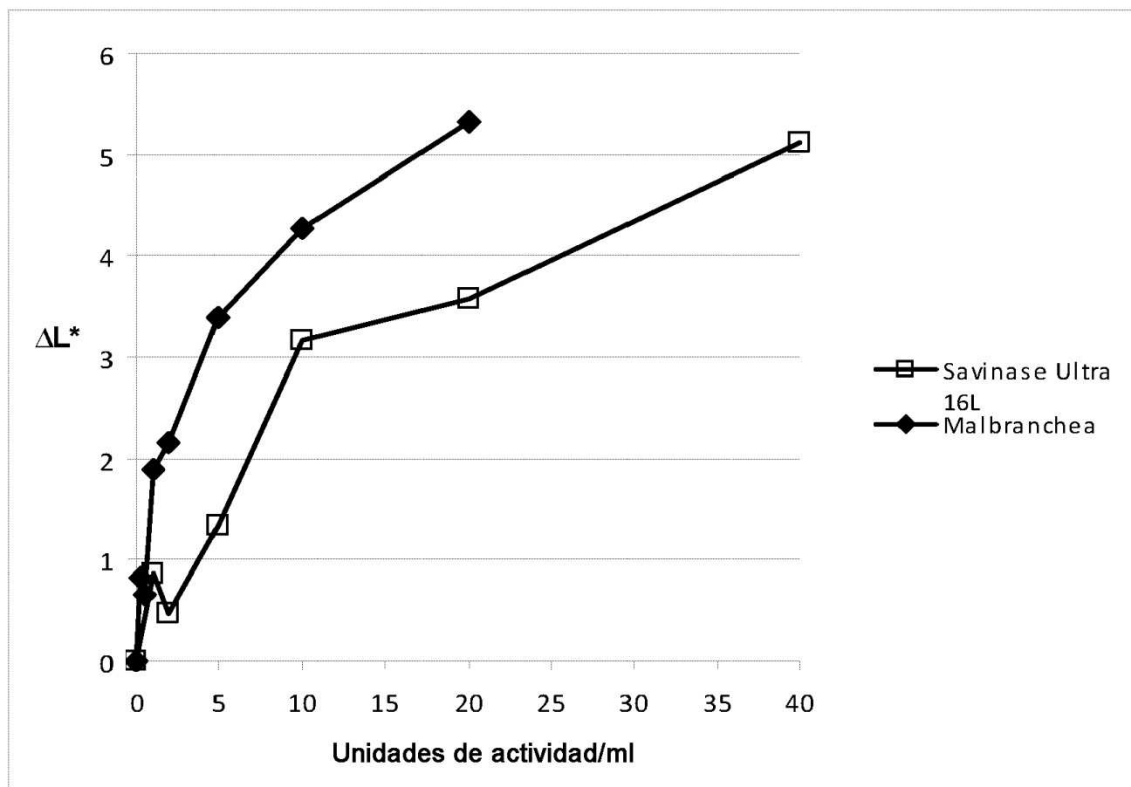


Fig. 9A

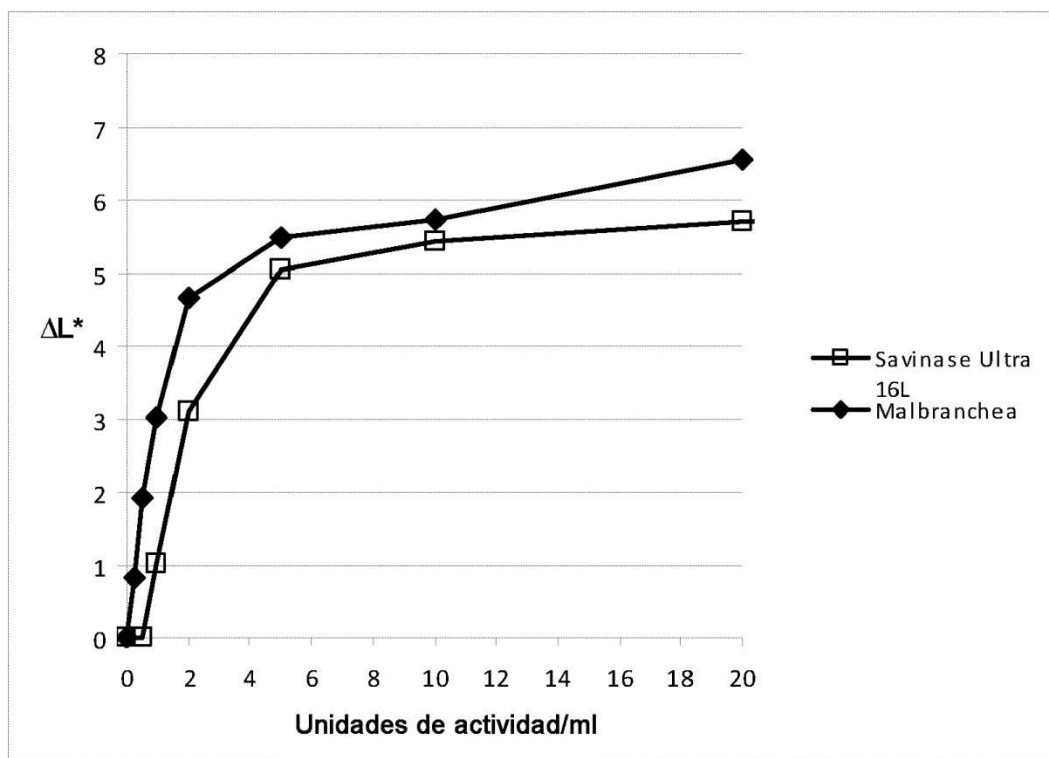


Fig. 9B

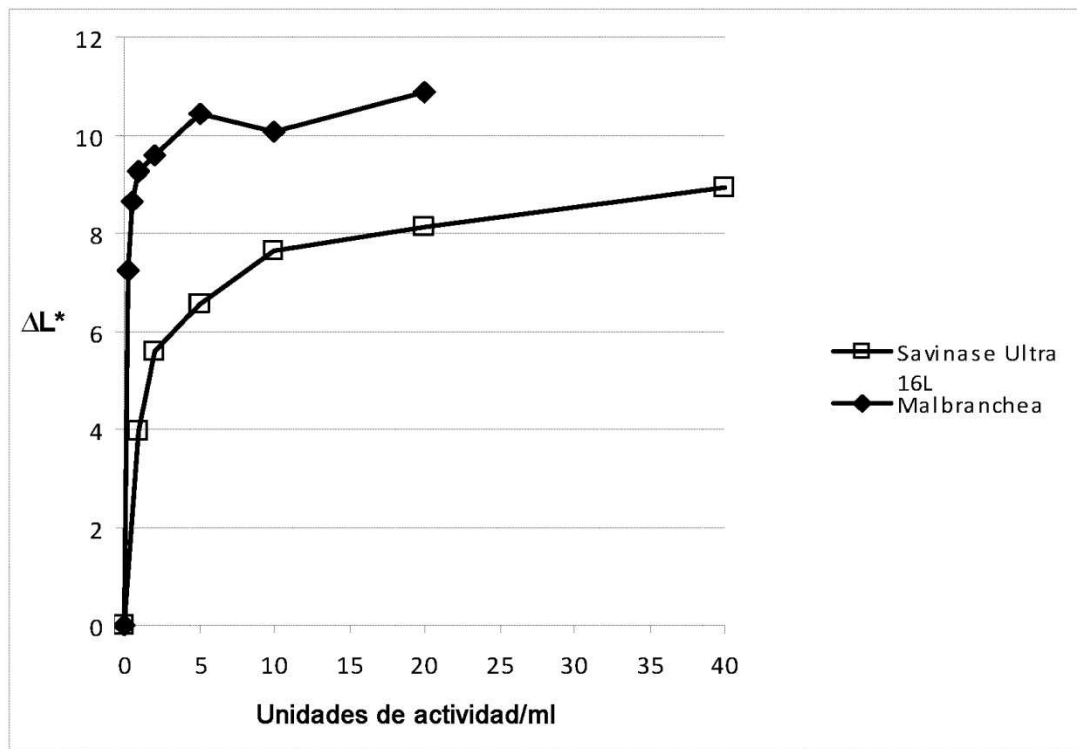


Fig. 9C

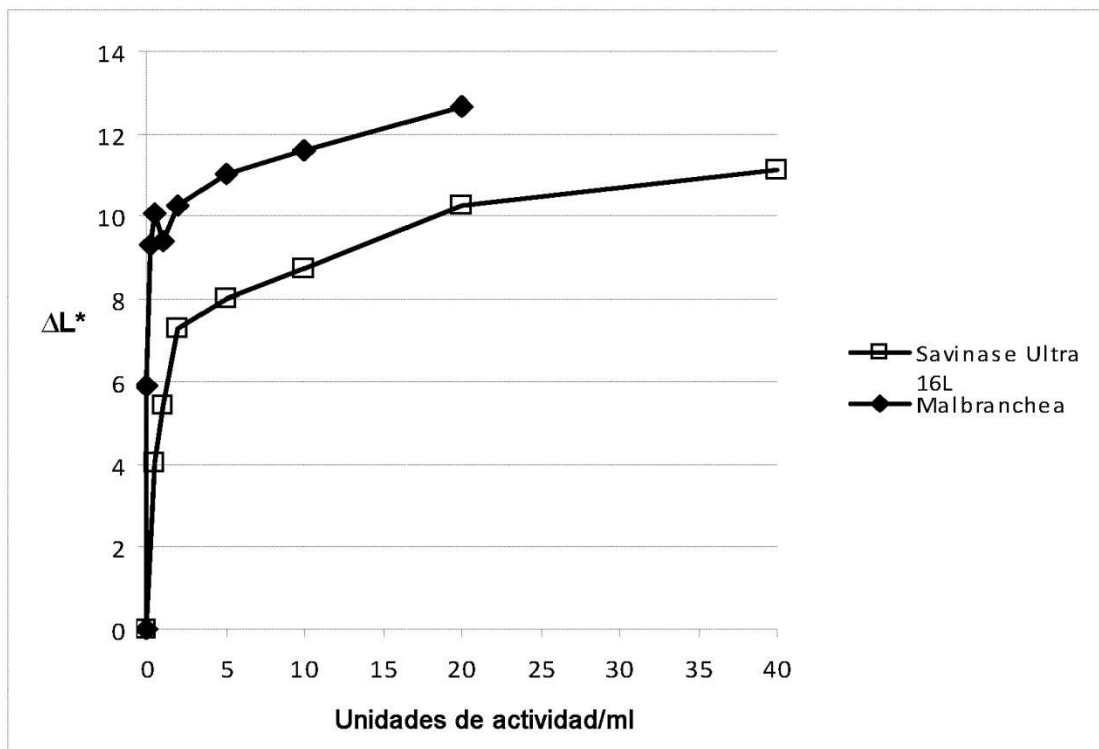


Fig. 9D

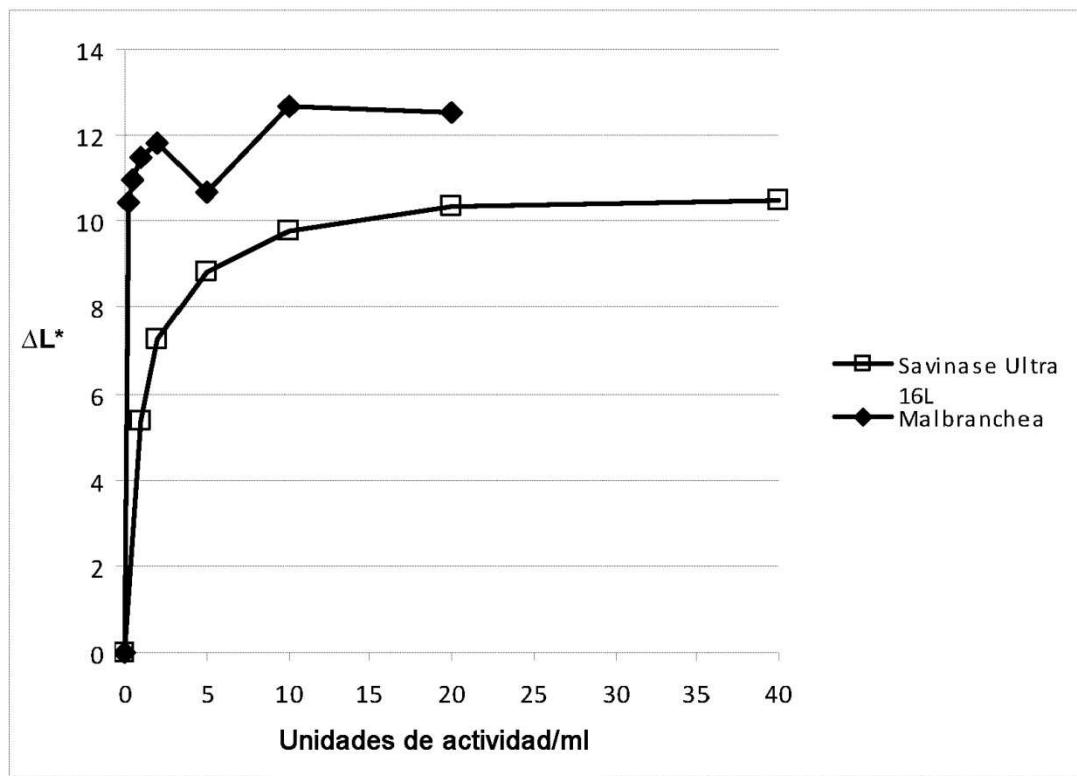


Fig. 9E

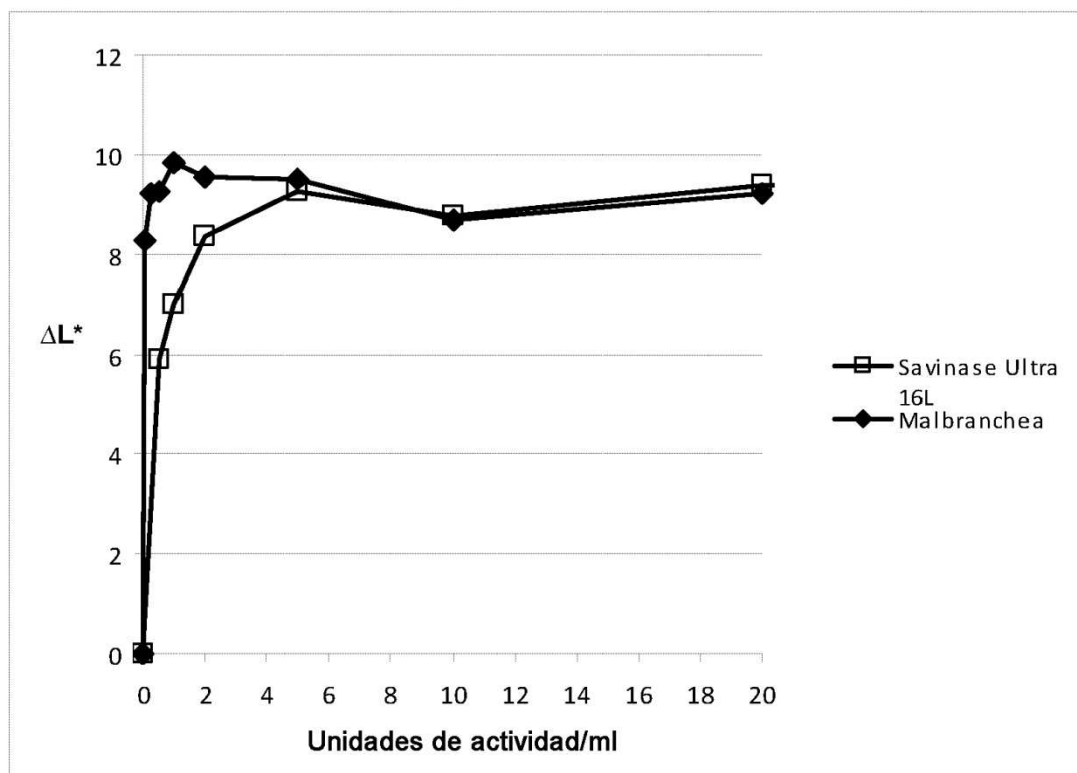


Fig. 9F

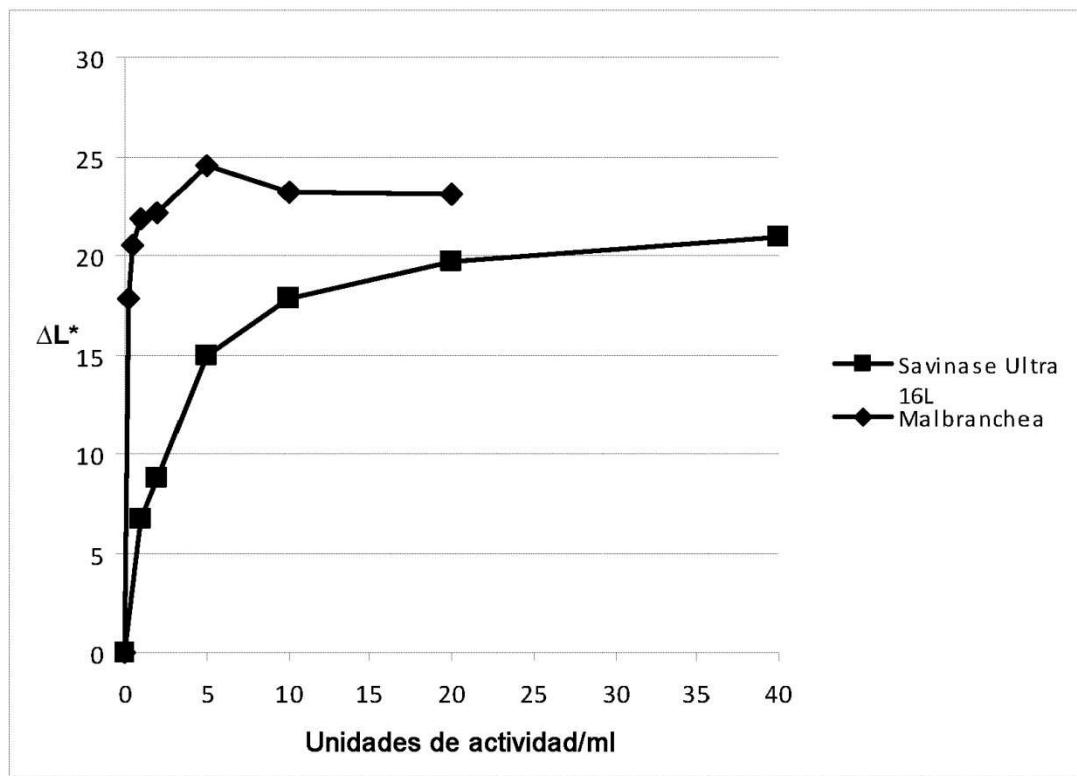


Fig. 9G

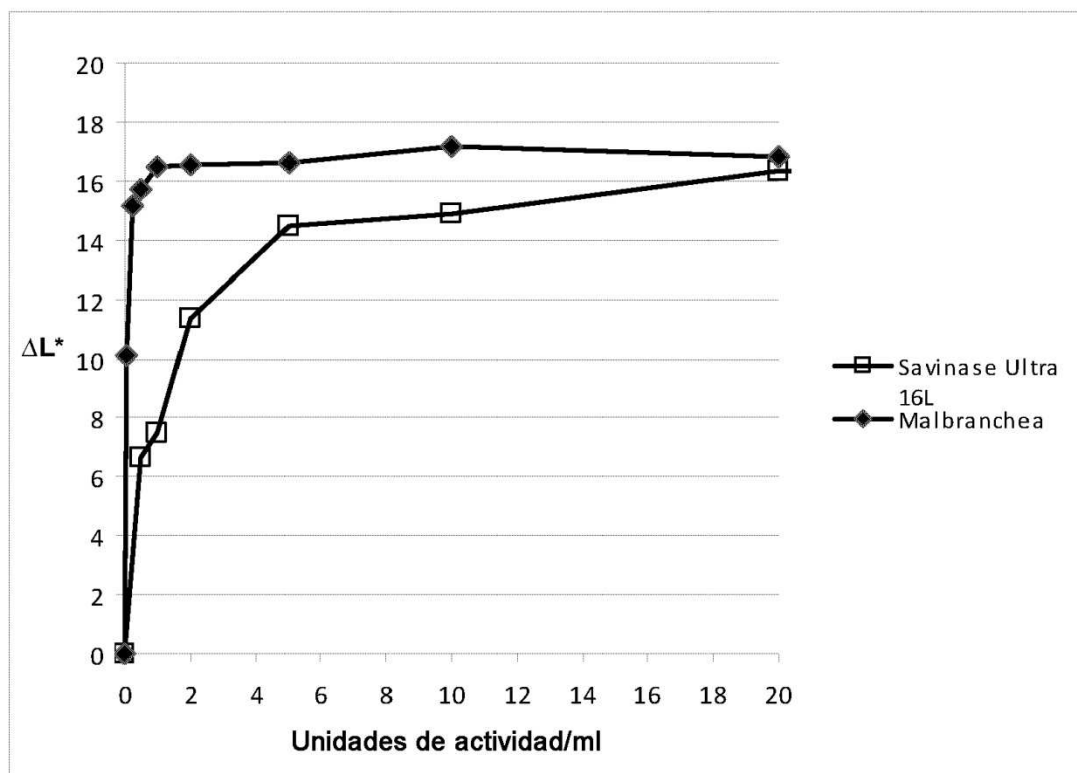


Fig. 9H

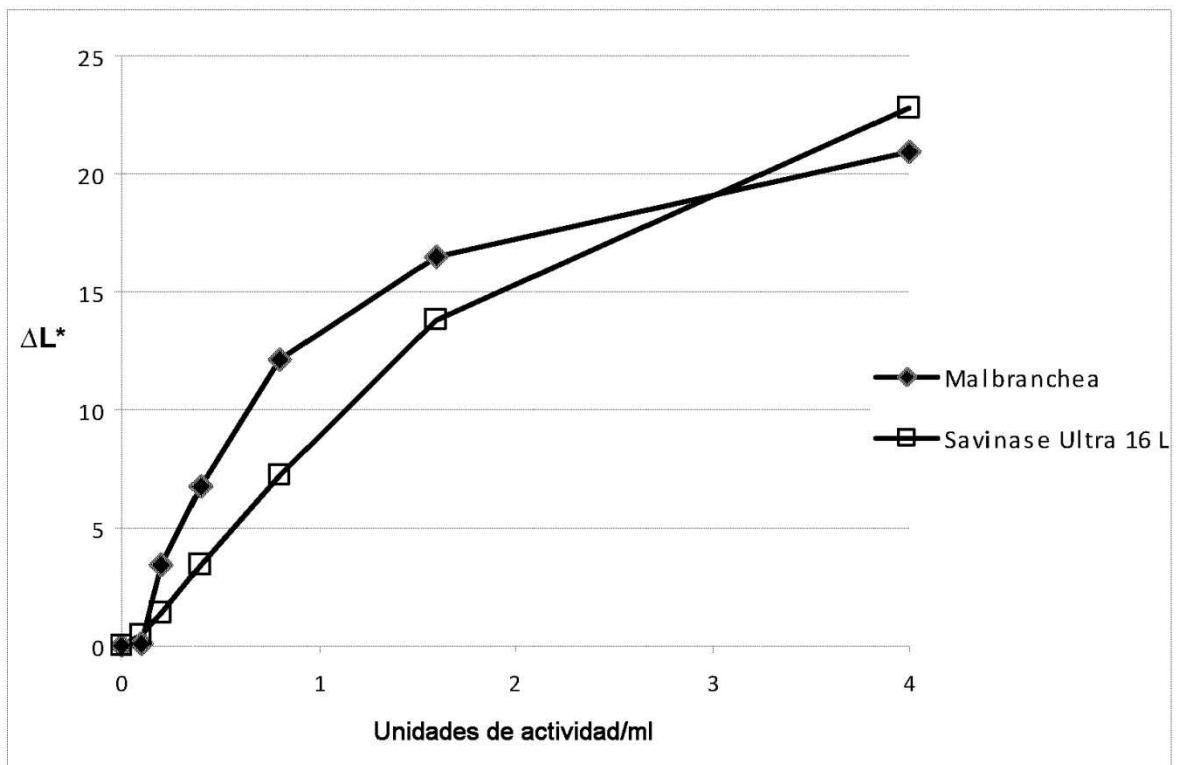


Fig. 10A

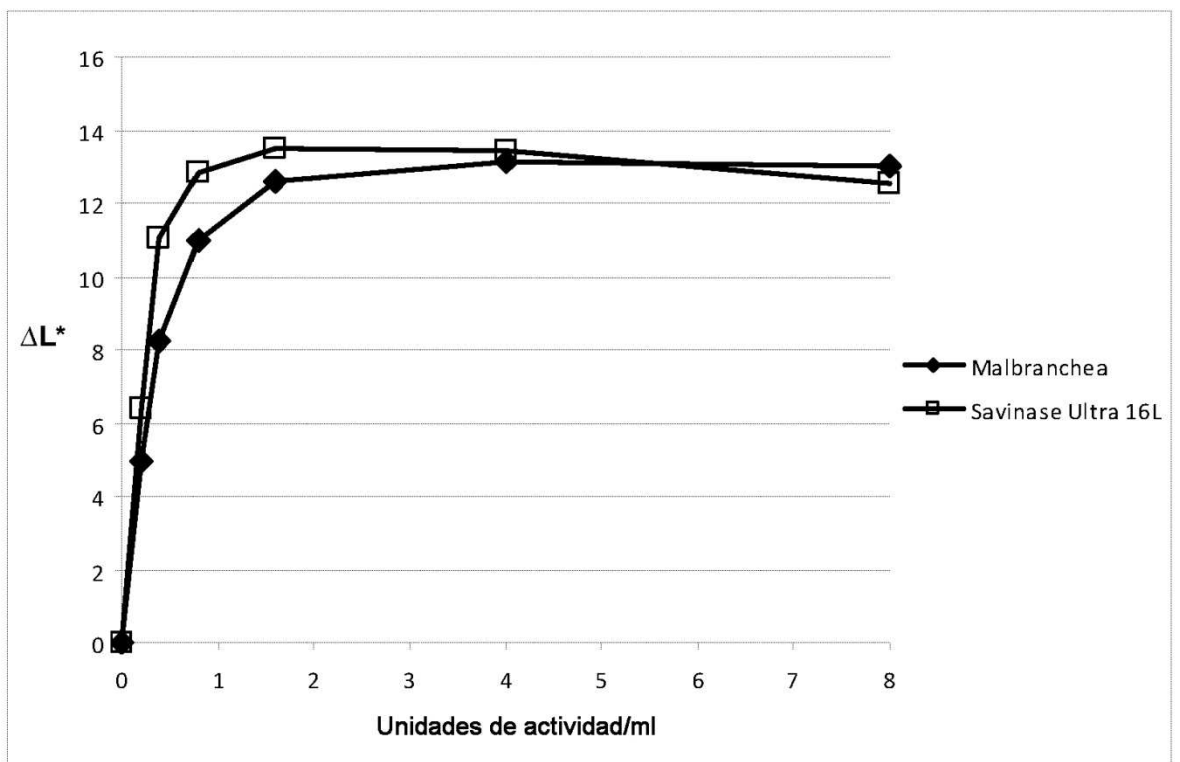


Fig. 10B

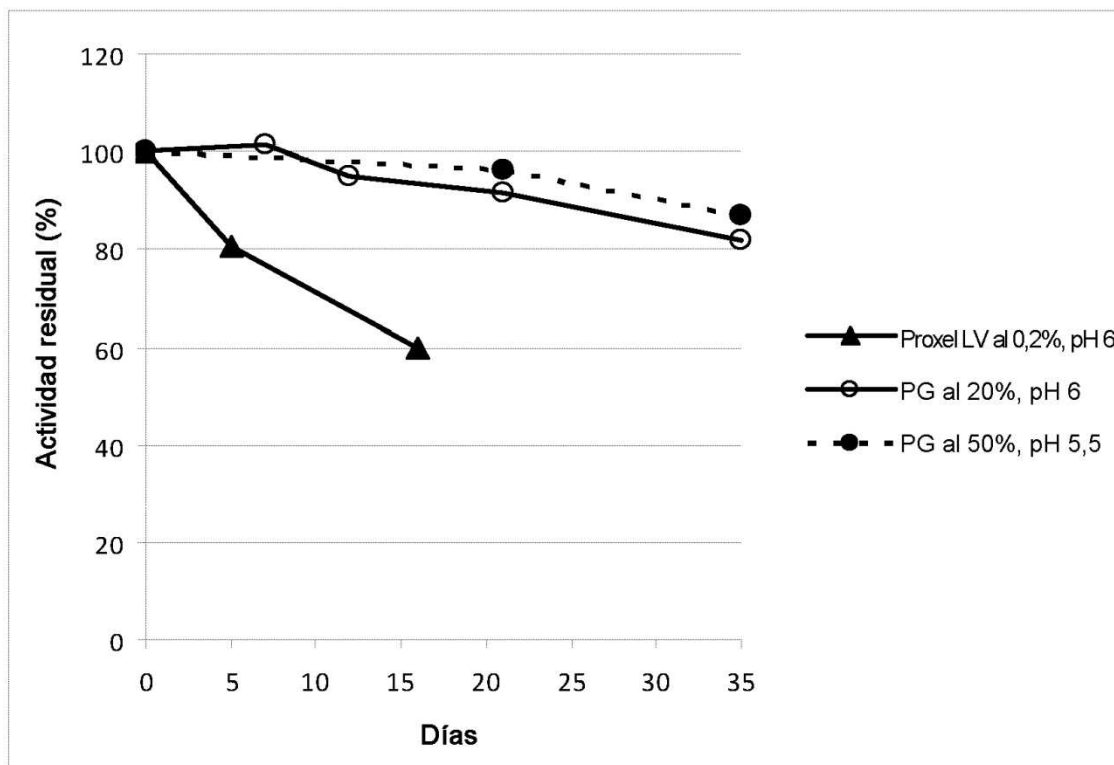


Fig. 11A

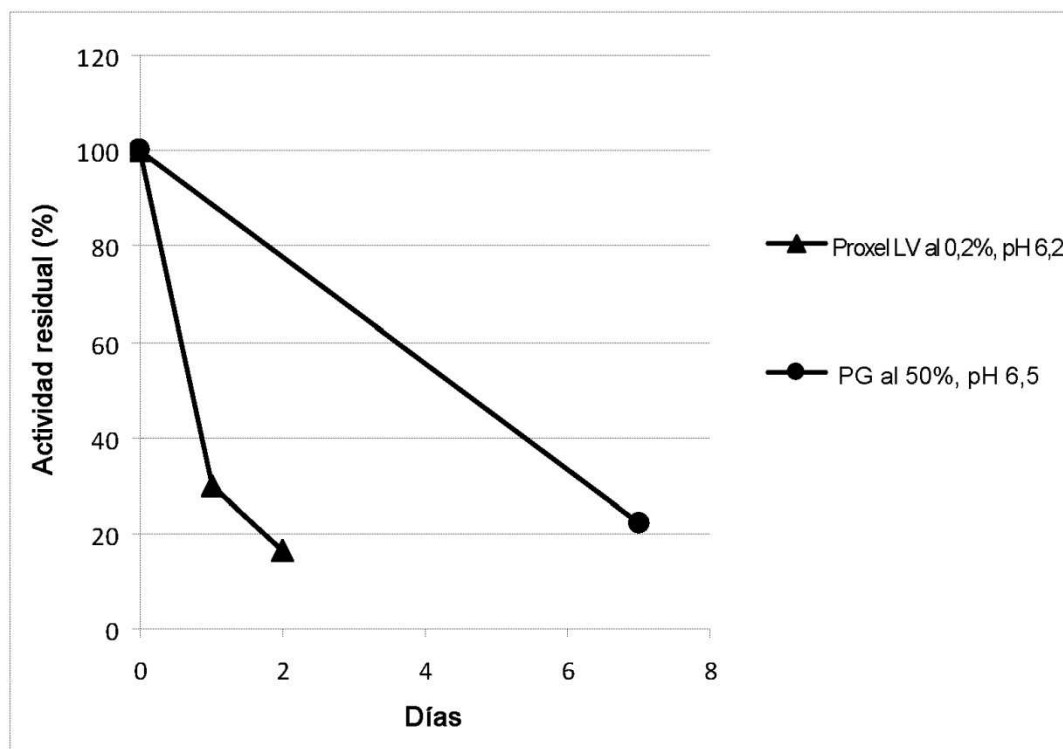


Fig. 11B

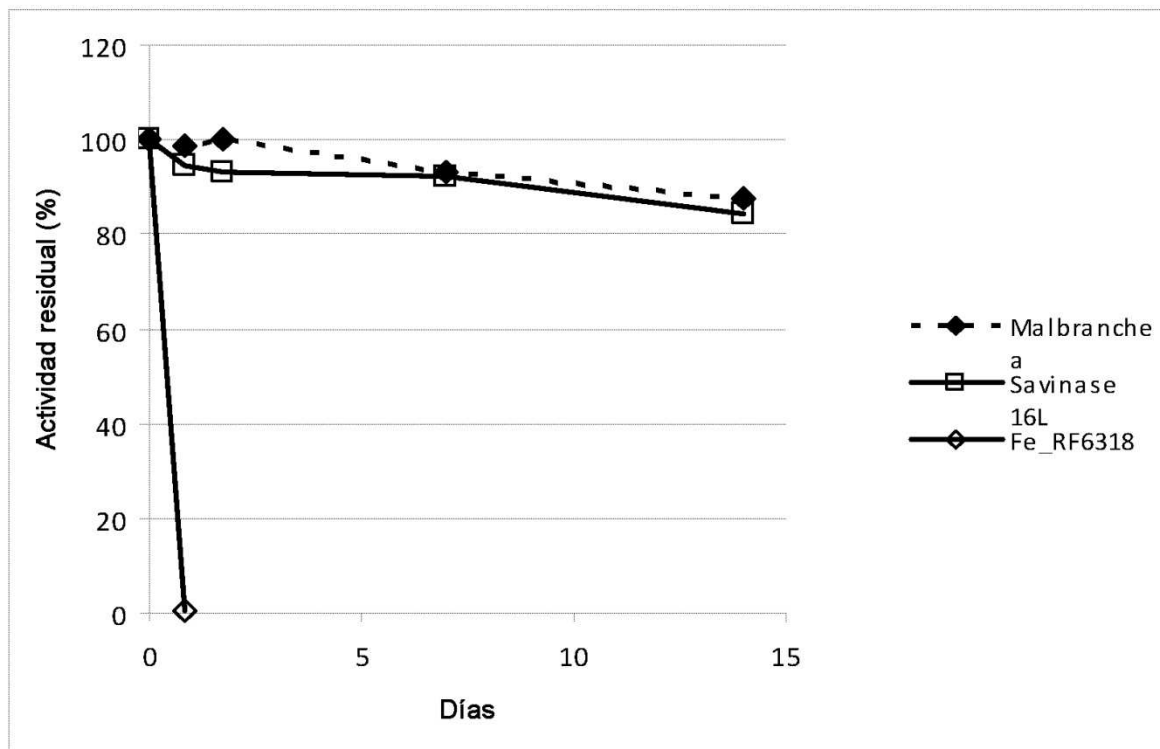


Fig. 12A

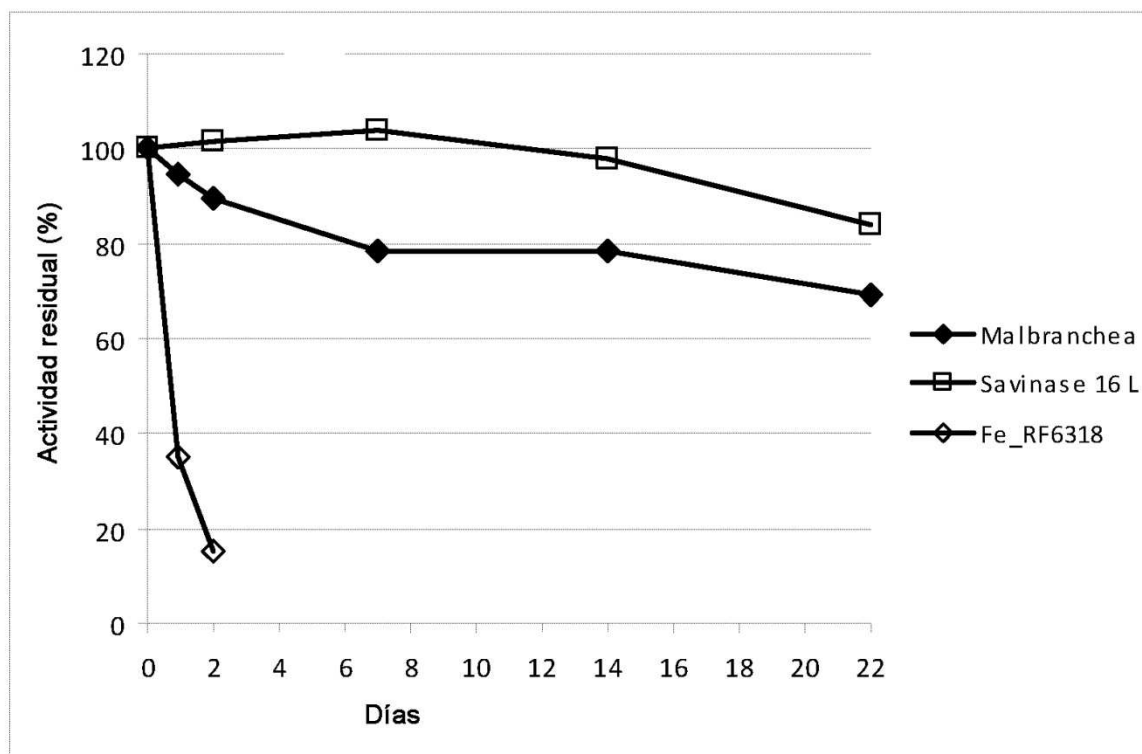


Fig. 12B