

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 616 057**

51 Int. Cl.:

A23L 29/00 (2006.01)

A23K 20/189 (2006.01)

C12N 9/20 (2006.01)

C12N 15/80 (2006.01)

C12R 1/885 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.04.2010 PCT/IB2010/051802**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.10.2010 WO2010122531**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.04.2010 E 10723329 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.11.2016 EP 2421963**

54 Título: **Método de producción de una enzima lipolítica**

30 Prioridad:

24.04.2009 US 172272 P

20.05.2009 GB 0908770

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

09.06.2017

73 Titular/es:

DUPONT NUTRITION BIOSCIENCES APS

(100.0%)

Langebrogade 1

1411 Copenhagen K, DK

72 Inventor/es:

MADRID, SUSAN M;

LIN, CHERRY;

ZARGAHI, MASOUD RAJABI;

LORENTSEN, RIKKE HØEGH;

ISAKSEN, MAI FAURSCHOU y

WARD, MICHAEL

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 616 057 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).

DESCRIPCION

Método de producción de una enzima lipolítica

5 La presente invención se refiere a un método para la producción de una enzima lipolítica en *Trichoderma reesei* y a la enzima lipolítica obtenible del mismo. Además, la presente invención se refiere al uso de *Trichoderma* para expresar una enzima lipolítica.

Antecedentes de la presente invención

10 Las lipasas (EC 3.1.1.3), que pueden definirse como carboxilesterasas que catalizan la hidrólisis de acilglicérols, son enzimas fisiológicamente muy importantes como una de las tres enzimas digestivas principales junto con amilasas y proteasas. Hidrolizan lípidos hasta glicerol y ácidos grasos, pero pueden funcionar también en reacciones de esterificación o transesterificación.

Las lipasas tienen aplicaciones en varios procesos industriales tales como el procesamiento de aceites y grasas, la fabricación de detergente, el procesamiento de papel y las industrias de elaboración de queso y panadera.

15 El documento WO 98/45453 divulga una enzima lipolítica (y variantes de la misma) derivada del hongo filamentoso *Aspergillus tubingensis*. Se hace referencia a veces a esta enzima como "lipasa 3". El documento WO 98/45453 caracteriza varias de las características fisicoquímicas de la lipasa 3. Se han descrito también usos de esta enzima lipolítica para mejorar las propiedades del pan, en particular para mejorar las propiedades del pan.

El documento WO 98/45453 describía también la clonación y expresión de lipasa 3 y sus variantes en *Aspergillus tubingensis*. Se encontró que esta enzima lipolítica podía sobreexpresarse en *Aspergillus tubingensis*, sin embargo, la enzima estaba sobreglicosilada en *A. tubingensis* lo que, en algunas situaciones, puede disminuir su actividad.

20 El documento WO2006/077258 enseña un método para la producción de un compuesto de interés en una célula fúngica filamentosa.

El documento US 4.797.361 enseña una cepa microbiana capaz de producir una enzima glicoproteína extracelular.

25 Existe la necesidad de un método para la producción de lipasa 3 y sus variantes y otras enzimas lipolíticas a escala comercial y usando hospedadoras de expresión que proporcionen altos niveles de expresión y rendimiento de proteína. Además, existe también la necesidad de superar el problema de la actividad enzimática disminuida debido a la sobreglicosilación de la enzima lipolítica como se observa, por ejemplo, cuando se sobreexpresa en *A. tubingensis*.

Aspectos del resumen de la presente invención

30 Se ha encontrado sorprendentemente que *Trichoderma reesei* es un hospedador de expresión altamente eficaz para enzimas lipolíticas, en particular lipasa 3 y sus variantes y otras enzimas lipolíticas.

Por consiguiente, en un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un método de producción de una enzima lipolítica que comprende las etapas de:

(i) proporcionar una célula de *Trichoderma reesei* transformada o transfectada que comprende

35 a) al menos una secuencia nucleotídica heteróloga que codifica una enzima lipolítica que comprende una secuencia aminoacídica mostrada como SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 o una secuencia aminoacídica que tiene al menos un 40% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1 o 2; y/o

40 b) al menos una secuencia nucleotídica heteróloga que codifica una enzima lipolítica, en la que la secuencia nucleotídica comprende la secuencia nucleotídica mostrada como SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4 o una secuencia nucleotídica que tiene al menos un 40% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4; y/o

c) al menos una secuencia nucleotídica heteróloga que codifica una enzima lipolítica, en la que la secuencia nucleotídica comprende una secuencia nucleotídica que hibrida con la SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4 o una secuencia nucleotídica que tiene al menos un 40% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4 o el complemento de cualquiera de las mismas en condiciones rigurosas; y

45 (ii) cultivar la célula en condiciones que permitan la expresión de dicha secuencia o secuencias nucleotídicas heterólogas que codifican dicha enzima lipolítica; y

(iii) elevar el pH al final de la fermentación hasta un pH superior al pH de las condiciones de cultivo de la etapa (ii).

Se enseña también en la presente memoria un método de producción de una enzima lipolítica que comprende las etapas de:

(i) transfectar o transformar una célula de *Trichoderma reesei* con

a) al menos una secuencia nucleotídica heteróloga que codifica una enzima lipolítica que comprende una secuencia aminoacídica mostrada como SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 o una secuencia aminoacídica que tiene al menos un 40% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1 o 2; y/o

5 b) al menos una secuencia nucleotídica heteróloga que codifica una enzima lipolítica, en la que la secuencia nucleotídica comprende la secuencia nucleotídica mostrada como SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4 o una secuencia nucleotídica que tiene al menos un 40% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4; y/o

10 c) al menos una secuencia nucleotídica heteróloga que codifica una enzima lipolítica, en la que la secuencia nucleotídica comprende una secuencia nucleotídica que hibrida con la SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4 o una secuencia nucleotídica que tiene al menos un 40% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4 o el complemento de una cualquiera de las mismas en condiciones rigurosas;

(ii) cultivar la célula en condiciones que permitan la expresión de dicha secuencia o secuencias nucleotídicas heterólogas que codifican dicha enzima lipolítica.

15 Se enseña también en la presente memoria un método de producción de una enzima lipolítica que comprende las etapas de:

(i) transfectar o transformar una célula de *Trichoderma reesei* con

20 a) al menos una secuencia nucleotídica heteróloga que codifica una enzima lipolítica que comprende una secuencia aminoacídica mostrada como SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 o una secuencia aminoacídica que tiene al menos un 40% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1 o 2; y/o

b) al menos una secuencia nucleotídica heteróloga que codifica una enzima lipolítica, en la que la secuencia nucleotídica comprende la secuencia nucleotídica mostrada como SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4 o una secuencia nucleotídica que tiene al menos un 40% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4; y/o

25 c) al menos una secuencia nucleotídica heteróloga que codifica una enzima lipolítica, en la que la secuencia nucleotídica comprende una secuencia nucleotídica que hibrida con la SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4 o una secuencia nucleotídica que tiene al menos un 40% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4 o el complemento de una cualquiera de las mismas en condiciones rigurosas;

30 (ii) repetir la etapa (i) en la célula para transfectar o transformar secuencialmente la célula con al menos una secuencia nucleotídica heteróloga adicional como se define en (i)(a), (i)(b) o (i)(c) (p.ej., tal como una secuencia nucleotídica heteróloga que codifica una enzima lipolítica que comprende una secuencia aminoacídica mostrada como SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 o una secuencia aminoacídica que tiene al menos un 40% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1 o 2); y

35 (iii) cultivar la célula en condiciones que permitan la expresión de dicha secuencia o secuencias nucleotídicas heterólogas que codifican dicha enzima lipolítica.

Se describe además en la presente memoria una enzima lipolítica obtenible mediante un método de la presente invención.

Se describe en la presente memoria un comestible para consumo humano que comprende dicha enzima lipolítica obtenible mediante un método de la presente invención.

40 Se enseña también en la presente memoria una célula de *Trichoderma reesei* transformada o transfectada que comprende:

a) al menos una secuencia nucleotídica heteróloga que codifica una proteína enzima lipolítica que tiene al menos un 40% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1 o 2; y/o

45 b) al menos una secuencia nucleotídica heteróloga que codifica una enzima lipolítica, en la que la secuencia nucleotídica que comprende la secuencia nucleotídica mostrada como la SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4 o una secuencia nucleotídica que tiene al menos un 40% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4; y/o

50 c) al menos una secuencia nucleotídica heteróloga que codifica una enzima lipolítica, en la que la secuencia nucleotídica que comprende una secuencia nucleotídica que hibrida con la SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4 o una secuencia nucleotídica que tiene al menos un 40% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4 o el complemento de una cualquiera de las mismas en condiciones rigurosas.

Se enseña también en la presente memoria un vector de expresión que comprende

i) al menos una secuencia nucleotídica, y dicha secuencia nucleotídica:

a) codifica una proteína enzima lipolítica que tiene al menos un 40% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1 o 2; y/o

5 b) codifica una enzima lipolítica y comprende la secuencia nucleotídica mostrada como SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4 o una secuencia nucleotídica que tiene al menos un 40% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4; y/o

10 c) codifica una enzima lipolítica, en la que la secuencia nucleotídica comprende una secuencia nucleotídica que hibrida con la SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4 o una secuencia nucleotídica que tiene al menos un 40% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4 o el complemento de una cualquiera de las mismas en condiciones rigurosas; y

ii) al menos un promotor de celobiohidrolasa, en la que dicha al menos una secuencia nucleotídica está bajo el control de dicho al menos un promotor de celobiohidrolasa.

Se describe en la presente memoria un uso de una célula de *Trichoderma reesei* en la expresión de

15 a) al menos una secuencia nucleotídica heteróloga que codifica un enzima lipolítica que comprende una secuencia aminoacídica mostrada como la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 o una secuencia aminoacídica que tiene al menos un 40% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1 o 2; y/o

20 b) al menos una secuencia nucleotídica heteróloga que codifica una enzima lipolítica, en la que la secuencia nucleotídica comprende la secuencia nucleotídica mostrada como SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4 o una secuencia nucleotídica que tiene al menos un 40% de identidad con la SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4; y/o

c) al menos una secuencia nucleotídica heteróloga que codifica una enzima lipolítica, en la que la secuencia nucleotídica comprende una secuencia nucleotídica que hibrida con la SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4 o una secuencia nucleotídica que tiene al menos un 40% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4 o el complemento de una cualquiera de las mismas en condiciones rigurosas;

25 para mejorar uno o más de los siguientes: expresión de la enzima lipolítica, glicosilación de la enzima lipolítica, actividad o rendimiento enzimático.

Sorprendentemente, se ha encontrado que *Trichoderma reesei* es capaz de producir las enzimas lipolíticas con rendimientos significativamente altos.

30 Además, se ha encontrado que las enzimas lipolíticas producidas mediante la metodología de la presente invención están sorprendentemente no sobreglicosiladas y por lo tanto tienen una buena actividad enzimática.

35 Bradner *et al.* (en Current Genetics, 44: 224-230, (2003)) usaba *Trichoderma reesei* como organismo hospedador de expresión en su búsqueda de enzimas lipolíticas anteriormente desconocidas. Se clonó una lipasa de un aislamiento antártico de *Penicillium allii* y se expresó en *Trichoderma reesei*. Bradner *et al.* concluyó que los métodos descritos serían útiles para explorar genes de lipasa potencialmente novedosos, pero no sugirió que pudiera usarse *T. reesei* para la sobreexpresión de proteínas.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método de producción de una enzima lipolítica que comprende las etapas de:

(i) proporcionar una célula de *Trichoderma reesei* transformada o transfectada que comprende al menos una secuencia nucleotídica heteróloga que codifica una enzima lipolítica;

40 (ii) cultivar la célula a pH 4 a pH 5,5 en condiciones que permitan la expresión de dicha secuencia o secuencias nucleotídicas heterólogas que codifican dicha enzima lipolítica;

(iii) aislar, purificar o concentrar la enzima en un medio a pH 5,5 a pH 6,5.

En este aspecto, preferiblemente la enzima lipolítica:

45 a) comprende una secuencia aminoacídica mostrada como SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 o comprende una secuencia aminoacídica que tiene al menos un 40% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1 o 2; y/o

b) está codificada por un nucleótido que comprende la secuencia mostrada como SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4 o comprende una secuencia nucleotídica que tiene al menos un 40% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4; y/o

c) está codificada por una secuencia nucleotídica que comprende una secuencia nucleotídica que hibrida con la

SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4 o comprende una secuencia nucleotídica que tiene al menos un 40% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4 o el complemento de una cualquiera de las mismas en condiciones rigurosas.

Aspectos detallados de la presente invención

- 5 Preferiblemente, la secuencia nucleotídica heteróloga está conectada operativamente (directa o indirectamente) con una secuencia promotora de tal modo que la secuencia nucleotídica heteróloga esté bajo el control de la secuencia promotora.

10 La secuencia promotora puede ser cualquier promotor adecuado, tal como un promotor que está naturalmente asociado con la secuencia nucleotídica que codifica la enzima lipolítica y/o un promotor heterólogo, tal como una secuencia promotora de celobiohidrolasa 1 o promotor *Tef* o promotor de glucoamilasa. Otras secuencias promotoras de *Trichoderma* derivadas de los genes *stp* (nº de serie de Estados Unidos 12/193.614), *cbh2*, *egl1*, *egl2* y *gpd1* pueden estar ligadas con la secuencia nucleotídica de la enzima lipolítica.

Para algunas realizaciones, la secuencia nucleotídica que codifica la enzima lipolítica puede incluir uno o más intrones.

- 15 Para algunas realizaciones, la secuencia nucleotídica que codifica la enzima lipolítica es una secuencia genómica.

Para algunas realizaciones, la secuencia nucleotídica que codifica la enzima lipolítica es una secuencia de ADNc.

El método de la presente invención puede comprender la etapa adicional de aislar y/o purificar y/o recuperar la enzima lipolítica.

- 20 Para algunas realizaciones, el nivel de enzima lipolítica expresada es suficientemente alto para que pueda usarse el medio de caldo en que se ha secretado la enzima (preferiblemente después de la retirada de la célula o células) o en forma concentrada (preferiblemente después de la retirada de la célula o células).

Por lo tanto, en un aspecto preferido, el método de la presente invención incluye la siguiente o siguientes etapas adicionales de aislamiento y/o purificación y/o recuperación de la enzima lipolítica.

- 25 En un aspecto más preferido, el método de la presente invención incluye la siguiente o siguientes etapas adicionales de retirada de la célula o células del medio (p.ej. caldo) en que se ha secretado la enzima.

En un aspecto más preferido, el método de la presente invención incluye la siguiente o siguientes etapas adicionales de retirada de la célula o células del medio (p.ej. caldo) en que se ha secretado la enzima y concentrar entonces el medio.

- 30 La célula o células pueden retirarse del medio mediante técnicas de separación adecuadas, p.ej. técnicas de filtración y/o técnicas de centrifugación adecuadas. Es un ejemplo particular el uso de ultrafiltración para preparar UFC (concentrados de ultrafiltración).

En una realización, el pH del medio para cultivar es de aproximadamente pH 4 a aproximadamente 5,5, preferiblemente aproximadamente pH 4.

En una realización, el pH del medio para cultivar es de aproximadamente pH 4.

- 35 En una realización preferida, antes del aislamiento y/o purificación y/o concentración de la enzima, se eleva el pH del medio al final del curso de fermentación cuando se alcanzan suficientes niveles de la enzima soluble secretada.

En una realización, el pH del medio para aislar y/o purificar y/o concentrar la enzima está por encima de pH 5,5 hasta aproximadamente pH 6,5.

- 40 Por tanto, en una realización, el pH del medio para cultivar es de aproximadamente pH 4 y se eleva entonces el pH del medio de tal modo que el pH del medio para aislar y/o purificar y/o concentrar la enzima esté por encima de aproximadamente pH 5,5 hasta aproximadamente pH 6,5.

Por tanto, en una realización, el pH del medio para cultivar es de aproximadamente pH 4 y se eleva entonces el pH del medio de tal modo que el pH del medio para aislar y/o purificar y/o concentrar la enzima esté por encima de aproximadamente pH 6 hasta aproximadamente pH 6,5.

- 45 En una realización preferida, el pH del medio para cultivar es de aproximadamente pH 4,5 y se eleva entonces el pH del medio de tal modo que el pH del medio para aislar y/o purificar y/o concentrar la enzima sea de aproximadamente pH 6.

- 50 Preferiblemente, se proporciona una célula de *Trichoderma reesei* con transformación con, o se transforma con, la secuencia nucleotídica usando electroporación, tal como mediante la metodología de electroporación divulgada en el documento WO 2008/153712 A2.

En otra realización, la célula de *Trichoderma reesei* puede proporcionarse con transformación con, o puede transformarse con, la secuencia nucleotídica usando transformación biolística.

Adecuadamente, puede haber al menos una secuencia nucleotídica heteróloga que codifica la enzima lipolítica en la célula de *Trichoderma reesei*. En algunas realizaciones, puede haber dos o más copias (concretamente, múltiples copias) de la o de cada secuencia nucleotídica heteróloga que codifica la enzima lipolítica según la presente invención en la célula de *Trichoderma reesei*. Por ejemplo, en una realización, puede haber al menos dos secuencias nucleotídicas que codifican que enzima lipolítica en *Trichoderma reesei*. En otras realizaciones, puede haber al menos tres, tal como al menos cuatro, tal como al menos cinco o tal como al menos seis secuencias nucleotídicas heterólogas que codifican dicha enzima lipolítica. Adecuadamente, puede haber hasta aproximadamente seis, preferiblemente hasta aproximadamente siete, preferiblemente hasta aproximadamente ocho, preferiblemente hasta aproximadamente diez secuencias nucleotídicas heterólogas que codifican la enzima lipolítica en la célula de *Trichoderma reesei*. En algunas realizaciones, cada secuencia nucleotídica heteróloga está asociada con y bajo el control de un promotor. Adecuadamente, cada secuencia nucleotídica heteróloga puede tener un promotor separado asociado con ella y estar bajo el control de ese promotor. Los promotores pueden ser iguales o diferentes.

Por tanto, en una realización, la célula de *Trichoderma reesei* puede comprender o estar transfectada o transformada con al menos 2 secuencias nucleotídicas heterólogas que codifican la enzima lipolítica. En otra realización, la célula de *Trichoderma reesei* puede comprender o estar transfectada o transformada con al menos 3, o al menos 4, o al menos 5 o al menos 6 secuencias nucleotídicas heterólogas que codifican la enzima lipolítica. En una realización, hay hasta aproximadamente 6 secuencias nucleotídicas heterólogas que codifican la enzima lipolítica de acuerdo con la presente invención. En algunas realizaciones, puede haber hasta aproximadamente 10 secuencias nucleotídicas heterólogas que codifican la enzima lipolítica de acuerdo con la presente invención. En algunas realizaciones, cada secuencia nucleotídica heteróloga está asociada con y bajo el control de un promotor. Adecuadamente, cada secuencia nucleotídica heteróloga puede tener un promotor separado asociado con ella y estar bajo el control de ese promotor.

Adecuadamente, la (o cada) secuencia nucleotídica heteróloga puede comprender una secuencia nucleotídica que codifica un péptido señal, estando dicha secuencia nucleotídica que codifica dicho péptido señal ligada operativamente con dicha secuencia nucleotídica que codifica dicha enzima lipolítica. Si hay múltiples secuencias nucleotídicas heterólogas y en las que más de una tiene una secuencia señal asociada con las mismas, entonces las secuencias señal pueden ser iguales o diferentes.

Adecuadamente, la enzima lipolítica puede comprender un péptido señal endógeno o exógeno. Cuando el péptido señal es endógeno, significa que el péptido señal es el que está ligado naturalmente con la enzima lipolítica cuando se produce naturalmente. Por ejemplo, el péptido señal puede ser el péptido señal de *Aspergillus tubingensis* que está ligado naturalmente con la enzima lipolítica cuando se encuentra en *Aspergillus tubingensis*.

El término "heterólogo" como se usa en la presente memoria significa que no aparece naturalmente en la célula de *Trichoderma reesei*. En otras palabras, es exógeno a la célula de *Trichoderma reesei*. Por ejemplo, el término "secuencia nucleotídica heteróloga" como se usa en la presente memoria significa que la secuencia nucleotídica no aparece naturalmente en la célula de *Trichoderma reesei*. En otras palabras, la secuencia nucleotídica es exógena de la célula de *Trichoderma reesei*. El término incluye también múltiples copias de la secuencia de origen natural, ya que dichas copias múltiples adicionales serían heterólogas.

En una realización, preferiblemente la secuencia nucleotídica heteróloga se obtiene o es obtenible de un microorganismo, particularmente un hongo.

En una realización, preferiblemente la secuencia nucleotídica heteróloga se obtiene o es obtenible de *Aspergillus*, particularmente *Aspergillus tubingensis*.

Se enseña en la presente memoria un método de producción de una enzima lipolítica que comprende las etapas de:

(i) proporcionar una célula de *Trichoderma reesei* que comprende

- a) al menos una secuencia nucleotídica heteróloga que codifica una enzima lipolítica que comprende una secuencia aminoacídica mostrada como SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 o una secuencia aminoacídica que tiene al menos un 40% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1 o 2; y/o
- b) al menos una secuencia nucleotídica heteróloga que codifica una enzima lipolítica, en la que la secuencia nucleotídica comprende la secuencia nucleotídica mostrada como SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4 o una secuencia nucleotídica que tiene al menos un 40% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4; y/o
- c) al menos una secuencia nucleotídica heteróloga que codifica una enzima lipolítica, en la que la secuencia nucleotídica comprende una secuencia nucleotídica que hibrida con la SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4 o una secuencia nucleotídica que tiene al menos un 40% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 3 o SEQ ID

NO: 4 o el complemento de una cualquiera de las mismas en condiciones rigurosas; y

(ii) cultivar la célula en condiciones que permitan la expresión de dicha secuencia o secuencias nucleotídicas heterólogas que codifican dicha enzima lipolítica; y

5 en el que dicha célula de *Trichoderma reesei* tiene suprimidos al menos dos genes que codifican enzimas no lipolíticas.

Se enseña también en la presente memoria un método de producción de una enzima lipolítica que comprende las etapas de:

(i) transfectar o transformar una célula de *Trichoderma reesei* con

10 a) al menos una secuencia nucleotídica heteróloga que codifica una enzima lipolítica que comprende una secuencia aminoacídica mostrada como SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 o una secuencia aminoacídica que tiene al menos un 40% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1 o 2; y/o

15 b) al menos una secuencia nucleotídica heteróloga que codifica una enzima lipolítica, en la que la secuencia nucleotídica comprende la secuencia nucleotídica mostrada como SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4 o una secuencia nucleotídica que tiene al menos un 40% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4; y/o

c) al menos una secuencia nucleotídica heteróloga que codifica una enzima lipolítica, en la que la secuencia nucleotídica comprende una secuencia nucleotídica que hibrida con la SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4 o una secuencia nucleotídica que tiene al menos un 40% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4 o el complemento de una cualquiera de las mismas en condiciones rigurosas;

20 (ii) cultivar la célula en condiciones que permitan la expresión de dicha secuencia o secuencias nucleotídicas heterólogas que codifican dicha enzima lipolítica; y

en el que dicha célula de *Trichoderma reesei* tiene suprimidos al menos dos genes que codifican enzimas no lipolíticas.

25 Se enseña también en la presente memoria un método de producción de una enzima lipolítica que comprende las etapas de:

(i) transfectar o transformar una célula de *Trichoderma reesei* con

a) al menos una secuencia nucleotídica heteróloga que codifica una enzima lipolítica que comprende una secuencia aminoacídica mostrada como SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 o una secuencia aminoacídica que tiene al menos un 30% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1 o 2; y/o

30 b) al menos una secuencia nucleotídica heteróloga que codifica una enzima lipolítica, en la que la secuencia nucleotídica comprende la secuencia nucleotídica mostrada como SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4 o una secuencia nucleotídica que tiene al menos un 40% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4; y/o

35 c) al menos una secuencia nucleotídica heteróloga que codifica una enzima lipolítica, en la que la secuencia nucleotídica comprende una secuencia nucleotídica que hibrida con la SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4 o una secuencia nucleotídica que tiene al menos un 40% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4 o el complemento de una cualquiera de las mismas en condiciones rigurosas;

40 (ii) repetir la etapa (i) en la célula para transfectar o transformar secuencialmente la célula con al menos una secuencia nucleotídica heteróloga adicional como se define en (i)(a), (i)(b) o (i)(c) (p.ej., tal como una secuencia nucleotídica heteróloga que codifica una enzima lipolítica que comprende una secuencia aminoacídica mostrada como SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 o una secuencia aminoacídica que tiene al menos un 40% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1 o 2); y

(iii) cultivar la célula en condiciones que permitan la expresión de dicha secuencia o secuencias nucleotídicas heterólogas que codifican dicha enzima lipolítica; y

45 en el que dicha célula de *Trichoderma reesei* tiene suprimidos al menos dos genes que codifican enzimas no lipolíticas.

Se enseña en la presente memoria una enzima lipolítica obtenible mediante los métodos de la presente invención.

Se enseña también en la presente memoria un comestible para consumo humano que comprende dicha enzima lipolítica obtenible mediante un método de la presente invención.

50 Se enseña también en la presente memoria una célula de *Trichoderma reesei* transformada o transfectada que

comprende:

a) al menos una secuencia nucleotídica heteróloga que codifica una proteína enzima lipolítica que tiene al menos un 40% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1 o 2; y/o

5 b) al menos una secuencia nucleotídica heteróloga que codifica una enzima lipolítica, en la que la secuencia nucleotídica comprende la secuencia nucleotídica mostrada como SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4 o una secuencia nucleotídica que tiene al menos un 40% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4; y/o

10 c) al menos una secuencia nucleotídica heteróloga que codifica una enzima lipolítica, en la que la secuencia nucleotídica comprende una secuencia nucleotídica que hibrida con la SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4 o una secuencia nucleotídica que tiene al menos un 40% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4 o el complemento de una cualquiera de las mismas bajo condiciones rigurosas; y

en la que dicha célula de *Trichoderma reesei* tiene suprimidos al menos dos genes que codifican enzimas no lipolíticas.

Preferiblemente, se suprimen al menos tres genes que codifican enzimas no lipolíticas.

Preferiblemente, se suprimen al menos cuatro genes que codifican enzimas no lipolíticas.

15 “Suprimido” significa que la célula no expresa la enzima no lipolítica relevante al mismo nivel que la célula no transformada/transfectada. En algunas realizaciones, “suprimido” significa que la célula no expresa la enzima no lipolítica relevante. La supresión puede causarse por técnicas conocidas en la materia, tales como por deleciones.

Preferiblemente, al menos uno de los genes que codifica una enzima no lipolítica que está suprimido es un gen de celulasa.

20 Preferiblemente, al menos dos de los genes que codifican una enzima no lipolítica que están suprimidos son genes de celulasa.

Es un ejemplo de al menos uno de los genes que codifican una enzima no lipolítica que está suprimido un gen que codifica una celobiohidrolasa (p.ej. CBHI o CBHII).

25 Es otro ejemplo de al menos uno de los genes que codifican un enzima no lipolítica que está suprimido un gen que codifica una endoglucanasa (p.ej. EGI y EGII).

30 En algunas realizaciones, la célula de *Trichoderma reesei* es una célula en que se eliminan o desestabilizan los genes endógenos que codifican una o ambas celobiohidrolasas (CBHI y CBHII) y/o una o ambas endoglucanasas (EGI y EGII). Adecuadamente, la célula de *Trichoderma reesei* puede ser una célula de un MnMG o derivada de la misma, por ejemplo un derivado de la cepa RL-P37. Adecuadamente, la célula de *Trichoderma* puede ser un derivado de la cepa RL-P37 que se produce usando el método expuesto en el Ejemplo 10.

35 En algunas realizaciones, la secuencia nucleotídica heteróloga puede codificar una enzima lipolítica que comprende una secuencia aminoacídica que tiene al menos un 30%, al menos un 35%, al menos un 40%, al menos un 45%, al menos un 50%, al menos un 55%, al menos un 60%, al menos un 65% al menos un 70%, al menos un 75%, al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 95% o al menos un 98% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO. 1 o SEQ ID NO. 2 o una secuencia que comprende una o varias adiciones, deleciones o sustituciones aminoacídicas en comparación con la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO. 2.

40 En algunas realizaciones, la secuencia nucleotídica heteróloga puede codificar una enzima lipolítica y comprende una secuencia nucleotídica que tiene al menos un 30%, al menos un 35%, al menos un 40%, al menos un 45%, al menos un 50%, al menos un 55%, al menos un 60%, al menos un 65% al menos un 70%, al menos un 75%, al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 95% o al menos un 98% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO. 4 o una secuencia que comprende una o varias adiciones, deleciones o sustituciones nucleotídicas en comparación con la SEQ ID NO. 3 o SEQ ID NO. 4.

45 Preferiblemente, la secuencia nucleotídica heteróloga codifica una enzima lipolítica que comprende una secuencia aminoacídica que tiene al menos un 40%, al menos un 45%, al menos un 50%, al menos un 55%, al menos un 60%, al menos un 65% al menos un 70%, al menos un 75%, al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 95% o al menos un 98% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO. 1 o SEQ ID NO. 2 o una secuencia que comprende una o varias adiciones, deleciones o sustituciones aminoacídicas en comparación con la SEQ ID NO. 1 o SEQ ID NO. 2.

50 Preferiblemente, la secuencia nucleotídica heteróloga codifica una enzima lipolítica y comprende una secuencia nucleotídica que tiene al menos un 40%, al menos un 45%, al menos un 50%, al menos un 55%, al menos un 60%, al menos un 65%, al menos un 70%, al menos un 75%, al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 95% o al menos un 98% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO. 4 o una secuencia que comprende una o varias adiciones, deleciones o sustituciones en comparación con la SEQ ID NO: 3 o SEQ ID

NO. 4.

Se muestra en la Tabla 1 siguiente la identidad de secuencia aminoacídica de una serie de enzimas lipolíticas con la lipasa de *Aspergillus tubingensis* que tiene la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 3 (también llamada en la presente memoria lipasa 3).

5 Tabla 1 – Enzimas lipolíticas con identidad de secuencia con la enzima lipolítica de *Aspergillus tubingensis* (lipasa 3).

Lipasas de diferentes hongos	Nº de acceso	% de identidad de secuencia aminoacídica
<i>A. niger</i> CBS 513.88	XP_001397501.1	93
<i>Aspergillus niger</i>	ABG73613.1	93
<i>Aspergillus niger</i>	ABG37906.1	93
<i>Aspergillus nidulans</i> FGSCA4	XP_681315.1	61
<i>Aspergillus clavatus</i> NRRL 1	XP_001276337.1	57
<i>Neosartorya fischeri</i> NRRL 181	XP_001266329.1	60
<i>Aspergillus fumigatus</i> Af293	XP_748138.1	59
<i>Aspergillus oryzae</i> RIB40	XP_001818694.1	56
<i>Aspergillus terreus</i> NIH2624	XP_001218444.1	54
<i>Penicillium chrysogenum</i> Wisconsin 54-1255	CAP96359.1	55
<i>Aspergillus niger</i>	ABG73614.1	54
<i>Aspergillus niger</i>	XP_001393532.1	53
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	059952.1	50
<i>Penicillium marneffei</i> ATCC 18224	XP_002147144.1	49
<i>Aspergillus oryzae</i> R	XP_001824529.1	44
<i>Phaeosphaeria nodorum</i> SN15	XP_001796872.1	45
<i>Penicillium cyclopium</i>	P61869.1	42
<i>Penicillium camemberti</i> .	ITIA_A	42

10 La célula hospedadora de *Trichoderma reesei* usada en la presente invención puede ser cualquier célula de *Trichoderma reesei*. La célula puede considerarse que es una célula de *Trichoderma reesei* de tipo silvestre. La célula de *Trichoderma reesei* puede ser una de la que se han eliminado o desestabilizado los genes que codifican una o más celobiohidrolasas secretadas (CBHI o CBHII), de modo que no se expresan. Adecuadamente, la célula de *Trichoderma reesei* puede ser una célula genéticamente no modificada o derivado de la misma, por ejemplo, un derivado de la cepa RL-P37. Adecuadamente, la célula de *Trichoderma reesei* puede ser un derivado de la cepa RL-P37 que se produce usando el método expuesto en el Ejemplo 10.

15 La presente invención puede llevarse a cabo en un fermentador que puede comprender de aproximadamente 3 litros a aproximadamente 20 litros de medio de cultivo. Puede llevarse a cabo como una fermentación a escala de 10-16 litros, preferiblemente a escala de 14 litros.

Preferiblemente, se lleva a cabo la fermentación con más de aproximadamente 12 litros, preferiblemente más de aproximadamente 14 litros.

La célula hospedadora de *Trichoderma reesei* es preferiblemente adecuada para uso en fermentación a gran escala.

20 La presente invención puede llevarse a cabo a escala comercial. A este respecto, la fermentación puede llevarse a cabo a una escala de más de aproximadamente 50.000 litros, preferiblemente a una escala de más de aproximadamente 80.000 litros, preferiblemente a una escala de fermentación de más de aproximadamente 200.000 litros.

En una realización, la proteína total producida por el método está muy por encima de aproximadamente 20 g/litro.

25 De la proteína total producida, la mayoría es la enzima lipolítica deseada. En una realización, la proteína secretada total producida por el método comprende al menos un 50% de la enzima lipolítica deseada. En una realización, la

proteína secretada total producida por el método comprende al menos un 60% de la enzima lipolítica deseada. En una realización, la proteína secretada total producida por el método comprende al menos un 70% de la enzima lipolítica deseada. En una realización, la proteína secretada total producida por el método comprende al menos un 80% de la enzima lipolítica deseada.

- 5 Adecuadamente, el método puede comprender la selección de transformantes en que se ha verificado la producción de enzima lipolítica (se seleccionan preferiblemente los altos productores de la enzima deseada).

En una realización, el método puede comprender adecuadamente una primera etapa de transformación en la que se transforma una célula de *Trichoderma reesei* con al menos una secuencia nucleotídica heteróloga que codifica la enzima lipolítica definida en la presente memoria, la selección de los transformantes en que se ha verificado la producción de la enzima lipolítica (se seleccionan preferiblemente los altos productores de la enzima lipolítica) y una segunda etapa de transformación (concretamente, etapa de retransformación) de un transformante seleccionado con al menos una secuencia nucleotídica heteróloga que codifica la enzima lipolítica definida en la presente memoria, seguidas de una selección adicional de los nuevos transformantes en que se ha verificado la producción de la enzima lipolítica (se seleccionan preferiblemente los altos productores de la enzima deseada).

- 10
- 15 En algunas realizaciones, la enzima lipolítica producida puede estar glicosilada. En algunas realizaciones, la enzima lipolítica puede estar N-glicosilada en N32 (cuando se numera usando la SEQ ID NO: 2) o en una posición equivalente para otras enzimas lipolíticas según la invención. Este aspecto puede conferir ventajas significativas porque la actividad de la enzima no se desestabiliza ni reduce por la glicosilación de la enzima. Sin desear ligarse a teoría alguna, puede observarse la reducción de la actividad de la enzima lipolítica cuando se produce en otros hospedadores tales como *A. tubingensis*, y se cree que es debida a una sobreglicosilación de la enzima en al menos el sitio N242.

La enzima lipolítica producida por la presente invención es por lo tanto distinguible de la enzima lipolítica producida en otros hospedadores, p.ej. *A. tubingensis*, a causa del grado de glicosilación de la enzima, particularmente en el sitio N32. En algunas realizaciones, la enzima tiene glicosilación, al menos, en el sitio N32.

- 25 Adecuadamente, la enzima lipolítica puede producirse con un péptido señal. En otras palabras, la secuencia nucleotídica heteróloga usada en la presente invención puede comprender una porción de la misma que codifica un péptido señal.

El péptido señal puede usarse para dirigir la secreción de la enzima lipolítica a través de una membrana celular particular. Las secuencias de péptido señal pueden ser endógenas o exógenas de la secuencia de codificación de la enzima lipolítica. Por ejemplo, el péptido señal puede ser el péptido señal que es endógeno de la enzima lipolítica de *Aspergillus tubingensis*. Como alternativa, la secuencia de codificación del péptido señal puede obtenerse (o ser obtenible) a partir de un gen de celobiohidrolasa de *Trichoderma reesei*.

- 30 Sin embargo, puede usarse cualquier secuencia de codificación de péptido señal capaz de dirigir la enzima lipolítica expresada a la ruta secretora de una célula de *Trichoderma reesei* de elección.

- 35 Cuando se hace referencia a mejorar uno o más de los siguientes: expresión de la enzima lipolítica, glicosilación de la enzima lipolítica, actividad y/o rendimiento enzimático, estos se comparan con los métodos convencionales de expresión de esta enzima lipolítica. Por ejemplo, en la presente invención se proporciona una expresión de la enzima lipolítica, glicosilación de la enzima lipolítica, actividad y/o rendimiento enzimático mejorados en comparación con la producción de la enzima lipolítica en otro organismo hospedador (concretamente un organismo hospedador distinto de *T. reesei*). En particular, hay una expresión de la enzima lipolítica, glicosilación de la enzima lipolítica, actividad y/o rendimiento enzimático mejorados de la enzima lipolítica por la presente invención (concretamente, producida en la célula de *Trichoderma reesei*) en comparación con la expresión de la misma enzima lipolítica en una célula de *Aspergillus tubingensis* (por ejemplo, como se enseña en el documento WO98/45453).

- 45 El término "glicosilación mejorada" como se usa en la presente memoria significa que, preferiblemente, aparece glicosilación en N32 (cuando se numera usando la SEQ ID NO: 2). Sin desear ligarse a teoría alguna, en algunas situaciones, la enzima lipolítica producida en células hospedadoras distintas de *T. reesei* (y particularmente en *Aspergillus tubingensis* (p.ej. como se enseña en el documento WO98/45453)) puede estar glicosilada (o sobreglicosilada), particularmente en N242. Por lo tanto, la enzima lipolítica producida en células hospedadoras distintas de *T. reesei*, y particularmente en *Aspergillus tubingensis* (p.ej. como se enseña en el documento WO98/45453), puede estar glicosilada en ambos sitios N32 y N242. Sin embargo, y sin desear ligarse a teoría alguna, el sitio N242 está en la cercanía de uno de los residuos de sitio activo, a saber His258 de la SEQ ID NO: 2. Por tanto, se cree que la glicosilación (o sobreglicosilación) en el sitio N242 puede conducir a una actividad reducida (concretamente la actividad lipasa) de la enzima. La enzima lipolítica de la presente invención no tiene actividad reducida. La glicosilación de la enzima lipolítica de la presente invención puede aparecer en el sitio N32, que está alejado de los residuos de sitio activo tales como His258.

- 55 El término "actividad enzimática mejorada" como se usa en la presente memoria significa que la actividad es la misma o mayor que la actividad lipasa de la enzima lipolítica producida naturalmente por *Aspergillus tubingensis*.

Se entiende por actividad enzimática al menos actividad lipasa. La actividad enzimática (p.ej. actividad lipasa) puede medirse usando los protocolos relevantes expuestos a continuación en la sección de Ejemplos.

5 Se ha encontrado sorprendentemente que la enzima lipolítica producida de acuerdo con la presente invención es fácil de aislar del medio en que se ha excretado, concretamente el caldo de cultivo (fermentación), ya que se obtienen altos niveles de expresión. La Figura 2 muestra un esquema para el método de la presente invención.

10 Por tanto, según un aspecto preferido de la presente invención, el método de la presente invención puede implicar una o más de las siguientes etapas para el medio en que se ha secretado la enzima de la presente invención después del cultivo de la célula: diluir el medio (preferiblemente con agua), separar la célula o células del medio, concentrar el medio (preferiblemente en el que dicho medio está exento de células); granular dicho medio (preferiblemente en el que dicho medio está exento de células).

15 En un aspecto preferido de la presente invención, el método de la presente invención implica las siguientes etapas para el medio en que se ha secretado la enzima de la presente invención después del cultivo de la célula: diluir el medio (preferiblemente con agua), separar la célula o células del medio, concentrar el medio (preferiblemente en el que dicho medio está exento de células) y opcionalmente granular dicho medio (preferiblemente en el que dicho medio está exento de células).

20 En un aspecto preferido de la presente invención, el método de la presente invención implica las siguientes etapas para el medio en que se ha secretado la enzima de la presente invención después de cultivar la célula: diluir el medio (preferiblemente con agua), separar la célula o células del medio, concentrar el medio (preferiblemente en el que dicho medio está exento de células) y opcionalmente granular dicho medio (preferiblemente en el que dicho medio está exento de células).

En un aspecto preferido de la presente invención, el método de la presente invención implica las siguientes etapas para el medio en que se ha secretado la enzima de la presente invención después de cultivar la célula: diluir el medio con agua, separar la célula o células del medio, concentrar el medio, en el que dicho medio está exento de células y opcionalmente granular dicho medio, en el que dicho medio está exento de células.

25 En un aspecto preferido de la presente invención, el método de la presente invención implica las siguientes etapas para el medio en que se ha secretado la enzima de la presente invención después de cultivar la célula: diluir el medio con agua, separar la célula o células del medio, concentrar el medio, en el que dicho medio está exento de células, y granular dicho medio, en el que dicho medio está exento de células.

30 La enzima preparada por la presente invención puede usarse en un método para preparar un alimento o comestible pretendido para consumo humano, comprendiendo dicho método mezclar dicha enzima con un ingrediente de alimento o comestible adecuado. Preferiblemente, dicha enzima está en el medio en que se ha secretado la enzima de la presente invención después de cultivar la célula. Preferiblemente, dicho medio está exento de células (concretamente, la célula o células se han separado del medio). Preferiblemente, dicho medio está concentrado. En algunas realizaciones, preferiblemente el medio está granulado.

35 Preferiblemente, la lipasa precipita de la solución en el caldo de fermentación. Preferiblemente, el precipitado de lipasa se resolubiliza por ajuste de pH. El pH se ajusta a un pH por encima del pH del caldo de fermentación.

Ventajas

40 Además de las ventajas mencionadas anteriormente, es otra ventaja de la presente invención que posibilita la producción a escala comercial de la enzima lipolítica. El método de la presente invención permite producir la enzima lipolítica con alto rendimiento.

45 Es una ventaja de la presente invención que se ha encontrado sorprendentemente que es posible ir directamente desde la etapa de transformación y verificación (concretamente, digamos desde la placa de microvaloración) directamente a la fermentación a gran escala (p.ej., fermentación de al menos 14 litros). Esto es sorprendentemente posible debido a que la etapa de verificación (particularmente los resultados de la placa de microvaloración) es altamente predictiva de una buena actuación en la fermentación a gran escala. Esto contrasta con los métodos convencionales, en que a menudo es necesario cultivar la cepa en matraces antes de pasar a una fermentación a mayor escala. Esto tiene ventajas significativas en el acortamiento del tiempo de producción y/o la simplificación del procedimiento global y/o la reducción de costes.

50 Es una ventaja adicional de la presente invención que proporciona una expresión potenciada/aumentada y/o un rendimiento mejorado de la enzima lipolítica en comparación con métodos convencionales de expresión de esta enzima lipolítica. Por ejemplo, en la presente invención se proporciona una expresión potenciada/aumentada y/o un rendimiento mejorado de la enzima lipolítica en comparación con la producción de la enzima lipolítica en otro organismo hospedador (concretamente un organismo hospedador distinto de *T. reesei*). En particular, hay una expresión aumentada y/o un rendimiento mejorado de la enzima lipolítica por la presente invención (concretamente producidos en la célula de *Trichoderma reesei*) en comparación con la expresión de la misma enzima lipolítica en una célula de *Aspergillus tubingensis* (por ejemplo como se enseña en el documento WO98/45453).

Es una ventaja adicional de la presente invención que la enzima lipolítica producida de acuerdo con la presente invención es fácil de producir y aislar y/o purificar y/o concentrar.

Es una ventaja adicional de la presente invención que la enzima lipolítica producida de acuerdo con la presente invención es fácil de resolubilizar.

- 5 Es una ventaja adicional de la presente invención que la enzima lipolítica producida de acuerdo con la presente invención puede usarse como gránulo o como solución.

Enzima lipolítica

El término "enzima lipolítica" como se usa en la presente memoria significa una enzima con actividad hidrolizante de triacilglicerol (clasificada como E.C. 3.1.1.3).

- 10 Adecuadamente, la enzima lipolítica de la presente invención puede exhibir una o más de las siguientes actividades adicionales: actividad glicolipasa (E.C. 3.1.1.26), actividad fosfolipasa A2 (E.C. 3.1.1.4), actividad fosfolipasa A1 (E.C. 3.1.1.32) o actividad fosfolipasa B (E.C. 3.1.1.5). El término "actividad glicolipasa" como se usa en la presente memoria engloba "actividad galactolipasa".

- 15 Adecuadamente, la enzima lipolítica según la presente invención puede tener al menos una o más de las siguientes actividades: actividad glicolipasa (E.C. 3.1.1.26) y/o actividad fosfolipasa A1 (E.C. 3.1.1.32) y/o actividad fosfolipasa A2 (E.C. 3.1.1.4) y/o actividad fosfolipasa B (E.C. 3.1.1.5)

Aislado

- 20 En un aspecto, preferiblemente la enzima lipolítica según la presente invención está en forma aislada. El término "aislado" significa que la enzima lipolítica está al menos sustancialmente exenta de al menos otro componente con el que la enzima lipolítica está naturalmente asociada en la naturaleza y como se encuentra en la naturaleza. El término "aislado" puede significar que la enzima lipolítica está al menos sustancialmente exenta de al menos otro componente en el medio de cultivo en que se produce. La enzima lipolítica de la presente invención puede proporcionarse en una forma que esté sustancialmente exenta de uno o más contaminantes con que la sustancia podría estar asociada de otro modo o con que la enzima puede producirse en el hospedador *T. reesei*. Por tanto, por ejemplo puede estar sustancialmente exenta de la célula o células o de uno o más polipéptidos y/o moléculas de ácido nucleico potencialmente contaminantes. La enzima lipolítica puede aislarse separando la célula o células del caldo durante o después de la fermentación de modo que la enzima lipolítica permanezca en el caldo. La enzima lipolítica puede aislarse sometiendo el caldo de fermentación a separación celular por filtración a vacío.

Purificado

- 30 En un aspecto, preferiblemente la enzima lipolítica según la presente invención está en forma purificada. El término "purificado" significa que el compuesto dado está presente a un alto nivel. El componente es deseablemente el componente predominante presente en una composición. Preferiblemente, está presente a un nivel de aproximadamente un 60%, o al menos aproximadamente un 65%, o al menos aproximadamente un 70%, o al menos aproximadamente un 75%, o al menos aproximadamente un 80%, estando determinado dicho nivel con una base de peso seco/peso seco con respecto a la composición total en consideración. Para algunas realizaciones, la cantidad es de al menos un 85% de dicho nivel, determinándose con una base de peso seco/peso seco con respecto a la composición total bajo consideración.

Concentrado

- 40 En un aspecto, se usa preferiblemente la enzima lipolítica según la presente invención como concentrado. El concentrado puede ser una forma concentrada del medio en que se ha excretado la enzima. Preferiblemente, el concentrado puede ser una forma concentrada del medio en que se ha excretado la enzima y en la que se han retirado la célula o células.

Secuencia nucleotídica

- 45 El alcance de la presente invención engloba secuencias nucleotídicas que codifican proteínas que tienen las propiedades y/o parámetros específicos definidos en la presente memoria.

El término "secuencia nucleotídica" como se usa en la presente memoria hace referencia a una secuencia oligonucleotídica o secuencia polinucleotídica y a variantes, homólogos, fragmentos y derivados de las mismas (tales como porciones de las mismas). La secuencia nucleotídica puede ser de origen genómico o sintético o recombinante, que puede ser bicatenaria o monocatenaria si representa la hebra codificante o anticodificante.

- 50 El término "secuencia nucleotídica" con relación a la presente invención incluye ADN genómico, ADNc, ADN sintético y ARN. Preferiblemente, significa ADN, más preferiblemente una secuencia de ADNc que codifica la presente invención.

En una realización preferida, la secuencia nucleotídica, cuando se refiere a y cuando se engloba por el alcance *per se* de la presente invención, no incluye la secuencia nucleotídica nativa según la presente invención cuando está en su entorno natural y cuando está ligada con su secuencia o secuencias naturalmente asociadas que están también en su entorno natural. Por facilidad de referencia, se llamará a esta realización preferida “secuencia nucleotídica no nativa”. A este respecto, el término “secuencia nucleotídica nativa” significa una secuencia nucleotídica completa que está en su entorno nativo y cuando está ligada operativamente con un promotor completo con el que está naturalmente asociada, estando dicho promotor también en su entorno nativo. Sin embargo, la secuencia aminoacídica englobada por el alcance de la presente invención puede aislarse y/o purificarse después de la expresión de una secuencia nucleotídica en su organismo nativo. Preferiblemente, sin embargo, la secuencia aminoacídica englobada por el alcance de la presente invención puede expresarse por una secuencia nucleotídica en su organismo nativo, pero en la que la secuencia nucleotídica no está bajo el control del promotor con el que está naturalmente asociada en ese organismo.

Típicamente, la secuencia nucleotídica englobada por el alcance de la presente invención se prepara usando técnicas de ADN recombinante (concretamente, ADN recombinante). Sin embargo, en una realización alternativa de la invención, la secuencia nucleotídica podría sintetizarse, toda o en parte, usando métodos químicos bien conocidos en la materia (véanse Caruthers MH *et al.*, (1980) Nuc Acids Res Symp Ser 215-23 y Horn T *et al.*, (1980) Nuc Acids Res Symp Ser 225-232)

Preparación de la secuencia nucleotídica

Puede identificarse y/o aislarse y/o purificarse una secuencia nucleotídica que codifica una proteína que tiene las propiedades específicas definidas en la presente memoria o una proteína que es adecuada para modificación a partir de cualquier célula u organismo productor de dicha proteína. Son bien conocidos en la materia diversos métodos para la identificación y/o aislamiento y/o purificación de secuencias nucleotídicas. A modo de ejemplo, pueden usarse técnicas de amplificación por PCR para preparar más de una secuencia una vez se haya identificado y/o aislado y/o purificado una secuencia adecuada.

A modo de ejemplo adicional, puede construirse una colección de ADN genómico y/o ADNc usando ADN cromosómico o ARN mensajero del organismo productor de la enzima. Si es conocida la secuencia aminoacídica de la enzima, pueden sintetizarse sondas oligonucleotídicas marcadas y usarse para identificar clones codificantes de enzimas de la colección genómica preparada a partir del organismo. Como alternativa, podría usarse una sonda oligonucleotídica marcada que contiene secuencias homólogas de otro gen enzimático conocido para identificar clones codificantes de enzimas. En este último caso, se usan condiciones de hibridación y lavado de bajo rigor.

Como alternativa, podrían identificarse clones codificantes de enzimas insertando fragmentos de ADN genómico en un vector de expresión, tal como un plásmido, transformando bacterias negativas de enzima con la colección de ADN genómico resultante y sembrando entonces las bacterias transformadas sobre placas de agar que contienen un sustrato para la enzima (concretamente maltosa), permitiendo así identificar los clones que expresan la enzima.

En una realización alternativa más, puede prepararse sintéticamente la secuencia nucleotídica que codifica la enzima mediante métodos estándares establecidos, p.ej., el método de fosfoamidita descrito por Beucage S.L. *et al.*, (1981) Tetrahedron Letters 22, pág. 1859-1869, o el método descrito por Matthes *et al.*, (1984) EMBO J. 3, pág. 801-805. En el método de fosfoamidita, se sintetizan oligonucleótidos, p.ej. en un sintetizador de ADN automático, se purifican, se reasocian, se ligan y se clonan en vectores apropiados.

La secuencia nucleotídica puede ser de origen genómico y sintético mixto, de origen sintético y de ADNc mixto o de origen genómico y de ADNc mixto, preparada ligando fragmentos de origen sintético, genómico o de ADNc (según sea apropiado) de acuerdo con técnicas estándares. Cada fragmento ligado corresponde a diversas partes de la secuencia nucleotídica completa. La secuencia de ADN puede prepararse también mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando cebadores específicos, por ejemplo como se describe en el documento US 4.683.202 o en Saiki R K *et al.*, (Science (1988) 239, pág. 487-491).

Secuencias aminoacídicas

El alcance de la presente invención engloba también secuencias aminoacídicas de enzimas que tienen las propiedades específicas definidas en la presente memoria.

Como se usa en la presente memoria, el término “secuencia aminoacídica” es sinónimo del término “polipéptido” y/o del término “proteína”. En algunos casos, el término “secuencia aminoacídica” es sinónimo del término “péptido”. En algunos casos, el término “secuencia aminoacídica” es sinónimo del término “péptido”. En algunos casos, el término “secuencia aminoacídica” es sinónimo del término “enzima”.

La secuencia aminoacídica puede prepararse/aislarse a partir de una fuente adecuada, o puede elaborarse sintéticamente o puede prepararse mediante el uso de técnicas de ADN recombinante.

La proteína englobada en la presente invención puede usarse junto con otras proteínas, particularmente enzimas. Por tanto, la presente invención cubre también una combinación de proteínas en la que la combinación comprende

la proteína/enzima de la presente invención y otra proteína/enzima, que puede ser otra proteína/enzima según la presente invención. Este aspecto se discute en una sección posterior.

- 5 Preferiblemente, la secuencia aminoacídica cuando se refiere a y cuando está englobada por el alcance *per se* de la presente invención no es una enzima nativa. A este respecto, el término “enzima nativa” significa una enzima completa que está en su entorno nativo y cuando se expresa por su secuencia nucleotídica nativa.

Identidad de secuencia u homología de secuencia

- 10 La presente invención engloba también el uso de secuencias que tienen un grado de identidad de secuencia u homología de secuencia con la secuencia o secuencias aminoacídicas de un polipéptido que tiene las propiedades específicas definidas en la presente memoria o de cualquier secuencia nucleotídica que codifique dicho polipéptido (se hace referencia de aquí en adelante como “secuencia o secuencias homólogas”). Aquí, el término “homólogo” significa una entidad que tiene una cierta homología con las secuencias aminoacídicas en cuestión y las secuencias nucleotídicas en cuestión. Aquí, el término “homología” puede equipararse a “identidad”.

La secuencia aminoacídica y/o secuencia nucleotídica homóloga debería proporcionar y/o codificar un polipéptido que retenga la actividad funcional y/o potencie la actividad de la enzima.

- 15 En el presente contexto, se toma una secuencia homóloga que incluye una secuencia aminoacídica que puede ser al menos un 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 85 o 90% idéntica, preferiblemente al menos un 95 o 98% idéntica, a la secuencia en cuestión. Típicamente, los homólogos comprenderán los mismos sitios activos, etc. que la secuencia aminoacídica en cuestión. Aunque la homología puede considerarse también en términos de similitud (concretamente, residuos aminoacídicos que tienen propiedades químicas/funciones similares), en el contexto de la presente invención se prefiere expresar la homología en términos de identidad de secuencia.

- 20 En el presente contexto, se toma una secuencia homóloga que incluye una secuencia nucleotídica que puede ser al menos un 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 85 o 90% idéntica, preferiblemente al menos un 95 o 98% idéntica, a una secuencia nucleotídica que codifica un polipéptido de la presente invención (la secuencia en cuestión). Típicamente, los homólogos comprenderán las mismas secuencias que codifican los sitios activos etc. de la secuencia en cuestión. Aunque la homología puede considerarse también en términos de similitud (concretamente, residuos aminoacídicos que tienen propiedades químicas/funciones similares), en el contexto de la presente invención se prefiere expresar la homología en términos de identidad de secuencia.

- 30 Las comparaciones de homología pueden realizarse visualmente o, más habitualmente, con la ayuda de programas de comparación de secuencia fácilmente disponibles. Estos programas informáticos comercialmente disponibles pueden calcular el % de homología entre dos o más secuencias.

El % de homología puede calcularse en secuencias contiguas, concretamente se alinea una secuencia con la otra secuencia y se compara directamente cada aminoácido en una secuencia con el correspondiente aminoácido en la otra secuencia, un residuo cada vez. Esto se llama un alineamiento “sin huecos”. Típicamente, dichos alineamientos sin huecos se efectúan solo con un número relativamente corto de residuos.

- 35 Aunque este es un método muy sencillo y consistente, no consigue tener en consideración que, por ejemplo, en un par de secuencias por lo demás idénticas, una inserción o deleción causará que los siguientes aminoácidos salgan del alineamiento, dando por tanto como resultado potencialmente una gran reducción del % de homología cuando se efectúa un alineamiento global. En consecuencia, la mayoría de métodos de comparación de secuencia se diseñan para producir alineamientos óptimos que tengan en consideración las posibles inserciones y deleciones sin penalizar indebidamente la puntuación de homología global. Esto se consigue insertando “huecos” en el alineamiento de secuencia para intentar maximizar la homología local. Sin embargo, estos métodos más complejos asignan “penalizaciones de hueco” a cada hueco que aparece en el alineamiento de modo que, para el mismo número de aminoácidos idénticos, un alineamiento de secuencia con los menores huecos posibles, que reflejan la mayor relación entre las dos secuencias comparadas, conseguirá una puntuación mayor que uno con muchos huecos. Se usan típicamente “costes de huecos afines” que cargan un coste relativamente alto por la existencia de un hueco y una menor penalización por cada residuo posterior en el hueco. Este es el sistema de puntuación de huecos más comúnmente usado. Las altas penalizaciones de hueco producirán por supuesto alineamientos optimizados con menos huecos. La mayoría de programas de alineamiento permitirán modificar las penalizaciones de hueco. Sin embargo, se prefiere usar los valores por defecto cuando se usa dicho software para comparaciones de secuencia.

- 50 El cálculo del % de homología máxima requiere por lo tanto en primer lugar la producción de un alineamiento óptimo, teniendo en consideración las penalizaciones de hueco. Es un programa informático adecuado para llevar a cabo dicho alineamiento Vector NTI Advance™ 11 (Invitrogen Corp.). Los ejemplos de software que puede efectuar comparaciones de secuencia incluyen, pero sin limitación, el paquete BLAST (véase Ausubel *et al.* 1999 “Short Protocols in Molecular Biology”, 4ª Ed - capítulo 18), BLAST 2 (véase *FEMS Microbiol Lett* 1999 174(2): 247-50; *FEMS Microbiol Lett* 1999 177(1): 187-8 y tatiana@ncbi.nlm.nih.gov), FASTA (Altschul *et al.* 1990 *J Mol. Biol.* 403-410) y AlignX, por ejemplo. Al menos BLAST, BLAST 2 y FASTA están disponibles para búsqueda fuera de línea y en línea (véase Ausubel *et al.* 1999, páginas 7-58 a 7-60).

Aunque el % de homología final puede medirse en términos de identidad, el proceso de alineamiento mismo no está típicamente basado en una comparación por pares de todo o nada. En lugar de ello, se usa generalmente una matriz de puntuación por similitud graduada que asigna puntuaciones a cada comparación por pares basándose en la similitud química o la distancia evolutiva. Es un ejemplo de dicha matriz usada comúnmente la matriz BLOSUM62, la matriz por defecto del conjunto de programas BLAST. Los programas Vector NTI usan generalmente los valores por defecto públicos o una tabla de comparación de símbolos a medida si se suministra (véase el manual del usuario para más detalles). Para algunas aplicaciones, se prefiere usar los valores por defecto para el paquete Vector NTI Advance™ 11.

5
10 Como alternativa, pueden calcularse las homologías porcentuales usando el rasgo de alineamiento múltiple en Vector NTI Advance™ 11 (Invitrogen Corp.), basándose en un algoritmo análogo a CLUSTAL (Higgins DG y Sharp PM (1988), Gene 73(1), 237-244). Una vez el software ha producido un alineamiento óptimo, es posible calcular el % de homología, preferiblemente el % de identidad de secuencia. El software típicamente hace eso como parte de la comparación de secuencia y genera un resultado numérico.

15 Las penalizaciones de hueco deberían usarse cuando se determina la identidad de secuencia, entonces se usan preferiblemente los siguientes parámetros para alineamiento por pares:

PARA BLAST	
ABERTURA DE HUECO	0
EXTENSIÓN DE HUECO	0

PARA CLUSTAL	ADN	PROTEÍNA	
TAMAÑO DE PALABRA	2	1	K triple
PENALIZACIÓN DE HUECO	15	10	
EXTENSIÓN DE HUECO	6,66	0,1	

En una realización, puede usarse CLUSTAL con la penalización de hueco y la extensión de hecho establecidas como se define anteriormente.

20 Adecuadamente, se determina el grado de identidad con respecto a una secuencia nucleotídica en al menos 20 nucleótidos contiguos, preferiblemente en al menos 30 nucleótidos contiguos, preferiblemente en al menos 40 nucleótidos contiguos, preferiblemente en al menos 50 nucleótidos contiguos, preferiblemente en al menos 60 nucleótidos contiguos, preferiblemente en al menos 100 nucleótidos contiguos.

Adecuadamente, puede determinarse el grado de identidad con respecto a una secuencia nucleotídica en la secuencia completa.

25 Variantes/homólogos/derivados

La presente memoria descriptiva engloba también el uso de variantes, homólogos y derivados de cualquier secuencia aminoacídica de una proteína o de cualquier secuencia nucleotídica que codifique dicha proteína.

30 Aquí, el término "homólogo" significa una entidad que tiene una cierta homología con las secuencias aminoacídicas en cuestión y con las secuencias nucleotídicas en cuestión. Aquí, el término "homología" puede equipararse con "identidad".

35 En el presente contexto, se toma una secuencia homóloga que incluye una secuencia aminoacídica que puede ser al menos un 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85 o 90% idéntica, preferiblemente al menos un 95, 96, 97, 98 o 99% idéntica a la secuencia en cuestión. Típicamente, los homólogos comprenderán los mismos sitios activos etc. que la secuencia aminoacídica en cuestión. Aunque la homología puede considerarse también en términos de similitud (concretamente, residuos aminoacídicos que tienen propiedades químicas/funciones similares), en el contexto de la presente invención se prefiere expresar la homología en términos de identidad de secuencia.

40 En el presente contexto, se toma una secuencia homóloga que incluye una secuencia nucleotídica que puede ser al menos un 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85 o 90% idéntica, preferiblemente al menos un 95, 96, 97, 98 o 99% idéntica, a una secuencia nucleotídica que codifica una enzima de la presente invención (la secuencia en cuestión). Típicamente, los homólogos comprenderán las mismas secuencias que codifican los sitios activos etc. que la secuencia en cuestión. Aunque la homología puede considerarse también en términos de similitud (concretamente, residuos aminoacídicos que tienen propiedades químicas/funciones similares), en el contexto de la presente invención se prefiere expresar la homología en términos de identidad de secuencia.

Las comparaciones de homología pueden realizarse visualmente o, más habitualmente, con la ayuda de programas

de comparación de secuencia fácilmente disponibles. Estos programas informáticos comercialmente disponibles pueden calcular el % de homología entre dos o más secuencias.

5 El % de homología puede calcularse en secuencias contiguas, concretamente se alinea una secuencia con la otra secuencia y se compara directamente cada aminoácido de una secuencia con el correspondiente aminoácido de la otra secuencia, un residuo cada vez. Esto se llama alineamiento “sin huecos”. Típicamente, dichos alineamientos sin huecos se efectúan solo en un número relativamente corto de residuos.

10 Aunque este es un método muy sencillo y consistente, no consigue tener en consideración que, por ejemplo, en un par de secuencias por lo demás idénticas, una inserción o deleción causará que los siguientes aminoácidos salgan del alineamiento, dando por tanto como resultado potencialmente una gran reducción del % de homología cuando se efectúa un alineamiento global. En consecuencia, la mayoría de métodos de comparación de secuencia se diseñan para producir alineamientos óptimos que tengan en consideración las posibles inserciones y deleciones sin penalizar indebidamente la puntuación de homología global. Esto se consigue insertando “huecos” en el alineamiento de secuencia para intentar maximizar la homología local.

15 Sin embargo, estos métodos más complejos asignan “penalizaciones de hueco” a cada hueco que aparece en el alineamiento de modo que, para el mismo número de aminoácidos idénticos, un alineamiento de secuencia con los menores huecos posibles, que reflejan la mayor relación entre las dos secuencias comparadas, conseguirá una puntuación mayor que uno con muchos huecos. Se usan típicamente “costes de huecos afines” que cargan un coste relativamente alto por la existencia de un hueco y una menor penalización por cada residuo posterior en el hueco. Este es el sistema de puntuación de huecos más comúnmente usado. Las altas penalizaciones de hueco producirán por supuesto alineamientos optimizados con menos huecos. La mayoría de programas de alineamiento permitirán modificar las penalizaciones de hueco. Sin embargo, se prefiere usar los valores por defecto cuando se usa dicho software para comparaciones de secuencia. Por ejemplo, cuando se usa el paquete GCG Wisconsin Bestfit, la penalización por hueco por defecto para secuencias aminoacídicas es -12 para un hueco y -4 para cada extensión.

25 El cálculo del % de homología máxima requiere por lo tanto en primer lugar la producción de un alineamiento óptimo, teniendo en consideración las penalizaciones de hueco. Es un programa informático adecuado para llevar a cabo dicho alineamiento el paquete GCG Wisconsin Bestfit (Devereux *et al* 1984 Nuc. Acids Research 12, pág. 387). Los ejemplos de otro software que puede efectuar comparaciones de secuencia incluyen, pero sin limitación, el paquete BLAST (véase Ausubel *et al.* 1999 “Short Protocols in Molecular Biology”, 4ª Ed - capítulo 18), FASTA (Altschul *et al.* 1990 J. Mol. Biol. 403-410) y el grupo GENWORKS de herramientas de comparación. Tanto BLAST como FASTA están disponibles para búsqueda fuera de línea y en línea (véase Ausubel *et al* 1999, “Short Protocols in Molecular Biology”, páginas 7-58 a 7-60). Sin embargo, para algunas aplicaciones, se prefiere usar el programa GCG Bestfit. Está también disponible una nueva herramienta, llamada BLAST 2 Sequences, para comparar secuencias proteicas y nucleotídicas (véanse FEMS Microbiol Lett 1999 174(2): 247-50; FEMS Microbiol Lett 1999 177(1): 187-8 y tatiana@ncbi.nlm.nih.gov).

35 Aunque el % de homología final puede medirse en términos de identidad, el proceso de alineamiento mismo no está típicamente basado en una comparación por pares de todo o nada. En lugar de ello, se usa generalmente una matriz de puntuación por similitud graduada que asigna puntuaciones a cada comparación por pares basándose en la similitud química o la distancia evolutiva. Es un ejemplo de dicha matriz usada comúnmente la matriz BLOSUM62, la matriz por defecto del conjunto de programas BLAST. El conjunto de programas GCG Wisconsin usan generalmente los valores por defecto públicos o una tabla de comparación de símbolos a medida si se suministra (véase el manual del usuario para más detalles). Para algunas aplicaciones, se prefiere usar los valores por defecto para el paquete GCG, en el caso de otro software, la matriz por defecto tal como BLOSUM62.

45 Como alternativa, pueden calcularse los porcentajes de homología usando el rasgo de alineamiento múltiple en DNASIS™ (Hitachi Software), basándose en un algoritmo análogo a CLUSTAL (Higgins DG y Sharp PM (1988), Gene 73(1), 237-244).

Una vez el software ha producido un alineamiento óptimo, es posible calcular el % de homología, preferiblemente el % de identidad de secuencia. El software hace típicamente eso como parte de la comparación de secuencia y genera un resultado numérico.

50 Las secuencias pueden tener también deleciones, inserciones o sustituciones de residuos aminoacídicos que producen un cambio silencioso y dan como resultado una sustancia funcionalmente equivalente. Pueden hacerse sustituciones aminoacídicas deliberadas basándose en la similitud de polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad, hidrofiliidad y/o naturaleza anfipática de los residuos siempre que se retenga la actividad de unión secundaria de la sustancia. Por ejemplo, los aminoácidos cargados negativamente incluyen ácido aspártico y ácido glutámico; los aminoácidos cargados positivamente incluyen lisina y arginina y los aminoácidos con grupos de cabeza polares no cargados que tienen valores de hidrofiliidad similares incluyen leucina, isoleucina, valina, glicina, alanina, asparagina, glutamina, serina, treonina, fenilalanina y tirosina.

Pueden hacerse sustituciones conservativas, por ejemplo, según la Tabla siguiente. Los aminoácidos en el mismo bloque de la segunda columna y preferiblemente en la misma línea de la tercera columna pueden sustituirse entre sí.

ALIFÁTICO	No polar	G A P
		I L V
	Polar – no cargado	C S T M
		N Q
Polar – cargado	D E	
	K R	
AROMÁTICO		H F W Y

La presente invención engloba también la sustitución homóloga (sustitución y reemplazo se usan ambos en la presente memoria para indicar el intercambio de un residuo aminoacídico existente por un residuo alternativo) que puede aparecer, concretamente, sustitución de similar por similar tal como básico por básico, ácido por ácido, polar por polar, etc. También puede aparecer sustitución no homóloga, concretamente, de una clase de residuo por otra o que implica como alternativa la inclusión de aminoácidos no naturales tales como ornitina (de aquí en adelante designada como Z), ornitina de ácido diaminobutírico (de aquí en adelante designada como B), norleucina-ornitina (de aquí en adelante designada como O), pirilalanina, tienilalanina, naftilalanina y fenilglicina.

Los reemplazos pueden hacerse también por aminoácidos no naturales e incluyen aminoácidos alfa* y alfa* disustituidos, N-alquilaminoácidos*, ácido láctico*, derivados de haluro de aminoácidos naturales tales como trifluorotirosina*, p-Cl-fenilalanina*, p-Br-fenilalanina*, p-I-fenilalanina*, L-alilglicina*, β-alanina*, ácido L-aminobutírico*, ácido L-aminoisobutírico*, ácido L-aminocaproico#, ácido 7-aminoheptanoico*, L-metioninsulfona*, L-norleucina*, L-norvalina*, p-nitro-L-fenilalanina*, L-hidroxi prolina*, L-tioprolina*, derivados metílicos de fenilalanina (Phe) tales como 4-metil-Phe*, pentametil-Phe*, L-Phe (4-amino)*, L-Tyr (metilo)*, L-Phe (4-isopropilo)*, L-Tic (ácido 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-3-carboxílico)*, ácido L-diaminopropiónico y L-Phe (4-bencilo)*. La notación * se ha utilizado con el fin de la discusión anterior (respecto a sustitución homóloga o no homóloga) para indicar la naturaleza hidrófoba del derivado, mientras que # se ha utilizado para indicar la naturaleza hidrófila del derivado, #* indica características anfipáticas.

Las secuencias aminoacídicas variantes pueden incluir grupos espaciadores adecuados que pueden insertarse entre dos residuos aminoacídicos cualesquiera de la secuencia, incluyendo grupos alquilo tales como grupos metilo, etilo o propilo, además de espaciadores aminoacídicos tales como residuos de glicina o alanina. Una forma adicional de variación, que implica la presencia de uno o más residuos aminoacídicos en forma peptoide, será bien entendida por los especialistas en la materia. Para evitar dudas, “la forma peptoide” se usa para hacer referencia a residuos aminoacídicos variantes en los que el grupo sustituyente de carbono está en el átomo de nitrógeno del residuo en lugar de en el de carbono. Son conocidos en la materia procesos para preparar péptidos en forma peptoide, por ejemplo Simon RJ *et al.*, PNAS (1992) 89(20), 9367-9371 y Horwell DC, Trends Biotechnol. (1995) 13(4), 132-134.

Las secuencias nucleotídicas para uso en la presente invención pueden incluir en ellas nucleótidos sintéticos o modificados. Son conocidos en la materia una serie de diferentes tipos de modificación de oligonucleótidos. Estos incluyen esqueletos de metilfosfonato y fosforotioato y/o la adición de cadenas de acridina o polilisina en los extremos 3' y/o 5' de la molécula. Con los fines de la presente invención, se entiende que las secuencias nucleotídicas descritas en la presente memoria pueden modificarse mediante cualquier método disponible en la materia. Dichas modificaciones pueden llevarse a cabo para potenciar la actividad *in vivo* o la vida útil de las secuencias nucleotídicas de la presente invención.

La presente memoria descriptiva engloba también el uso de secuencias nucleotídicas que son complementarias de las secuencias presentadas en la presente memoria, o cualquier derivado, fragmento o derivado de las mismas. Si la secuencia es complementaria de un fragmento de la misma, entonces puede usarse esa secuencia como sonda para identificar secuencias de codificación similares en otros organismos, etc.

Pueden obtenerse de una serie de modos polinucleótidos que no son 100% homólogos de las secuencias de la presente invención, pero que entran dentro del alcance de la invención. Pueden obtenerse otras variantes de las secuencias descritas en la presente memoria por ejemplo sondeando colecciones de ADN compuestas por una serie de individuos, por ejemplo individuos de diferentes poblaciones. Además, pueden obtenerse otros homólogos y dichos homólogos y fragmentos de los mismos serán en general capaces de hibridar selectivamente con las secuencias mostradas en el listado de secuencias de la presente memoria. Dichas secuencias pueden obtenerse sondeando colecciones de ADNc elaboradas a partir de, o colecciones de ADN genómico de, otra especie animal, y sondeando dichas colecciones con sondas que comprenden toda o parte de una cualquiera de las secuencias del listado de secuencias adjunto en condiciones de rigor medio a alto. Se aplican consideraciones similares para obtener homólogos de especie y variantes alélicas de las secuencias polipeptídicas o nucleotídicas de la invención.

Pueden obtenerse también variantes y homólogos de cepa/especie usando PCR degenerada, que usará cebadores diseñados para orientarse a secuencias en las variantes y homólogos que codifican secuencias aminoacídicas conservadas en las secuencias de la presente invención. Las secuencias conservadas pueden predecirse, por

ejemplo, alineando las secuencias aminoacídicas de varias variantes/homólogos. Los alineamientos de secuencia pueden efectuarse usando software informático conocido en la materia. Por ejemplo, se usa ampliamente el programa PileUp de GCG Wisconsin.

5 Los cebadores usados en PCR degenerada contendrán una o más posiciones degeneradas y se usarán en condiciones menos rigurosas que las usadas para clonar secuencias con cebadores de secuencia únicos contra secuencias conocidas.

10 Como alternativa, dichos polinucleótidos pueden obtenerse mediante mutagénesis dirigida a sitio de secuencias caracterizadas. Esto puede ser útil cuando se requieren, por ejemplo, cambios de secuencia de codón silenciosos para optimizar las preferencias de codón por una célula hospedadora particular en que se expresan las secuencias polinucleotídicas. Pueden desearse otros cambios de secuencia para introducir sitios de reconocimiento de enzima de restricción, o para alterar la propiedad o función de los polipéptidos codificados por los polinucleótidos.

15 Los polinucleótidos (secuencias nucleotídicas) de la invención pueden usarse para producir un cebador, p.ej. un cebador de PCR, un cebador para una reacción de amplificación alternativa, una sonda, p.ej. marcada con un marcaje revelador por medios convencionales usando marcajes radiactivos o no radiactivos, o el polinucleótido puede clonarse en vectores. Dichos cebadores, sondas y otros fragmentos serán de al menos 15, preferiblemente al menos 20, por ejemplo al menos 25, 30 o 40 nucleótidos de longitud, y están también englobados por el término polinucleótidos como se usa en la presente memoria.

20 Los polinucleótidos tales como polinucleótidos y sondas de ADN pueden producirse recombinante, sintéticamente o mediante cualquier medio disponible por los especialistas en la materia. Pueden clonarse también por técnicas estándares.

En general, se producirán cebadores por medios sintéticos, que implican una fabricación por etapas de la secuencia de ácido nucleico deseada de un nucleótido cada vez. Las técnicas para lograr estos usando técnicas automatizadas están fácilmente disponibles en la materia.

25 Se producirán generalmente polinucleótidos más largos usando medios recombinantes, por ejemplo usando técnicas de clonación por PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Los cebadores pueden diseñarse para contener sitios de reconocimiento de enzimas de restricción adecuados de modo que pueda clonarse el ADN amplificado en un vector de clonación adecuado.

Hibridación

30 La presente memoria descriptiva engloba también secuencias que son complementarias de las secuencias de ácido nucleico de la presente invención, o secuencias que son capaces de hibridar con las secuencias de la presente invención o las secuencias que son complementarias de las mismas.

El término "hibridación" como se usa en la presente memoria incluirá "el proceso mediante el cual se une una hebra de un ácido nucleico con una hebra complementaria mediante apareamiento de bases", así como el proceso de amplificación como se lleva a cabo en las tecnologías de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

35 La presente memoria descriptiva engloba también el uso de secuencias nucleotídicas que son capaces de hibridar con secuencias que son complementarias de las secuencias presentadas en la presente memoria, o cualquier derivado, fragmento o derivado de las mismas.

El término "variante" engloba también secuencias que son complementarias de secuencias que son capaces de hibridar con las secuencias nucleotídicas presentadas en la presente memoria.

40 Preferiblemente, el término "variante" engloba secuencias que son complementarias de secuencias que son capaces de hibridar en condiciones rigurosas (p.ej., 50°C y 0,2xSSC {1xSSC= NaCl 0,15 M, citrato de Na₃ 0,015 M, pH 7,0}) con las secuencias nucleotídicas presentadas en la presente memoria.

45 Más preferiblemente, el término "variante" engloba secuencias que son complementarias de secuencias que son capaces de hibridar en condiciones de alto rigor (p.ej. 65°C y 0,1xSSC {1xSSC= NaCl 0,15 M, citrato de Na₃ 0,015 M, pH 7,0}) con las secuencias nucleotídicas presentadas en la presente memoria.

La presente invención se refiere también a secuencias nucleotídicas que pueden hibridar con las secuencias nucleotídicas de la presente invención (incluyendo secuencias complementarias de aquellas presentadas en la presente memoria).

50 La presente invención se refiere también a secuencias nucleotídicas que son complementarias de secuencias que pueden hibridar con las secuencias nucleotídicas de la presente invención (incluyendo secuencias complementarias de aquellas presentadas en la presente memoria).

Se incluyen también en el alcance de la presente memoria descriptiva secuencias polinucleotídicas que son capaces de hibridar con las secuencias nucleotídicas presentadas en la presente memoria en condiciones de rigor intermedio

a máximo.

En un aspecto preferido, la presente memoria descriptiva cubre secuencias nucleotídicas que pueden hibridar con la secuencia nucleotídica de la presente invención, o el complemento de la misma, en condiciones rigurosas (p.ej. 50°C y 0,2xSSC).

- 5 En un aspecto más preferido, la presente memoria descriptiva cubre secuencias nucleotídicas que pueden hibridar con la secuencia nucleotídica de la presente invención, o el complemento de la misma, en condiciones de alto rigor (p.ej. 65°C y 0,1xSSC).

Evolución molecular

- 10 Como ejemplo no limitante, es posible producir numerosas mutaciones dirigidas a sitio o aleatorias en una secuencia nucleotídica, tanto *in vivo* como *in vitro*, y posteriormente verificar la funcionalidad mejorada del polipéptido codificado por diversos medios.

- 15 Además, pueden recombinarse mutaciones o variantes naturales de una secuencia polinucleotídica con el tipo silvestre u otras mutaciones o variantes naturales, produciendo nuevas variantes. En dichas nuevas variantes, puede verificarse también la funcionalidad mejorada del polipéptido codificado. Puede conseguirse la producción de nuevas variantes preferidas mediante diversos métodos bien establecidos en la materia, por ejemplo mutagénesis de umbral de error (documento WO 92/18645), mutagénesis aleatoria mediada por oligonucleótidos (documento US 5.723.323), transposición de ADN (documento US 5.605.793), ensamblaje génico exomediado (documento WO00/58517). La aplicación de estos métodos de evolución molecular dirigidos aleatorios y similares permite la identificación y selección de variantes de las enzimas de la presente invención que tienen características preferidas sin un conocimiento previo de la estructura o función proteica, y permite la producción de mutaciones o variantes no predecibles pero beneficiosas. Existen numerosos ejemplos de la aplicación de evolución molecular en la materia para la optimización o alteración de actividad enzimática, dichos ejemplos incluyen, pero sin limitación, uno o más de los siguientes:

- 25 expresión y/o actividad optimizada en una célula hospedadora o *in vitro*, actividad enzimática aumentada, especificidad de sustrato y/o producto alterada, estabilidad enzimática o estructural aumentada o disminuida, actividad/especificidad enzimática alterada en condiciones ambientales preferidas, p.ej. temperatura, pH, sustrato.

Mutagénesis dirigida a sitio

- 30 Una vez se ha aislado una secuencia nucleotídica codificante de proteína, o se ha identificado una presunta secuencia nucleotídica codificante de proteína, puede ser deseable mutar la secuencia para preparar una proteína de la presente invención.

Las mutaciones pueden introducirse usando oligonucleótidos sintéticos. Estos oligonucleótidos contienen secuencias nucleotídicas que flanquean sitios de mutación deseados.

- 35 Se divulga un método adecuado en Morinaga *et al.*, (*Biotechnology* (1984) 2, pág. 646-649). Se describe otro método de introducción de mutaciones en secuencias nucleotídicas codificantes de enzima en Nelson y Long (*Analytical Biochemistry* (1989), 180, pág. 147-151).

Recombinante

En un aspecto, la secuencia para uso en la presente invención es una secuencia recombinante, concretamente una secuencia que se ha preparado usando técnicas de ADN recombinante.

- 40 Estas técnicas de ADN recombinante están dentro de las capacidades de un especialista en la materia. Dichas técnicas se explican en la bibliografía, por ejemplo, J. Sambrook, E. F. Fritsch y T. Maniatis, 1989, "Molecular Cloning. A Laboratory Manual", 2ª edición, libros 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sintética

- 45 En un aspecto, la secuencia para uso en la presente invención es una secuencia sintética, concretamente una secuencia que se ha preparado mediante síntesis química o enzimática *in vitro*. Incluye, pero sin limitación, secuencias elaboradas con un uso de codón óptimo para los organismos hospedadores *T. reesei*

Expresión de enzimas

La secuencia nucleotídica para uso en la presente invención puede incorporarse a un vector replicable recombinante. El vector puede usarse para replicar y expresar la secuencia nucleotídica, en forma de proteína, y/o a partir de una célula hospedadora compatible.

- 50 La expresión puede controlarse usando secuencias de control, p.ej. secuencias reguladoras.

La proteína producida por una célula recombinante hospedadora por expresión de la secuencia nucleotídica puede secretarse o puede estar contenida intracelularmente, dependiendo de la secuencia y/o del vector usado. Las secuencias de codificación pueden diseñarse con secuencias señal que dirijan la secreción de secuencias de codificación de sustancia a través de una membrana celular procariótica o eucariótica particular.

5 Vector de expresión

El término “vector de expresión” significa un constructo capaz de expresión *in vivo* o *in vitro*.

Preferiblemente, se incorpora el vector de expresión al genoma de un organismo hospedador adecuado. El término “incorporar” cubre preferiblemente incorporación estable al genoma.

10 La secuencia nucleotídica de la presente invención puede estar presente en un vector en que la secuencia nucleotídica está ligada operativamente con secuencias reguladoras capaces de proporcionar la expresión de la secuencia nucleotídica por un organismo hospedador adecuado.

Los vectores para uso en la presente invención pueden transformarse en una célula hospedadora adecuada como se describe a continuación, proporcionando la expresión de un polipéptido de la presente invención.

15 La elección del vector, p.ej. un plásmido, cósmido o vector de fago, dependerá a menudo de la célula hospedadora en que se vaya a introducir.

Los vectores para uso en la presente invención pueden contener uno o más genes marcadores seleccionables, tales como un gen que confiere resistencia a antibióticos p.ej. resistencia a ampicilina, kanamicina, cloranfenicol o tetraciclina. Como alternativa, la selección puede lograrse mediante cotransformación (como se describe en el documento WO91/17243).

20 Los vectores pueden usarse *in vitro*, por ejemplo para la producción de ARN, o usarse para transfectar, transformar, transducir o infectar una célula hospedadora.

25 Por tanto, en una realización adicional, la memoria descriptiva proporciona un método de elaboración de secuencias nucleotídicas de la presente invención mediante la introducción de una secuencia nucleotídica de la presente invención en un vector replicable, la introducción del vector en una célula hospedadora compatible y el crecimiento de la célula hospedadora en condiciones que causen la replicación del vector.

El vector puede comprender además una secuencia nucleotídica que posibilite al vector replicar en la célula hospedadora en cuestión. Son ejemplos de dichas secuencias los orígenes de replicación de los plásmidos pUC19, pACYC177, pUB110, pE194, pAMB1 y pIJ702.

Secuencias reguladoras

30 En algunas aplicaciones, la secuencia nucleotídica para uso en la presente invención puede estar ligada operativamente con una secuencia reguladora que es capaz de proporcionar la expresión de la secuencia nucleotídica, tal como por la célula hospedadora elegida. A modo de ejemplo, la presente memoria descriptiva cubre un vector que comprende la secuencia nucleotídica de la presente invención ligada operativamente con dicha secuencia reguladora, concretamente el vector es un vector de expresión.

35 El término “ligado operativamente” hace referencia a una yuxtaposición en la que los componentes descritos están en una relación que les permite funcionar de su manera pretendida. Una secuencia reguladora “ligada operativamente” con una secuencia de codificación está ligada de tal modo que se consiga la expresión de la secuencia de codificación en condiciones compatible con las secuencias de control.

40 El término “secuencias reguladoras” incluye promotores y potenciadores y otras señales de regulación de la expresión.

El término “promotor” se usa en el sentido normal de la materia, p.ej., un sitio de unión a ARN polimerasa.

Puede conseguirse también la expresión potenciada de la secuencia nucleotídica que codifica la enzima de la presente invención mediante la selección de regiones reguladoras heterólogas, p.ej. regiones promotora, líder de secreción y terminadora.

45 Preferiblemente, la secuencia nucleotídica según la presente invención está ligada operativamente con al menos un promotor.

Pueden usarse incluso otros promotores para dirigir la expresión de polipéptido de la presente invención.

Los ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de la secuencia nucleotídica en un hospedador bacteriano, fúngico o de levadura son bien conocidos en la materia.

50 En una realización, puede ser un promotor adecuado un promotor de celobiohidrolasa.

En una realización, puede ser un promotor adecuado un promotor de celobiohidrolasa obtenible (u obtenido) a partir de *T. reesei*.

5 El promotor puede incluir adicionalmente rasgos para asegurar o aumentar la expresión en un hospedador adecuado. Por ejemplo, los rasgos pueden ser regiones conservadas tales como sitios de unión a factor de transcripción o sitios de unión a represor eliminados.

Constructos

El término “constructo”, que es sinónimo de términos tales como “conjugado”, “módulo” e “híbrido”, incluye una secuencia nucleotídica para uso según la presente invención enlazada directa o indirectamente con un promotor.

10 Es un ejemplo de un enlazamiento indirecto la provisión de un grupo espaciador adecuado tal como una secuencia intrónica, tal como el intrón Sh1 o el intrón ADH, intermedio entre el promotor y la secuencia nucleotídica de la presente invención. Se aplica lo mismo para el término “fusionado” con relación a la presente invención, que incluye enlazamiento directo o indirecto. En algunos casos, los términos no cubren la combinación natural de la secuencia nucleotídica que codifica proteína asociada normalmente al promotor tipo silvestre, y cuando están ambas en su entorno natural.

15 El constructo puede incluso contener o expresar un marcador que permita la selección del constructo genético.

Para algunas aplicaciones, preferiblemente el constructo de la presente memoria descriptiva comprende al menos la secuencia nucleotídica de la presente invención ligada operativamente con un promotor.

Células hospedadoras

20 El término “célula hospedadora”, con relación a la presente invención, incluye cualquier célula de *T. reesei* que comprenda la secuencia nucleotídica o un vector de expresión como se describe anteriormente, y que se use en la producción recombinante de una proteína que tiene las propiedades específicas definidas en la presente memoria.

Por tanto, la presente invención proporciona células hospedadoras *T. reesei* transformadas o transfectadas con una secuencia nucleotídica que expresa la proteína de la presente invención.

25 El uso de una célula hospedadora *T. reesei* puede proporcionar modificaciones postraduccionales (p.ej., miristoilación, glicosilación, truncamiento, lapidación y fosforilación de tirosina, serina o treonina), según puedan necesitarse, para conferir una actividad biológica óptima a productos de expresión recombinante de la presente invención.

Organismo

30 El término “organismo” con relación a la presente invención incluye *T. reesei* que comprende la secuencia nucleotídica que codifica el polipéptido según la presente invención y/o productos obtenidos a partir del mismo, y/o en la que un promotor puede permitir la expresión de la secuencia nucleotídica según la presente invención cuando está presente en el organismo.

El organismo es *T. reesei*.

35 El término “organismo transgénico” con relación a la presente invención incluye un *T. reesei* que comprende la secuencia nucleotídica que codifica el polipéptido según la presente invención y/o los productos obtenidos a partir de la misma, y/o en la que un promotor puede permitir la expresión de la secuencia nucleotídica según la presente invención en el organismo. Preferiblemente, la secuencia nucleotídica se incorpora al genoma del organismo.

El término “organismo transgénico” no cubre secuencias de codificación nucleotídicas nativas en su entorno natural cuando están bajo el control de su promotor nativo que está también en su entorno natural.

40 Por lo tanto, el organismo transgénico para uso en la presente invención incluye un organismo que comprende una cualquiera, o combinaciones, de la secuencia nucleotídica que codifica el polipéptido según la presente invención, constructos como se enseñan en la presente memoria, vectores como se enseñan en la presente memoria, plásmidos como se enseñan en la presente memoria, células como se enseñan en la presente memoria, tejidos como se enseñan en la presente memoria o los productos de los mismos.

45 Por ejemplo, el organismo transgénico puede comprender también la secuencia nucleotídica que codifica el polipéptido de la presente invención bajo el control de un promotor heterólogo.

Transformación de células/organismos hospedadores

50 Los hongos filamentosos pueden transformarse usando diversos métodos conocidos en la materia, tales como un proceso que implica la formación de protoplastos y la transformación de protoplastos seguida de regeneración de la pared celular de manera conocida.

Se presentan las enseñanzas generales sobre la transformación de hongos en las siguientes secciones.

Hongo transformado

El organismo hospedador es *T. reesei*

- 5 Se discute la transformación de hongos filamentosos en el documento US-A-5741665, que afirma que las técnicas estándares para la transformación de hongos filamentosos y el cultivo de los hongos son bien conocidas en la materia. Se encuentra una revisión extensa de las técnicas aplicadas a *N. crassa*, por ejemplo, en Davis y de Serres, Methods Enzymol (1971) 17A: 79-143.

Se revisan enseñanzas adicionales, que puede utilizarse también en la transformación de hongos filamentosos, en el documento US-A-5674707.

- 10 Además, se enseña la expresión génica en hongos filamentosos en Punt *et al.* (2002) Trends Biotechnol mayo de 2002; 20(5): 200-6, Archer & Peberdy Crit Rev Biotechnol (1997) 17(4): 273-306.

La presente memoria descriptiva engloba la producción de hongos filamentosos transgénicos según la presente invención preparados mediante el uso de estas técnicas estándares.

Cultivo y producción

- 15 Las células hospedadoras *T. reesei* transformadas con la secuencia nucleotídica de la presente invención pueden cultivarse en condiciones conducentes a la producción del polipéptido codificado y que facilitan la recuperación del polipéptido de la célula o células y/o del medio de cultivo.

- 20 En una realización, la célula o células de *T. reesei* transformadas o transfectadas proporcionadas de acuerdo con la presente invención se cultivan en condiciones selectivas para permitir la selección de la célula o células transformadas o transfectadas con la enzima lipolítica como se define en la presente memoria.

El medio usado para cultivar la célula o células puede ser cualquier medio convencional adecuado para hacer crecer la célula hospedadora en cuestión y obtener la expresión del polipéptido.

La proteína producida por una célula recombinante puede exhibirse sobre la superficie de la célula.

- 25 La proteína puede secretarse por las células hospedadoras y puede recuperarse convenientemente del medio de cultivo usando procedimientos bien conocidos.

Secreción

- 30 A menudo, es deseable secretar la proteína del hospedador de expresión al medio de cultivo, de donde la proteína puede recuperarse más fácilmente. Según la presente memoria descriptiva, la secuencia líder de secreción puede seleccionarse basándose en el hospedador de expresión deseado. Pueden usarse también secuencias señal híbridas con el contexto de la presente invención.

Los ejemplos típicos de secuencias líder de secreción heterólogas son aquellos originarios del gen de amiloglucosidasa fúngica (AG) (*glaA* – ambas versiones de 18 y 24 aminoácidos, p.ej. de *Aspergillus*), el gen de factor a (levaduras, p.ej. *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* y *Hansenula*) o el gen de amilasa (*Bacillus*).

- 35 En una realización, preferiblemente el péptido señal es aquel mostrado en la SEQ ID NO: 1 en negrita en la Figura 15. En una realización, el péptido señal mostrado en negrita en la figura 15 se escinde postraduccionalmente, proporcionando un péptido que tiene la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 2.

Detección

- 40 Son conocidos en la materia una variedad de protocolos para detectar y medir la expresión de la secuencia aminoacídica. Los ejemplos incluyen ensayo de inmunosorción ligado a enzima (ELISA), radioinmunoensayo (RIA) y clasificación celular activada por fluorescencia (FACS).

Son conocidas una amplia variedad de marcajes y técnicas de conjugación por los especialistas en la materia y pueden usarse en diversos ensayos nucleicos y aminoacídicos.

Una serie de compañías tales como Pharmacia Biotech (Piscataway, NJ), Promega (Madison, WI) y US Biochemical Corp (Cleveland, OH) suministran kits comerciales y protocolos para estos procedimientos.

- 45 Las moléculas o marcajes informadores adecuados incluyen los radionucleidos, enzimas, agentes fluorescentes, quimioluminiscentes o cromogénicos, así como sustratos, cofactores, inhibidores, partículas magnéticas y similares. Las patentes que enseñan el uso de dichos marcajes incluyen los documentos US-A-3.817.837; US-A-3.850.752; US-A-3.939.350; US-A-3.996.345; US-A-4.277.437; US-A-4.275.149 y US-A-4.366.241.

También pueden producirse inmunoglobulinas recombinantes como se muestra en el documento US-A-4.816.567

Proteínas de fusión

5 La secuencia aminoacídica para uso según la presente invención puede producirse como una proteína de fusión, por ejemplo para ayudar a la extracción y purificación. Los ejemplos de copartícipes de proteína de fusión incluyen glutation-S-transferasa (GST), 6xHis, GAL4 (dominios de unión a ADN y/o activación transcripcional) y (galactosidasa). Puede ser también conveniente incluir un sitio de escisión proteolítico entre el copartícipe de proteína de fusión y la secuencia proteica de interés para permitir la retirada de secuencias de la proteína de fusión.

Preferiblemente, la proteína de fusión no impedirá la actividad de la secuencia proteica.

POI adicionales

10 Las secuencias para uso según la presente invención pueden usarse también junto con una o más proteínas de interés (POI) o secuencias nucleotídicas de interés (NOI) adicionales.

15 Los ejemplos no limitantes de POI incluyen: proteínas o enzimas implicadas en el metabolismo del almidón, proteínas o enzimas implicadas en el metabolismo del glicógeno, acetilesterasas, aminopeptidasas, amilasas, arabinasas, arabinofuranosidasas, carboxipeptidasas, catalasas, celulasas, quitinasas, quimosina, cutinasa, desoxirribonucleasas, epimerasas, esterasas, galactosidasas, galactosidasas, glucanasas, glucano liasas, endoglucanasas, glucoamilasas, glucosa oxidasas, glucosidasas, glucosidasas, glucuronidasas, hemicelulasas, hexosa oxidasas, hidrolasas, invertasas, isomerasas, lacasas, fosfolipasas, galactolipasas, lípido aciltransferasa, liasas, manosidasas, oxidasas, oxidorreductasas, pectato liasas, pectina acetilesterasas, pectina despolimerasas, pectina metilesterasas, enzimas pectinolíticas, peroxidasas, fenoloxidasas, fitasas, poligalacturonasas, proteasas, ramnogalacturonasas, ribonucleasas, taumatina, transferasas, proteínas de transporte, transglutaminasas, xilanasas, hexosa oxidasa (D-hexosa: O₂-oxidorreductasa, EC 1.1.3.5) o combinaciones de las mismas. Las NOI pueden incluso ser una secuencia anticodificante de cualquiera de esas secuencias.

La POI puede ser incluso una proteína de fusión, por ejemplo para ayudar a la extracción y purificación.

La POI puede estar incluso fusionada con una secuencia de secreción.

25 Otras secuencias pueden facilitar también la secreción o aumentar el rendimiento de POI secretadas. Dichas secuencias podrían codificar proteínas chaperonas como como por ejemplo el producto del gen *cyp B* de *Aspergillus niger* descrito en la aplicación de patente del RU 9821198.0.

30 La NOI puede genomanipularse para alterar su actividad por una serie de razones, incluyendo pero sin limitación, alteraciones que modifican el procesamiento y/o la expresión del producto de expresión de la misma. A modo de ejemplo adicional, la NOI puede modificarse también para optimizar la expresión en una célula hospedadora particular. Pueden desearse otros cambios de secuencia para introducir sitios de reconocimiento de enzimas de restricción.

La NOI puede incluir en ella nucleótidos sintéticos o modificados, tales como esqueletos de metilfosfonato y fosforotioato.

35 La NOI puede modificarse para aumentar la estabilidad intracelular y la vida media. Las posibles modificaciones incluyen, pero sin limitación, la adición de secuencias flanqueantes de los extremos 5' y/o 3' de la molécula o el uso de ligamientos de fosforotioato o 2' O-metilo en lugar de fosfodiesterasa en el esqueleto de la molécula.

Producción/aplicación a gran escala

40 En una realización preferida de la presente memoria descriptiva, se usa la enzima lipolítica para aplicaciones a gran escala y/o se produce a gran escala.

El término gran escala significa en un fermentador o condiciones de cultivo de al menos 1000 litros.

45 Preferiblemente, la enzima lipolítica se produce en una cantidad de al menos 5 g por litro de volumen de cultivo celular total después del cultivo del organismo hospedador. Preferiblemente, la enzima lipolítica se produce en una cantidad de al menos 10 g por litro de volumen de cultivo celular total después del cultivo del organismo hospedador. Preferiblemente, se produce la enzima lipolítica en una cantidad de al menos 15 g por litro del volumen de cultivo celular total después del cultivo del organismo hospedador. Preferiblemente, se produce la enzima lipolítica en una cantidad de al menos 20 g por litro del volumen de cultivo celular total después del cultivo del organismo hospedador.

Fermentación

50 Las enzimas de la presente invención puede producirse por cultivo sólido o sumergido, incluyendo procesos por lotes, de flujo semicontinuo y continuo. El cultivo se logra en un medio de crecimiento que comprende un medio

acuoso de sales minerales, factores de crecimiento orgánicos, material fuente de carbono y energía, oxígeno molecular y, por supuesto, un inóculo de partida de una o más especies de microorganismos particulares para emplear.

5 Además de la fuente de carbono y energía, oxígeno, nitrógeno asimilable y un inóculo del microorganismo, es necesario suministrar cantidades adecuadas en proporciones apropiadas de nutrientes minerales para asegurar un crecimiento apropiado del microorganismo, maximizar la asimilación de la fuente de carbono y energía por las células en el proceso de conversión microbiana y conseguir los rendimientos celulares máximos con la densidad celular máxima en los medios de fermentación.

10 La composición del medio mineral acuoso puede variar en un amplio intervalo, dependiendo en parte del microorganismo y del sustrato empleado, como es conocido en la materia. Los medios minerales deberían incluir, además de nitrógeno, cantidades adecuadas de fósforo, magnesio, calcio, potasio, azufre y sodio, en formas iónicas y combinadas asimilables solubles adecuadas, y también deberían estar preferiblemente presentes ciertos elementos traza tales como cobre, manganeso, molibdeno, cinc, hierro, boro y yodo, y otros, de nuevo en forma asimilable soluble adecuada, todo como es conocido en la materia.

15 La reacción de fermentación es un proceso aeróbico en que se suministra el oxígeno molecular por un gas que contiene oxígeno tal como aire, aire enriquecido con oxígeno o incluso oxígeno molecular sustancialmente puro, a condición de que mantenga los contenidos del recipiente de fermentación con una presión parcial de oxígeno adecuada para ayudar a la especie de microorganismo a crecer de forma floreciente. En efecto, al usar un sustrato hidrocarburo oxigenado, se reduce el requisito de oxígeno para el crecimiento del microorganismo. No obstante, debe suministrarse oxígeno molecular para el crecimiento, puesto que la asimilación del sustrato y el correspondiente crecimiento de los microorganismos es, en parte, un proceso de combustión.

20 Aunque la velocidad de aireación puede variar en un intervalo considerable, la aireación se realiza generalmente a una velocidad que está en el intervalo de aproximadamente 0,5 a 10, preferiblemente de aproximadamente 0,5 a 7 volúmenes (a la presión empleada y a 25°C) de gas que contiene oxígeno por volumen de líquido en el fermentador por minuto. Esta cantidad está basada en el aire de contenido de oxígeno normal que se suministra al reactor, y en términos de oxígeno puro, los intervalos respectivos serían de aproximadamente 0,1 a 1,7, o preferiblemente de aproximadamente 0,1 a 1,3, volúmenes (a la presión empleada y a 25°C) de oxígeno por volumen de líquido en el fermentador por minuto.

30 La presión empleada para el proceso de conversión microbiana puede oscilar ampliamente. Las presiones están generalmente dentro del intervalo de aproximadamente 0 a 345 kPa (de aproximadamente 0 a 50 psig), actualmente preferiblemente de aproximadamente 0 a 207 kPa (de aproximadamente 0 a 30 psig), más preferiblemente ligeramente por encima de la presión atmosférica, para conseguir un equilibrio del coste de equipos y operativo frente a la solubilidad del oxígeno. Son ventajosas presiones mayores que la atmosférica porque dichas presiones no tienden a aumentar la concentración de oxígeno disuelto en el fermento acuoso, lo que su vez puede ayudar a aumentar las velocidades de crecimiento celular. Al mismo tiempo, esto se equilibra por el hecho de que las altas presiones atmosféricas aumentan los costes de equipos y operativos.

35 La temperatura de fermentación puede variar algo, pero para hongos filamentosos tales como *Trichoderma reesei*, la temperatura estará generalmente dentro del intervalo de aproximadamente 20 a 40°C, generalmente preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 25 a 34°C, dependiendo de la cepa de microorganismo elegida.

40 Los microorganismos requieren también una fuente de nitrógeno asimilable. La fuente de nitrógeno asimilable puede ser cualquier compuesto o compuestos que contienen nitrógeno capaz de liberar nitrógeno en una forma adecuada para utilización metabólica por el microorganismo. Aunque pueden emplearse una variedad de compuestos fuente de nitrógeno orgánico, tales como hidrolizados de proteína, habitualmente pueden utilizarse compuestos que contienen nitrógeno baratos tales como amoniaco, hidróxido de amonio, urea y diversas sales de amonio tales como fosfato de amonio, sulfato de amonio, pirofosfato de amonio, cloruro de amonio o diversos otros compuestos de amonio. El amoniaco gas mismo es conveniente para operaciones a gran escala, y puede emplearse burbujeando a través del fermento acuoso (medio de fermentación) en cantidades adecuadas. Al mismo tiempo, dicho amoniaco puede emplearse también para ayudar al control del pH.

50 El intervalo de pH en el fermento microbiano acuoso (mezcla de fermentación) debería estar en el intervalo ejemplar de aproximadamente 2,0 a 8,0. Con hongos filamentosos, el pH está normalmente en el intervalo de aproximadamente 2,5 a 8,0; con *Trichoderma reesei*, el pH está normalmente en el intervalo de aproximadamente 3,0 a 7,0. Las preferencias de pH para ciertos microorganismos dependen de los medios empleados en cierta medida, así como del microorganismo particular, y por tanto cambian algo con el cambio de medios, como puede determinarse fácilmente por los especialistas en la materia.

55 Aunque el tiempo medio de retención de la mezcla de fermentación en el fermentador puede variar considerablemente, dependiendo en parte de la temperatura de fermentación y el cultivo empleado, generalmente estará en el intervalo de aproximadamente 24 a 500 horas, preferiblemente actualmente de aproximadamente 24 a 400 horas. Preferiblemente, la fermentación se realiza de tal manera que el sustrato que contiene carbono pueda

controlarse como factor limitante, proporcionando así una buena conversión del sustrato que contiene carbono en células y evitando la contaminación de las células con una cantidad sustancial de sustrato no convertido. Esto último no es un problema con sustratos hidrosolubles, puesto que se desprende fácilmente por lavado cualquier traza restante. Sin embargo, puede ser un problema en el caso de sustratos no hidrosolubles, y requiere etapas de
 5 tratamiento de producto añadidas tales como etapas de lavado adecuadas. Como se describe anteriormente, el tiempo para alcanzar este nivel no es crítico y puede variar con el microorganismo y el proceso de fermentación particular que se realicen. Sin embargo, es bien conocido en la materia cómo determinar la concentración de fuente de carbono en el medio de fermentación y si se ha conseguido o no el nivel deseado de fuente de carbono.

Aunque la fermentación puede realizarse como una operación en lotes o continua, es mucho más preferida la
 10 operación semicontinua por la facilidad de control, producción de cantidades uniformes de productos y usos más económicos de todos los equipos. Si se desea, pueden añadirse parte o todo el material fuente de carbono y energía y/o parte de la fuente de nitrógeno asimilable tal como amoníaco al medio mineral acuoso antes de alimentar el medio mineral acuoso al fermentador. Cada una de las corrientes introducidas en el reactor se controla preferiblemente a una velocidad predeterminada, o en respuesta a una necesidad determinable monitorizando tales
 15 como concentración de sustrato de carbono y energía, pH, oxígeno disuelto, oxígeno o dióxido de carbono en los gases de salida del fermentador, densidad celular mensurable por transmitancia de luz o similares. Las velocidades de alimentación de los diversos materiales pueden variarse de modo que se obtenga una velocidad de crecimiento celular lo más rápido posible, consistente con una utilización eficaz de la fuente de carbono y energía, para obtener el rendimiento de células de microorganismos mayor posible respecto a la carga de sustrato.

En la operación por lotes o la semicontinua preferida, todos de equipo, reactor o medio de fermentación, recipiente o
 20 envase, conducciones, dispositivos de circulación o enfriamiento auxiliares y similares se esterilizan inicialmente, habitualmente empleando vapor tal como a aproximadamente 121°C durante al menos aproximadamente 15 minutos. Se inocula entonces en el reactor esterilizado un cultivo del microorganismo seleccionado en presencia de todos los nutrientes requeridos, incluyendo oxígeno y el sustrato que contiene carbono. El tipo de fermentador empleado no es crítico, aunque se prefiere actualmente la operación con Biolafitte de 15 l (Saint-Germain-en-Laye,
 25 Francia)

La recogida y purificación de las enzimas de la presente invención del caldo de fermentación puede hacerse también mediante procedimientos conocidos *per se* en la materia. El caldo de fermentación contendrá generalmente
 30 desechos celulares, incluyendo células, diversos sólidos suspendidos y otros contaminantes de biomasa, así como el producto enzimático deseado de la presente invención, que se retiran preferiblemente del caldo de fermentación por medios conocidos en la materia. Los procesos adecuados para dicha retirada incluyen técnicas de separación sólido-líquido convencionales tales como, p.ej., centrifugación, filtración, diálisis, microfiltración, filtración en rotavapor u otros procesos conocidos, produciendo un filtrado exento de células. Puede ser preferible concentrar además el caldo de fermentación o el filtrado exento de células usando técnicas tales como ultrafiltración,
 35 evaporación o precipitación. La precipitación de los componentes proteicos del sobrenadante o filtrado puede lograrse mediante una sal, p.ej. sulfato de amonio. Puede conseguirse opcionalmente una purificación adicional mediante cristalización o mediante una variedad de procedimientos cromatográficos, p.ej. cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad o procedimientos reconocidos en la materia similares.

La lipasa puede formularse además antes del uso en comestibles. La lipasa puede estar en una formulación líquida,
 40 secada o granulada.

En una realización, puede usarse un portador, preferiblemente el portador es trigo o un componente de trigo.

En una realización, la lipasa se seca sobre trigo o se seca sobre uno o más componentes de trigo.

En una realización, la lipasa es una formulación líquida adecuada para consumo, preferiblemente dicha composición líquida contiene tampón, sales, sorbitol y/o glicerol.

45 En una realización, la lipasa se granula o cogramula con otras enzimas.

Alimento

La enzima de la presente invención puede usarse como, o en la preparación de, un alimento. Aquí, el término "alimento" significa alimento pretendido para consumo humano. También el término "comestible" significa un comestible pretendido para consumo humano.

50 El alimento puede estar en forma de una solución o un sólido, dependiendo del uso y/o del modo de aplicación y/o del modo de administración.

Cuando se usa como, o en la preparación de, un alimento, tal como un alimento funcional, la enzima de la presente invención puede usarse junto con uno o más de: un portador nutricionalmente aceptable, un diluyente nutricionalmente aceptable, un excipiente nutricionalmente aceptable, un coadyuvante nutricionalmente aceptable y
 55 un ingrediente nutricionalmente activo.

Ingrediente alimentario

La enzima de la presente invención puede usarse como un ingrediente alimentario y/o puede estar comprendida en una composición de aditivo alimentario para seres humanos.

5 Como se usa en la presente memoria, el término “ingrediente alimentario” incluye una formulación que es o puede añadirse a comidas o comestibles funcionales como suplemento nutricional y/o suplemento de fibra.

El ingrediente alimentario puede estar en forma de una solución o un sólido, dependiendo del uso y/o dependiendo del modo de aplicación y/o del modo de administración.

Suplementos alimentarios

10 La composición de la presente invención puede ser, o puede añadirse a, suplementos alimentarios para seres humanos.

Alimentos funcionales

La composición de la presente invención puede ser, o puede añadirse a, alimentos funcionales para seres humanos.

15 Como se usa en la presente memoria, el término “alimento funcional” significa un alimento que es capaz de proporcionar no solo un efecto nutritivo y/o una satisfacción gustativa a un ser humano, sino que es también capaz de suministrar un efecto beneficioso adicional al consumidor

Por consiguiente, los alimentos funcionales son habitualmente alimentos que tienen componentes o ingredientes (tales como los descritos en la presente memoria) incorporados a ellos que confieren al alimento un beneficio funcional específico, p.ej. médico o fisiológico, distinto de un efecto puramente nutritivo a un ser humano.

20 Aunque no existe una definición legal de alimento funcional, la mayoría de partes con interés en esta área coinciden en que son alimentos comercializados por tener efectos saludables específicos.

Algunos alimentos funcionales son nutracéuticos. Aquí, el término “nutracéutico” significa un alimento que es capaz de proporcionar no solo un efecto nutricional y/o una satisfacción gustativa, sino que es también capaz de suministrar un efecto terapéutico (u otro beneficioso) al consumidor. Los nutracéuticos cruzan las líneas divisorias tradicionales entre alimentos y medicinas.

25 Las encuestas han sugerido que los consumidores hacen más hincapié en las afirmaciones de alimentos funcionales relativas a la enfermedad cardíaca. Prevenir el cáncer es otro aspecto de la nutrición que interesa muchísimo a los consumidores, pero de forma interesante es el área sobre la que los consumidores sienten que ejercen menos control. De hecho, según la Organización Mundial de la Salud, al menos un 35% de los casos de cáncer están relacionados con la dieta. Además, las afirmaciones relativas a la osteoporosis, salud intestinal y efectos sobre la
30 obesidad son también factores clave que es probable que inciten a la adquisición de alimentos funcionales e impulsen el desarrollo del mercado.

Productos alimentarios

35 La composición de la presente invención puede usarse en la preparación de productos alimentarios para seres humanos tales como uno o más de: mermeladas, mermeladas cítricas, jaleas, productos lácteos (tales como leche o queso), productos cárnicos, productos avícolas, productos del pescado y productos de repostería.

40 A modo de ejemplo, la enzima de la presente invención puede usarse como ingrediente de refrescos, zumo de frutas o una bebida que comprende proteína de suero, té medicinal, bebidas de cacao, bebidas de leche y bebidas de bacterias de ácido láctico, yogur y yogur bebible, queso, helado, polos y postres, pastelería, tartas de bizcocho y mezclas para tartas, aperitivos, cereales de desayuno, fideos instantáneos y fideos en vaso, sopas instantáneas y sopas en vaso, alimentos y bebidas equilibrados, edulcorantes, tacos, tortillas, barritas de aperitivo de textura mejorada, barritas de fibra, rellenos de fruta estables al horneado, baño para tartas, relleno de repostería de chocolate, relleno aromatizado de tarta de queso, relleno de tarta aromatizado con fruta, glaseado de tarta y rosquillas, relleno de repostería termoestable, cremas de relleno de repostería instantáneas, relleno para galletas, relleno de repostería listo para usar, relleno bajo en calorías, bebida nutritiva para adultos, bebida/zumo de soja
45 acidificado, bebida de chocolate aséptica/destilada, cócteles, bebidas en polvo, leche de soja/clásica con chocolate enriquecida con calcio, bebida de café enriquecida con calcio.

50 Una enzima según la presente invención puede usarse además como ingrediente en productos alimentarios tales como salsa de queso americana, agente antiapelmazante para queso rallado y desmenuzado, salsa para mojar patatas fritas, queso en crema, crema agria desnatada de cobertura batida mezclada en seco, crema batida láctea congelada/descongelada, cobertura batida estable a la congelación/descongelación, queso cheddar natural bajo en grasas y ligero, yogur de estilo suizo bajo en grasas, postres congelados gasificados y barritas de golosinas, helado duro, helado duro de etiquetado comprensible, economía y gratificación mejoradas, helado bajo en grasas: helado suave, salsa de barbacoa, salsa de queso para mojar, aderezo de requesón, salsa Alfredo de mezcla seca, salsa de

queso de mezcla, salsa de tomate de mezcla seca y otros.

Para ciertos aspectos, preferiblemente el comestible es una bebida.

Para ciertos aspectos, preferiblemente el comestible es un producto de repostería, tal como pan, pastas danesas, bizcochos o galletas.

5 Pienso

La enzima de la presente invención puede usarse como, o en la preparación de, un pienso animal o un componente de mismo. Por tanto, la presente memoria descriptiva comprende también un pienso que comprende o está compuesto por la enzima de la presente invención, y un proceso para elaborar el mismo.

Detergente

- 10 La enzima de la presente invención puede usarse como, o en la preparación de, un detergente o un componente de mismo. Por tanto, la presente memoria descriptiva engloba también un detergente que comprende o está compuesto por la enzima de la presente invención, y un proceso para elaborar el mismo

Técnicas generales de metodología de adn recombinante

- 15 La presente invención emplea, a menos que se indique otra cosa, técnicas convencionales de química, biología molecular, microbiología, ADN recombinante e inmunología que están dentro de las capacidades de un especialista en la materia. Dichas técnicas se explican en la bibliografía. Véanse, por ejemplo, J. Sambrook, E. F. Fritsch y T. Maniatis, 1989, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2ª edición, libros 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Ausubel, F. M. *et al.* (1995 y suplementos periódicos; "Current Protocols in Molecular Biology", cap. 9, 13 y 16, John Wiley & Sons, Nueva York, N.Y.); B. Roe, J. Crabtree, y A. Kahn, 1996, "DNA Isolation and Sequencing: Essential Techniques", John Wiley & Sons; M. J. Gait (Editor), 1984, "Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach", Irl Press y D. M. J. Lilley y J. E. Dahlberg, 1992, "Methods of Enzymology: DNA Structure Part A: Synthesis and Physical Analysis of DNA Methods in Enzymology", Academic Press.
- 20

La invención se describirá ahora, solo a modo de ejemplo, con referencia a las siguientes Figuras y Ejemplos.

Breve descripción de las figuras

- 25 La presente invención se ilustra además por referencia a las figuras adjuntas, en que:

La Figura 1 muestra un modelo de las modificaciones traduccionales predichas en una enzima lipolítica (a la que a veces se hace referencia en la presente memoria como "lipasa 3") y mostrada en la presente memoria como SEQ ID NO 2; los residuos de sitio activo se muestran en un círculo, véanse Ser146, Asp201 y His258; hay 7 residuos de cisteína y 4 están implicados en puentes disulfuro, mostrados como una línea de puntos y como una línea sólida sobre los residuos, hay 2 sitios para glicosilación N-ligada, a saber N32 y N242, que se muestran en negrita y están subrayados (el último, a saber N242, está cerca del sitio activo de His). NOTA: la numeración en esta Figura se refiere a la enzima lipolítica mostrada como SEQ ID NO. 2 sin el péptido señal de 27 aminoácidos, por lo tanto, cuando se hace referencia a la enzima lipolítica mostrada en la SEQ ID NO. 1 (concretamente, con el péptido señal), la numeración con respecto a los residuos de sitio activo tiene que ajustarse añadiendo 27 aminoácidos.

30

- 35 La Figura 2 muestra un esquema del método de la presente invención.

La Figura 3 muestra un diagrama esquemático del ADN genómico de la enzima lipolítica de *Aspergillus tubingensis*.

La Figura 4 muestra el constructo de expresión "ATlipase3Trex".

La Figura 5 muestra los resultados de un ensayo de actividad de lipasa efectuado en sobrenadante de transformantes de *Trichoderma reesei*.

- 40 La Figura 6 muestra un perfil proteico por PAGE-SDS efectuado sobre sobrenadante de transformantes de *Trichoderma reesei*. El carril indicado con una flecha muestra uno de los transformantes que expresa muy altos niveles de la enzima lipolítica ("lipasa 3").

La Figura 7 muestra un perfil proteico por PAGE-SDS de sobrenadante de transformantes de *Trichoderma reesei* cultivados en un fermentador de 3 litros. La flecha indica la banda de proteína enzima lipolítica ("lipasa 3").

- 45 La Figura 8 muestra el rendimiento de la proteína enzima lipolítica (lipasa 3) en el caldo de fermentación cuando se expresa la enzima lipolítica en diferentes hospedadores de expresión. El rendimiento se expresa como % de aumento de rendimiento en cada organismo:

1 *Aspergillus tubingensis*;

2 *Pichia pastoris*;

3 *Hansenula polymorpha*;

4 *Trichoderma reesei*.

La Figura 9 muestra una transferencia Southern que muestra cepas de *T. reesei* transformadas que se habían transformado con múltiples copias del gen de la enzima lipolítica "lipasa 3", los carriles se marcan como sigue:

- 5 M – cepa hospedadora no transformada,
 B – cepa transformada usando transformación biológica;
 E – cepa transformada usando electroporación.

10 La Figura 10 muestra un perfil proteico por PAGE-SDS usado para caracterizar la enzima lipolítica ("lipasa 3") expresada en *Trichoderma reesei*. Las muestras de cultivos crecidos en diferentes caldos mostraron proteína lipasa 3 como bandas dobles o triples.

La Figura 11a muestra dos UFC (concentrados de ultrafiltración) diferentes que muestran la precipitación de la enzima lipolítica "lipasa 3". La proteína menos concentrada en el UFC 1035 muestra una gran precipitación y la proteína más concentrada en el UFC 1036 muestra una precipitación muy grande. La precipitación es dependiente de la concentración, cuanto mayor es la concentración de proteína, es más probable que precipite.

15 La Figura 11b muestra una PAGE-SDS que muestra la presencia de la proteína enzima lipolítica "lipasa 3" en los precipitados de la Figura 11a:

Carril 1 – sobrenadante bruto filtrado centrifugado

Carril 2 – sedimento resolubilizado del UFC 1035

Carril 3 – sedimento resolubilizado del UFC 1036

20 La Figura 12 muestra la resolubilización de la enzima lipolítica precipitada ("lipasa 3") usando diferentes concentraciones de tampón fosfato de sodio. Las muestras estaban a pH 5,30.

Carril 1. Control bruto.

Carriles 2-6. Fosfato de sodio 5 mM, 10 mM, 20 mM, 40 mM y 50 mM.

25 La Figura 13 muestra la caracterización de la enzima lipolítica recombinante "lipasa 3" por análisis de MALDI-TOF/MS de lipasa glicosilada en comparación con desglicosilada. El tamaño del N-glicano es de aproximadamente 1384 Da y las moléculas de enzima lipolítica (lipasa 3) pueden tener glicanos enlazados en el sitio N32 (cuando se considera la SEQ ID NO.2).

30 La Figura 14 muestra un análisis de proteína por PAGE-SDS de enzima lipolítica (lipasa 3) purificada sometida a desglicosilación. Enzima de desglicosilación: Endo-H, 20 mg/ml. Se añadió Endo-H a una relación de 1:50 y 1:100 (p/p) y se incubó durante 20 horas a temperatura ambiente, pH 5,5.

Carril 1 - Control

Carril 2 – dilución 1:100 del sobrenadante

Carril 3 – dilución 1:50 del sobrenadante

35 Se muestran las actividades específicas en la tabla 1 siguiente. La glicosilación N-ligada no tiene efecto sobre la actividad específica de la proteína enzima lipolítica (lipasa 3). La desglicosilación de la enzima lipolítica (lipasa 3) no afectaba a la actividad enzimática.

La Figura 15 muestra la secuencia aminoacídica (SEQ ID NO. 1) de una enzima lipolítica de *Aspergillus tubingensis*, en la que el péptido señal endógeno se muestra en negrita.

40 La Figura 16 muestra la secuencia aminoacídica (SEQ ID NO. 2) de una enzima lipolítica de *Aspergillus tubingensis* que es la misma que la SEQ ID No 1, excepto porque se ha retirado el péptido señal endógeno.

La Figura 17 muestra la secuencia nucleotídica que codifica una enzima lipolítica de *Aspergillus tubingensis* (como se muestra en la SEQ ID NO. 1) incluyendo la secuencia señal, la secuencia nucleotídica es una secuencia de ADN genómico (y se ha designado como SEQ ID NO. 3). La secuencia señal se muestra en negrita y los intrones se muestran en minúsculas.

45 La Figura 18 muestra la secuencia nucleotídica que codifica una enzima lipolítica de *Aspergillus tubingensis* (como se muestra en la SEQ ID No 2) que no incluye la secuencia señal, la secuencia nucleotídica es una secuencia de

ADN genómico (y se ha designado como SEQ ID NO. 4). Los intrones se muestran en minúsculas.

La Figura 19 muestra la secuencia del promotor de gen de celobiohidrolasa 1 (*cbh1*) designada SEQ ID NO. 5.

Ejemplo 1

Expresión de la Lipasa 3 de *Aspergillus tubingensis* en *Trichoderma reesei*

5 1. Constructo de expresión y cepa usados para transformación

Se usó ADN del plásmido pDONR™221 obtenido de Invitrogen (nº de catálogo 12536-017) como vector donante. Se recombinó pDONR221::lip 3 que contiene ADN genómico de lipasa 3 de *Aspergillus tubingensis* (Figura 3) en el vector de destino Gateway de *T. reesei* pTrex3G (descrito con detalle en el documento WO 05/001036), dando como resultado el constructo de expresión final ATlipase3Trex (Figura 4).

- 10 El módulo de expresión contenía las regiones promotora y terminadora del gen de celobiohidrolasa 1 (*cbh1*) de *T. reesei*. Contenía también el gen *amdS* de acetamidasa de *Aspergillus nidulans* como marcador seleccionable para la transformación de *T. reesei*.

El ADN genómico de lipasa 3 de *Aspergillus tubingensis* codifica una enzima lipolítica lipasa 3 que tiene la secuencia aminoacídica mostrada en la SEQ ID NO. 1.

- 15 El término "lipasa 3", cuando se usa en la presente memoria, hace referencia a una enzima lipolítica que comprende la secuencia aminoacídica mostrada en la SEQ ID NO. 2, tal como la secuencia aminoacídica mostrada en la SEQ ID NO. 1. La SEQ. ID NO. 1 contiene la sec. señal y la SEQ. ID No 2 es la proteína lipasa madura sin la secuencia señal.

- 20 La cepa usada para transformación era de *Trichoderma reesei*, un derivado de la cepa RL-P37 no GMM del que se han eliminado los genes que codifican las dos celobiohidrolasas secretadas, CBHI y CBHII, y dos de las endoglucanasas secretadas, EGI y EGII.

El vector de expresión pTrex3g.

A continuación, se describe la construcción del vector pTrex3g que puede usarse para expresar los genes de la presente invención.

- 25 Este vector está basado en el vector pSL1180 de *E. coli* (Pharmacia Inc., Piscataway, NJ, EE.UU.) que es un vector basado en el fagémido pUC118 (Brosius, J. (1989) *DNA* 8: 759) con un sitio de clonación múltiple extendido que contiene 64 secuencias de reconocimiento de enzimas de restricción hexaméricas. Se diseñó como vector de destino Gateway (Hartley, J.L., Temple, G.F. y Brasch, M.A. (2000) *Genome Research* 10:1788-1795) para permitir la inserción usando la tecnología Gateway (Invitrogen) de cualquier marco abierto de lectura deseado entre las regiones promotora y terminadora del gen *cbh1* de *T. reesei*. Contiene también el gen *amdS* de *Aspergillus nidulans*
- 30 para uso como marcador seleccionable en la transformación de *T. reesei*.

Los detalles de pTrex3g son como siguen. El vector es de 10,3 kb de tamaño.

Están insertados en la región de poliligador de pSL1180 los siguientes segmentos de ADN:

1. un segmento de ADN de 2,2 pb de la región promotora del gen *cbh1* de *T. reesei*;
- 35 2. el módulo de marco lectura Gateway A de 1,7 kb adquirido en Invitrogen que incluye los sitios de recombinación attRI y attR2 en cualquier extremo flanqueante del gen de resistencia a cloranfenicol (CmR) y el gen *ccdB*;
3. un segmento de ADN de 336 pb de la región terminadora del gen *cbh1* de *T. reesei*;
- 40 4. un segmento de ADN de 2,7 kb que contiene el gen *amdS* de *Aspergillus nidulans* con sus regiones promotora y terminadora nativas.

2. Transformación de la Cepa Hospedadora de *T. reesei* con cuádruple delección

- Se transformó el constructo de expresión ATlipase3Trex, que contiene el gen de lipasa 3 de *A. tubingensis*, en una cepa de *T. reesei* usando electroporación o transformación biolística por bombardeo de partículas usando el sistema PDS-1000 Helium (BioRad nº de cat. 165-02257). Se usaron productos de PCR que contienen solo ADN fúngico o todo el plásmido de expresión para generar transformantes por transformación biolística y electroporación.
- 45

A. Transformación por electroporación

Se hizo crecer la cepa hospedadora *T. reesei* para transformar hasta esporulación completa en placas de PDA durante 5 días. Se recolectaron esporas de 2 placas con sorbitol 1,2 M y se filtraron a través de Miracloth para

deshacerse del agar. Se transfirieron las esporas a un tubo Falcon de 50 ml y se lavaron por centrifugación repetida 5-6 veces con 50 ml de agua. Se resuspendieron las esporas en un volumen pequeño (menos de 2x el volumen de sedimento) usando una solución de sorbitol 1,2 M. Se mantuvo entonces la suspensión de esporas en hielo. Se tomaron alícuotas de 90 ul de suspensión de esporas en la cubeta de electroporación (E-shot, cubeta de electroporación estándar de 0,1 cm de Invitrogen). Se añadieron 10-20 ul de constructo de ADN (plásmido de la Figura 4 o producto de PCR) a la suspensión de esporas y se fijó la electroporación a 16 kV/cm, 25 μ F, 50 Ω . Después de la electroporación, se dejó la suspensión de esporas en hielo, se resuspendió en 5 partes de sorbitol 1,0 M y 1 parte de YEPD y se dejó germinar por incubación a 28°C con agitación a 250 rpm durante una noche. El día siguiente, se sembraron los germinantes en placas de agar que contienen acetamida. Se escogieron los transformantes y se transfirieron individualmente a placas de agar y acetamida.

B. Transformación por Bombardeo de Partículas (transformación biolística)

Se preparó una suspensión de esporas de una cepa de *T. reesei* con cuádruple delección. Se dispersaron 200 ul de suspensión de esporas sobre el centro de las placas de acetamida en medio mínimo (MM). (las placas de acetamida en MM tenían la siguiente composición: acetamida 0,6 g/l; CsCl 1,68 g/l; glucosa 20 g/l, KH_2PO_4 20 g/l, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,6 g/l; solución de elementos traza 1000x 1 ml/l; agar Noble 20 g/l y pH 5,5. La solución de elementos traza 1000x contenía $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5,0 g/l; MnSO_4 1,6 g/l; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,4 g/l y $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1,0 g/l. Se dejó secar la suspensión de esporas sobre la superficie de medio MM con acetamida durante 1 hora en campana estéril. La transformación siguió las instrucciones del fabricante. Se dispusieron 60 mg de partículas de wolframio en un tubo de microcentrífuga. Se añadió 1 ml de etanol y se dejó reposar durante 15 segundos. Se retiró el etanol y se lavaron las partículas tres veces con H_2O estéril antes de añadir 250 ul de glicerol estéril al 50% (v/v). Se dispusieron 25 ul de suspensión de partículas de wolframio en un tubo de microcentrífuga. Mientras se agitaba continuamente con vórtex, se añadió lo siguiente: 5 ul (100-200 ng/ul) de ADN de plásmido, 25 ul de CaCl_2 2,5 M y 10 ul de espermidina 0,1 M. Se centrifugaron las partículas durante 3 segundos. Se retiró el sobrenadante y se lavaron las partículas con 200 ul de etanol al 100% y se centrifugaron durante 3 segundos. Se retiró el sobrenadante. Se añadieron 24 ul de etanol al 100% y se mezclaron por pipeteo, se retiraron entonces alícuotas de 8 ul de partículas y se dispusieron en el centro de discos microportadores que se mantuvieron en un desecador. Una vez se secó la solución de wolframio/ADN, se dispuso el disco microportador en la cámara de bombardeo junto con la placa de MM con acetamida con esporas y se llevó a cabo el proceso de bombardeo según las instrucciones del fabricante. Después del bombardeo de las esporas en placa con las partículas de wolframio-ADN, se incubaron las placas a 28°C. Se transfirieron las colonias transformadas a placas recientes de medio MM con acetamida y se incubaron a 28°C.

3. Crecimiento de transformantes en placas de microvaloración

Después de 5 días de crecimiento en placas de MM con acetamida, se inocularon transformantes obtenidos por electroporación o por transformación biolística y que exhiben una morfología estable en 200 ul de medio definido con glucosa/soforosa en placas de microvaloración de 96 pocillos. El medio definido con glucosa/soforosa (por litro) consiste en 5 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 33 g de tampón PIPPS, 9 g de casaminoácidos, 4,5 g de KH_2PO_4 , 1 g de CaCl_2 (anhidro), 1 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, pH 5,50 ajustado con NaOH al 50% con H_2O milli-Q llevado a 966,5 ml. Después de la esterilización, se añadió lo siguiente: 5 ml de Mazu, 26 ml de glucosa/soforosa al 60% y 2,5 ml de 400X metales traza de *T. reesei*. Se incubó la placa de microvaloración en una cámara de crecimiento con oxígeno a 28°C durante 5 días.

40 Ejemplo 2

Verificación por ensayo a la gota y PAGE-SDS de Lipasa

Se retiró el micelio por centrifugación y se analizó en el sobrenadante la actividad lipasa usando el ensayo a la gota. El ensayo de placa de lipasa está basado en la liberación de ácido graso del sustrato (tributirina) en presencia de lipasa. Se forma un color rosa cuando se libera el ácido graso y forma un complejo con rodamina B. La placa de ensayo contenía 2,0 g de Bacto Agar (disuelto calentando durante 5 minutos en 100 ml de tampón fosfato de sodio 50 mM pH 5,5). Se mantuvo la solución en baño de agua a 70°C y se añadieron con agitación 0,5 ml de rodamina al 2% y 40 ml de tributirina. Se sometió la mezcla a sonicación durante 2 minutos y se vertieron 10-15 ml en placas Petri. Se perforaron orificios y se aplicó el sobrenadante de cultivo a los orificios. Se incubaron las placas a 37°C hasta que se formó un color rosa indicativo de la presencia de actividad lipolítica. Se comprobó en el sobrenadante (10 ul) de los transformantes la actividad lipasa usando el ensayo a la gota mostrado en la Figura 5, las flechas indican la aparición del color rosa después de 30 minutos de incubación a 37°C, mostrando una alta actividad lipasa.

Se determinó el perfil proteico de aquellos transformantes que exhiben alta actividad lipasa por PAGE-SDS usando geles de poliacrilamida NuPAGE al 4-12% y MES como tampón de proceso. Se mezclaron muestras del sobrenadante con un volumen apropiado de 2x tampón de carga de muestra con agente reductor. Se tiñeron los geles con Simply blue Safestain (Invitrogen). En la Figura 6, el carril marcado con una flecha muestra uno de los transformantes que expresa muy altos niveles de lipasa 3 apareciendo como una doble banda. El resto de los transformantes mostraba bandas únicas distintas y ligeramente borrosas. El mejor transformante crecido en fermentador de 3 litros daba una valoración de proteína secretada total de al menos 20 g/litro y el análisis de PAGE-SDS mostraba una amplia banda de lipasa (Figura 7).

Ejemplo 3

Fermentación a gran escala (14 litros) de Transformantes de lipasa 3

5 Se cultivaron transformantes de *Trichoderma reesei* en fermentadores como se describe en el documento WO 2004/035070. Se cultivaron 4 transformantes diferentes, generados por electroporación. La medida de la proteína total y la actividad lipasa en sobrenadantes de cultivo, después de la retirada de las células, indicó que estaban presentes más de 20 gramos por litro de lipasa después de 160 horas de fermentación. Se hicieron crecer también dos cepas, generadas por transformación biolística. Estas mostraban más de 20 gramos por litro de lipasa en el sobrenadante de cultivo después de 160 horas de fermentación. La cantidad de lipasa 3 producida por estos transformantes estaba muy por encima de la cantidad de lipasa 3 producida por otras especies hospedadoras microbianas (Figura 8).

10 Se cultivaron transformantes de *Trichoderma reesei* en fermentadores. Se cultivaron cuatro transformantes diferentes, generados por electroporación. La medida de la proteína total y la actividad lipasa en sobrenadantes de cultivo, después de la retirada de células, indicó que estaban presentes más de 20 gramos por litro de lipasa después de 160 horas de fermentación. Se hicieron crecer también dos cepas, generadas por transformación biolística. Estas mostraban más de 20 gramos por litro de lipasa en el sobrenadante de cultivo después de 160 horas de fermentación. La cantidad de lipasa 3 producida por estos transformantes estaba muy por encima de la cantidad de lipasa 3 producida por otras especies hospedadoras microbianas (Figura 8).

Ejemplo 4

Solubilidad de lipasa 3

20 Sorprendentemente, los presentes inventores han encontrado que *Trichoderma reesei* es capaz de producir lipasa 3 a muy altos niveles. El procesamiento posterior de la lipasa después de la fermentación requiere la concentración del caldo de cultivo 4x por ultrafiltración usando una membrana con un corte de peso molecular de 10.000. La lipasa 3 tiende a la precipitación como se muestra en la Figura 11a. Se observa una alta precipitación en el UFC más concentrado. La presencia de proteína lipasa 3 en los precipitados se confirmó por PAGE-SDS.

25 Las Figuras 11a y 11b muestran que la precipitación de lipasa 3 es dependiente de la concentración.

La Figura 11a muestra dos concentrados de ultrafiltración (UFC) diferentes que muestran precipitación de lipasa 3. El UFC 1035 contiene menos proteína concentrada y muestra una alta precipitación. El UFC 1036 contiene más proteína concentrada y muestra muy alta precipitación.

30 La Figura 11b muestra una PAGE-SDS que muestra la presencia de proteína lipasa 3 en los precipitados mostrados en la Figura 11a.

Carril 1	Sobrenadante bruto filtrado centrifugado
Carril 2	Sedimento resolubilizado del UFC 1035
Carril 3	Sedimento resolubilizado del UFC 1036

35 Para la resolubilización de precipitados de lipasa, se usó tampón concentrado. El tampón concentrado consiste en tampón fosfato de sodio 1,0 M, pH 8,0, Na₂HPO₄·2H₂O (177,99 g) añadido a 900 ml de agua DI. Se añadieron a muestras de 10,0 g de lipasa 3 bruta del UFC 1036, a pH 4,44 50, 100, 200, 400 y 500 µl de solución tampón concentrada a una concentración final de fosfato de sodio 5, 10, 20, 40 y 50 mM, respectivamente, se mezclaron todos los viales y se dejaron a temperatura ambiente durante unos pocos minutos.

Como se muestra en la Figura 12, la adición de fosfato de sodio a más de 40 mM llevó a la lipasa 3 precipitada a solución. La solución resultante era transparente y exenta de cualquier material sólido. El pH de las muestras se midió a pH 5,3 (a una concentración de Na-P 50 mM).

Ejemplo 5

40 Caracterización de lipasa 3 recombinante por Análisis de MALDI-TOF/MS y digestión proteolítica

45 Se purificó lipasa 3 expresada por *T. reesei* del sobrenadante de cultivo usando una combinación de cromatografía de intercambio y de interacción hidrófoba. Se llevó a cabo la desglucosilación usando endoglicosidasa H en tampón de reacción consistente en citrato de sodio 50 mM, pH 5,5. Se añadió endoglicosidasa H (20 mg/ml) a lipasa 3 a una relación proteica de 1/1000 a 1/100 (p/p). Se efectuó la reacción de desglucosilación a 37°C durante 3 horas. Se puso la muestra de proteína reaccionada en una ZipTip® (columna en fase inversa Micro C₄) (Millipore, Bedford, MA) para limpieza de la muestra antes del análisis de MALDI-TOF/MS. Se efectuó el proceso de limpieza para desalar las muestras. Se usaron al menos 5 ciclos de lavado con solución de lavado consistente en metanol al 5% en TFA al 0,1%/agua. Después, se eluyeron las muestras para espectrometría de masas.

Análisis de MALDI-TOF/MS de proteína intacta

Se preparó la muestra de proteína desalada para análisis de MALDI-TOF/MS mediante crocristalización de un volumen igual (1 µl) de muestra con matriz de ácido sinapínico (saturado con 50% de acetonitrilo, 0,1% de ácido fórmico) usando el método de gota seca. Se obtuvieron los espectros de masas de proteína usando un espectrómetro de masas Voyager DE-STR MALDI-TOF (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.). Los ajustes del instrumento de MS fueron los siguientes para el intervalo de 20000-80000 m/z: modo de operación lineal, modo de extracción retardada, polaridad positiva, voltaje de aceleración de 25 kV, voltaje de rejilla del 93% y tiempo de retardo de la extracción de 750 ns. Se usaron como calibrador externo 300 disparos láser/espectro y BSA.

Cartografía de la digestión proteolítica y el sitio o sitios de N-glicosilación por análisis de LC/MS/MS

Se precipitaron todas las muestras líquidas tratadas con Endo-H con TCA al 10% seguido de reacciones de reducción con DTT 20 mM a 50°C durante 15-20 min. Se efectuó también la reacción de alquilación con yodoacetamida 55 mM. Se dejó proceder la reacción de alquilación en la oscuridad durante 45 min a temp. ambiente. Se efectuaron las digestiones proteolíticas por incubación con diversas proteasas en bicarbonato de amonio 25 mM durante 4 h a 37°C (la relación de enzima a sustrato era de 1:20). La cartografía peptídica llevada a cabo usando 3 digestiones proteolíticas diferentes (tripsina, quimotripsina, endoproteinasa GluC) sobre la lipasa glicosilada confirmó la ausencia de modificación proteica por truncamiento y la presencia de una proteína lipasa intacta con extremos N- y C-terminales auténticos.

La lipasa 3 tiene 2 sitios de N-glicosilación potenciales en N32 y N242. Se llevó a cabo la cartografía peptídica tanto para lipasa 3 (no tratada) como tratada con Endo-H. Para determinar el sitio de N-glicosilación, se adquirieron los datos de MS y MS/MS usando el sistema Surveyor™ LC acoplado con LCQ Advantage o LCQ Deca XP (ThermoFinnigan, San Jose, CA). Se programó el gradiente de HPLC de 0% a 70% de B durante 50 minutos. Disolvente A: TFA al 0,1% en agua y disolvente B: TFA al 0,08% en acetonitrilo. Se efectuó el procesamiento de datos usando TurboSEQUENT y Xcalibur (ThermoFinnigan, San Jose, CA).

Como se muestra en la Figura 13, la PAGE-SDS mostraba que la lipasa recombinante secretada por *Trichoderma* aparecía como una doble banda antes del tratamiento con endoglicosidasa H. El análisis de MALDI-TOF/MS mostraba que la especie de mayor peso molecular era una forma glicosilada de lipasa 3 con un peso molecular de 30.236 Da y la especie de menor peso molecular era una forma desglicosilada con un peso molecular de 29.210 Da. Se generaron muestras de lipasa desglicosilada experimentalmente usando endoglicosidasa H. Los pesos moleculares observados después del tratamiento con endoglicosidasa H eran de 29.035 Da (se supone que es una forma no glicosilada), 29.219 (se supone que es una forma de lipasa 3 con 1 N-acetilglucosamina N-ligada en posición N32 o N242) y 29.422 (se supone que es una forma de lipasa 3 con dos residuos de N-acetilglucosamina enlazados con el esqueleto proteico en posiciones N32 y N242). La cadena de glicano que está presente antes de la desglicosilación con endoglicosidasa H tiene un peso molecular de aproximadamente 1384 Da, con la mayoría de molécula de lipasa teniendo glicano enlazado solo con el sitio N32 (numerado de acuerdo con la SEQ ID NO. 2)

Ejemplo 6

Actividad específica de la enzima lipolítica lipasa 3 producida en *T. Reesei* usando 2 sustratos diferentes

Se sometió la lipasa 3 purificada a desglicosilación por tratamiento con endoglicosidasa H. Se caracterizaron las muestras no tratadas y desglicosiladas mediante la medida de actividades específicas usando sustratos tanto de cadena corta (C4) como de cadena larga (C18).

Como se muestra en la Figura 14 y la Tabla 2, la presencia de cadenas laterales de glicano no tiene efecto sobre la actividad específica de la proteína.

La Tabla 2 muestra los resultados de los experimentos de desglicosilación. La muestra era lipasa 3 de *Trichoderma* purificada y la enzima de desglicosilación era Endo-H.

Muestra	Actividad específica, %	
	LIPU/ml (cadena corta, C4)	LUSol/ml (cadena larga, C18)
Control (carril 1)	100	100
1:100 Endo-H (carril 2)	99,4	103
1:50 Endo-H (carril 3)	97,7	105

Ejemplo 7

45 Análisis de Transferencia Southern

La Figura 9 muestra una transferencia Southern que muestra cepas de *T. reesei* transformadas que se habían

transformado con múltiples copias del gen de la enzima lipolítica “lipasa 3”, los carriles se marcan como sigue.

M – Cepa hospedadora no transformada,

B – cepa transformada usando transformación biolística;

E – cepa transformada usando electroporación.

5 **Ejemplo 8**

Estudios de expresión

Se clonó la lipasa de *Thermomyces lanuginosus* y se expresó en *T. reesei*. Se aislaron los transformantes y se ensayó el mejor productor de lipasa en fermentación a escala de 14 litros para investigar si *Trichoderma reesei* es una cepa hospedadora adecuada para la expresión de otras lipasas. Se estimó que la proteína total al final (200 horas) de la fermentación era de más de 20 g/l como se muestra en la Figura 14. La PAGE-SDS mostró que la lipasa era la proteína dominante producida. La actividad lipasa medida al final de la fermentación era de 30.000 U/ml usando el ensayo de DGGR. Se filtró el caldo y se concentró hasta UFC. A alta concentración, la lipasa parecía precipitar. Se devolvió fácilmente a la solución diluyendo con tampón o sal.

Ejemplo 9

15 Estudios de expresión

La Tabla 3 proporciona los resultados de una serie de estudios de expresión.

Los presentes inventores han encontrado sorprendentemente que la enzima lipolítica “lipasa 3” producida en *Trichoderma reesei* está menos glicosilada (en particular, menos glicosilación N-ligada) en comparación con la misma enzima producida en otros organismos.

20 Tabla 3 Comparación con otros hospedadores usados para expresar lipasa 3 de *Aspergillus tubingensis*

Hospedador de expresión	Glicosilación en los sitios N32 y N242	Calidad de proteína
<i>Aspergillus tubigensis</i> 3M	Hiperglicosilación (sobreglicosilación del 10%) (en ambos sitios N32 y N242)	Actividad reducida
<i>Pichia pastoris</i> GS115	Hiperglicosilación (ambos sitios N32 y N242) con O-glicanos	Actividad > actividad observada con la cepa de lipasa recombinante de <i>A. tubigensis</i>
<i>Hansenula polymorpha</i> RB11	Glicosilación (ambos sitios N32 y N242) con 1% de glicano	Actividad > actividad observada con la cepa de lipasa recombinante de <i>A. tubigensis</i>
<i>T. reesei</i>	Mayoría de N-glicosilación en N32	La actividad es la misma que en la lipasa 3 nativa de la cepa no recombinante de <i>Aspergillus</i> 1M341

Ejemplo 10

Las células hospedadoras de expresión adecuadas para uso en la presente invención pueden ser de una cepa de *T. reesei* en que se han inactivado los genes que codifican celobiohidrolasa I (CBHI, Cel7a), celobiohidrolasa II (CBHII, Cel6a), endoglucanasa I (EGI, Cel7b) y endoglucanasa II (EGII, Cel5a) por delección o desestabilización usando técnicas genéticas moleculares. Esta cepa (una cepa con cuádruple delección) es útil como hospedador para la sobreexpresión de genes que codifican otras proteínas secretadas por *T. reesei*.

Preferiblemente, las células hospedadoras adecuadas para uso en la presente invención pueden derivar de una célula de *Trichoderma reesei* de la cepa RL-P37 usando los métodos descritos en los documentos WO 2005/001036 y US28026376 A1.

30 Una cepa de *T. reesei* adecuada para uso en la presente invención puede derivar de la cepa RL-P37 de *T. reesei* públicamente disponible. La cepa RL-P37 de *T. reesei* puede modificarse formando la cepa 1A52 de *T. reesei* como se describe en el documento WO 05/001036. La cepa 1A52 de *T. reesei* puede modificarse como se describe en el documento US 20080026376 formando una célula de *T. reesei* utilizable en la presente invención.

RL-P37 puede modificarse formando la cepa 1A52 de *T. reesei* como se describe a continuación.

35 La cepa hospedadora de *T. reesei* usada puede derivar de la cepa RL-P37 públicamente disponible, que se ha usado anteriormente para fabricar preparaciones de celulasa comerciales por Genencor International, inc. La

derivación y caracterización de esta cepa se ha publicado anteriormente (Sheir-Neiss, G. y Montencourt, B S. (1984) Appl. Microbiol. Biotechnol. 20.46-53; patente de EE.UU. 4.797.361). Es una cepa mutante sobreproductora de celulasa que se ha obtenido como resultado de varias etapas de mutagénesis a partir de la cepa de tipo silvestre (QM6a).

5 1) Aislamiento de una cepa mutante de *pyr4*.

Para preparar la cepa RL-P37 para transformación con ADN de plásmido, era necesario aislar un derivado que tuviera una mutación nula en el gen *pyr4*.

El gen *pyr4* codifica la 5'-monofosfato de oritidina descarboxilasa, una enzima requerida para la biosíntesis de uridina. Se incorpora el inhibidor tóxico ácido 5-fluoroorótico (FOA) a la uridina por las células de tipo silvestre y por tanto envenena las células. Sin embargo, las células defectivas en el gen *pyr4* son resistentes a este inhibidor, pero requieren uridina para el crecimiento. Por lo tanto, es posible seleccionar cepas mutantes de *pyr4* usando FOA. En la práctica, se dispersaron esporas de la cepa RL-P37 de *T. reesei* sobre la superficie de un medio solidificado que contenía uridina 2 mg/ml y FOA 1,2 mg/ml. Aparecieron colonias resistentes a FOA espontáneas al cabo de 3 a 4 días. Se identificaron los mutantes resistentes a FOA que requerían uridina para el crecimiento. Para identificar aquellos mutantes que tenían específicamente un gen *pyr4* defectivo, se generaron protoplastos y se transformaron con un plásmido que contenía un gen *pyr4* de tipo silvestre (Smith, J.L., Bayliss, F.T. y Ward, M. (1991) Curr. Genet 19: 27-33). Después de la transformación, se sembraron los protoplastos en medio carente de uridina. El crecimiento posterior de colonias transformadas demostró la complementación de un gen *pyr4* defectivo por el gen *pyr4* portado por plásmido. De este modo, se identificó la cepa GC69 como un mutante de *pyr4* de la cepa RL-P37.

20 2) Construcción de un plásmido diseñado para eliminar el gen que codifica CBHI

Se clonó el gen *cbh1*, que codifica la proteína CBHI, a partir del ADN genómico de la cepa RL-P37 mediante hibridación con una sonda oligonucleotídica diseñada basándose en la secuencia publicada para este gen (Shoemaker, S, Schweickart, V., Ladner, M., Gelfand, D., Kwok, S., Myambo, K. e Innis, M. (1983) Biotechnology 1:691-696). El gen *cbh1* reside en un fragmento *PstI* de 6,5 kb y se insertó en el sitio *PstI* de pUC4K (Pharmacia Inc., Piscataway, NJ, EE.UU.) reemplazando al gen de resistencia a kanamicina de este vector. Se cortó entonces el plásmido resultante, pUC4K::*cbh1*, con HindIII, se aisló el fragmento más grande y se religó, dando pUC4K::*cbh1*ΔH/H. Este procedimiento retiró la secuencia de codificación de *cbh1* completa y aproximadamente 1,2 kb de secuencias flanqueantes 5' y 1,5 kb de 3'. Permaneció aproximadamente 1 kb de ADN flanqueante en cada extremo del fragmento *PstI* original. Se clonó el gen *pyr4* de *T. reesei* como un fragmento HindIII de 6,5 kb de ADN genómico en pUCI8, formando pTpyr2 (Smith, J.L., Bayliss, F.T. y Ward, M. (1991) Curr. Genet. 19: 27-33). Se cortó el plásmido pUC4K::*cbh1*ΔH/H con HindIII y se desfosforilaron los extremos con fosfatasa alcalina intestinal de ternero. Se ligó este ADN con el fragmento HindIII de 6,5 kb que contiene el gen *pyr4*, dando pΔCBHI*pyr4*.

La digestión de pΔCBHI*pyr4* con EcoRI liberó un fragmento mayor que consistía en las regiones flanqueantes del locus *cbh1* en cada extremo, con el gen *pyr4* reemplazando a la secuencia de codificación de *cbh1* en el centro. El único ADN de este fragmento que no derivaba de *T. reesei* era un fragmento de 21 pb derivado del sitio de clonación múltiple de pUC4K.

3) Deleción del gen *cbh1* de *T. reesei*.

Se transformaron protoplastos de micelio de la cepa GC69 con plásmido pΔCBHI*pyr4* digerido con EcoRI usando métodos resumidos por Smith *et al.*, 1991. Se obtuvieron transformantes estables y aquellos de los que se había eliminado el gen *cbh1* se identificaron como se describe a continuación.

Se aisló el ADN total de los transformantes, se digirió con *PstI*, se sometió a electroforesis en gel de agarosa y se transfirió a un filtro de membrana. Se hibridó entonces el filtro con pΔCBHI*pyr4* marcado con P³² y se observó el patrón de hibridación por autorradiografía. Esta sonda hibridaba con los genes *cbh1* y *pyr4* nativos en una cepa no transformada. En un transformante (cepa P37PΔCBHI), se observó el patrón de hibridación que se predeciría si ocurriera un evento de integración cruzada doble. Es decir, el gen *cbh1* se había eliminado por integración de una sola copia del fragmento de EcoRI mayor obtenido de pΔCBHI*pyr4* en el locus *cbh1* de la cepa RL-P37.

Se efectuó también el análisis Southern como anteriormente, excepto que la sonda usada era plntCBHI radiomarcado. Este plásmido consistía en un vector pUC que contenía un fragmento BgIII de 2 kb del locus *cbh1* en la región que se eliminó en pUC4K::*cbh1*ΔH/H. Este plásmido hibridaba con el locus *cbh1* de la cepa GC69, pero no hibridaba con ADN de la cepa P37PΔCBHI. Esto confirma que el gen *cbh1* se había eliminado y que el fragmento de ADN de pUC de pΔCBHI*pyr4* no se había incorporado por la cepa con deleción.

El análisis de proteínas secretadas por separación en geles de enfoque isoeléctrico mostró que la proteína CBHI no se producía por la cepa P37PΔCBHI.

4) Generación de un mutante de P37PΔCBHI nulo de *pyr4*.

55 Se dispersaron esporas del transformante (P37PΔCBHI) del que se había eliminado el gen *cbh1* sobre medio que

contenía FOA. Se obtuvo posteriormente un derivado deficiente en *pyr4* de este transformante usando los métodos descritos en la sección anterior. Esta cepa deficiente en *pyr4* se designó P37PΔCBHIPyr⁻26. El análisis Southern mostró que había ocurrido una delección espontánea cuando se seleccionó la cepa P37PΔCBHIPyr⁻26. Esta delección retiraba completamente el gen *pyr4* que se había integrado en el locus *cbh1* de la cepa P37PΔCBHI, así como el ADN flanqueante del locus *cbh1* más allá de la extensión del fragmento *PstI* de 6,5 kb de ADN genómico que se clonó originalmente.

5) Construcción de un vector diseñado para eliminar el gen *cbh2*

El gen *cbh2* de *T.reesei*, que codifica la proteína CBHII, se ha clonado como un fragmento EcoRI de 4,1 kb de ADN genómico (Chen *et al.*, 1987, *Biotechnology* 5: 274-278). Se insertó este fragmento de 4,1 kb entre los sitios EcoRI de pUC4XL. Este último plásmido es un derivado de pUC (construido por R. M. Berka, Genencor International Inc.) que contiene un sitio de clonación múltiple con un patrón simétrico de sitios de endonucleasa de restricción dispuestos en el orden mostrado aquí: EcoRI, BamHI, SacI, SmaI, HindIII, XhoI, BglII, ClaI, BglII, XhoI, HindIII, SmaI, SacI, BamHI, EcoRI. Se construyó el plásmido pΔCBHII, en que se ha retirado una región central de 1,7 kb de este clon de *cbh2*, entre un sitio HindIII (a 74 pb en dirección 3' del sitio de inicio de la traducción de CBHII) y un sitio ClaI (a 265 pb en dirección 3' del último codón de CBHII) y se ha reemplazado por un fragmento de ADN HindIII-ClaI de 1,6 kb que contiene el gen *pyr4* de *T. reesei* obtenido como sigue. Se escindió el gen *pyr4* de *T. reesei* de pTpyr2 en un fragmento NheI-SphI de 1,6 kb y se insertó entre los sitios SphI y XbaI de pUC219 (derivado de pUC119 mediante expansión del sitio de clonación múltiple para incluir los sitios de restricción para BglII, ClaI y XhoI; Wilson *et al.*, 1989, *Gene* 77: 69, 78), creando p219M (Smith *et al.*, 1991, *Curr. Genet.* 19: 27-33). El gen *pyr4* pudo retirarse entonces como un fragmento HindIII-ClaI que tiene 7 pb de ADN en un extremo y 6 pb de ADN en el otro extremo derivado del sitio de clonación múltiple de pUC219 e insertado en los sitios HindIII y ClaI del gen *cbh2*, formando el plásmido pΔCBHII.

La digestión de este plásmido con EcoRI liberó un fragmento que tenía 0,7 kb de ADN flanqueante del locus *cbh2* en un extremo, 1,7 kb de ADN flanqueante del locus *cbh2* en el otro extremo y el gen *pyr4* de *T. reesei* en el medio. El único ADN de este fragmento que no derivaba de *T. reesei* eran los fragmentos de 6 pb y 7 pb del sitio de clonación múltiple de pUC219 en cada extremo del gen *pyr4*.

6) Delección del gen *cbh2* de la cepa P37PΔCBHIPyr⁻26

Se generaron protoplastos de la cepa P37PΔCBHIPyr⁻26 y se transformaron con pΔCBHII digerido con EcoRI según los métodos resumidos en 3 anteriormente. Se cultivaron los transformantes estables en matraces agitados y se examinó la proteína en los sobrenadantes de cultivo por enfoque isoeléctrico. Se identificó un transformante (designado P37PΔΔCBH67) que no producía ninguna proteína CBHII (ni CBHI).

Se extrajo ADN de la cepa P37PΔΔCBH67, se digirió con EcoRI y Asp718, y se sometió a electroforesis en gel de agarosa. Se transfirió el ADN de este gel a un filtro de membrana y se hibridó con pΔCBHII marcado con ³²P. Se observó el fragmento EcoRI de 4,1 kb que contiene el gen *cbh2* de tipo silvestre en el ADN de una cepa de control no transformada. En contraposición, en la cepa P37PΔΔCBH67, se eliminaba la banda única de 4,1 kb y se reemplazaba por dos bandas de aproximadamente 0,9 y 3,1 kb. Este es el patrón esperado si se había integrado una única copia del fragmento de EcoRI mayor de pΔCBHII precisamente en el locus *cbh2* y eliminado el gen *cbh2*.

Se digirieron también las mismas muestras de ADN con EcoRI y se efectuó el análisis Southern como anteriormente. En este ejemplo, la sonda era plntCBHII marcado con ³²P. Este plásmido contiene una porción de la secuencia de codificación del gen *cbh2* de la que se eliminó ese segmento de ADN de *cbh2* en el plásmido pΔCBHII. No se observó hibridación con ADN de la cepa P37PΔCBH67, confirmando que el gen *cbh2* estaba eliminado y que no se había incorporado el fragmento del plásmido pUC de pΔCBHII por esta cepa.

7) Selección de un mutante nulo de *pyr4* de la cepa P37PΔCBH67.

Se dispersaron esporas del transformante (P37PΔΔCBH67), que había eliminado ambos genes *cbh1* y *cbh2*, sobre medio que contenía FOA. Se obtuvo posteriormente un derivado deficiente en *pyr4* de este transformante usando los métodos descritos en la sección 1 anterior. Esta cepa deficiente en *pyr4* se designó P37PΔΔCBH67Pyr⁻1. El análisis Southern mostró que había ocurrido una delección espontánea cuando se seleccionó la cepa P37PΔΔCBH67Pyr⁻1. Esta delección eliminaba completamente el gen *pyr4* que se había integrado en el locus *cbh2* de la cepa P37PΔCBH67, así como el ADN flanqueante del locus *cbh2* más allá de la extensión del fragmento EcoRI de 4,1 kb de ADN genómico que se clonó originalmente. Los fragmentos cortos (6 pb y 7 pb) de ADN derivado del sitio de clonación múltiple de pUC219 que estaban presentes en cualquier extremo del gen *pyr4* se habrían retirado también del genoma por esta delección.

8) Construcción de un plásmido diseñado para desestabilizar el gen *egl2*

Se ha clonado el gen *egl2*, que codifica EGII (al que se hace referencia anteriormente como EGIII por algunos) a partir de *T. reesei* y se publicó la secuencia de ADN (Saloheimo *et al.*, 1988, *Gene* 63: 11-21). Se obtuvo el gen de la cepa RL-P37 como un fragmento *PstI*-*XhoI* de aproximadamente 4 kb de ADN genómico insertado entre los sitios *PstI* y *XhoI* de pUC219. Se insertó el gen *pyr4* de *T. reesei*, presente en un fragmento *Sall* de 2,7 kb de ADN genómico

obtenido a partir de pTpyr2, en un sitio Sall en la secuencia de codificación de EGII, creando el plásmido pEGII::P-1. Esto dio como resultado la desestabilización de la secuencia de codificación de EGII pero sin delección de ninguna secuencia. El plásmido, pEGII::P-1, puede digerirse con HindIII y BamHI, procurando un fragmento lineal de ADN derivado exclusivamente de *T. reesei* excepto por 5 pb en un extremo y 16 pb en el otro extremo, ambos derivados del sitio de clonación múltiple de pUC219.

9) Desestabilización del gen *egl2* de la cepa P37PΔCBH67Pyr⁻¹.

Se transformó la cepa P37PΔΔCBH67Pyr⁻¹ con pEGII::P-1, que se había digerido anteriormente con HindIII y BamHI, y se seleccionaron transformantes estables. Se aisló el ADN total de transformantes y se usó el análisis Southern para identificar las cepas en que se había integrado el fragmento de ADN de plásmido que contenía los genes *pyr4* y *egl2* en el locus *egl2* y consiguientemente desestabilizado la secuencia de codificación de EGII. Se efectuó el análisis Southern usando como sonda un fragmento *PstI* de aproximadamente 4 kb de ADN de *T. reesei* que contenía el gen *egl2*. Cuando se digirió el ADN aislado de la cepa P37PΔ67P⁻¹ con *PstI* para análisis Southern, se visualizó posteriormente el locus *egl2* como una única banda de 4 kb en la autorradiografía. Sin embargo, para un transformante con desestabilización del gen *egl2*, esta banda se perdía y se reemplazaba por dos nuevas bandas como se esperaba. Cuando el ADN se digirió con BglII o EcoRV, el tamaño de la banda correspondiente al gen *egl2* aumentó en tamaño aproximadamente 2,7 kb (el tamaño del fragmento de *pyr4* insertado) entre la cepa P37PΔΔ67P⁻¹ no transformada y el transformante con desestabilización de *egl2*. Este último transformante, con delección ahora de los genes *cbhl*, *cbh2* y *egl2*, se designó como cepa B31. El análisis Southern adicional confirmó que el fragmento de ADN de pUC de pEGII::P-1 no se incorporaba en esta cepa.

10) Selección de un mutante nulo de *pyr4* de la cepa B31.

Se dispersaron esporas del transformante (B31), que tenía delección de los genes *cbhl*, *cbh2* y *egl2*, sobre medio que contenía FOA. Se obtuvo posteriormente un derivado deficiente en *pyr4* de este transformante usando los métodos descritos en la sección 1 anterior. Esta cepa deficiente en *pyr4* se designó B31P6. El análisis Southern mostró que había ocurrido una delección espontánea cuando se seleccionó la cepa B31P6. Esta delección retiraba la mayoría del gen *pyr4* que se había integrado en el locus *egl2* de la cepa B31, pero no se extendía al ADN flanqueante del locus *egl2*.

11) Construcción de un plásmido diseñado para eliminar el gen *egl1*

Se clonó el gen *egl1* de *T. reesei* y se publicó la secuencia de ADN del gen (Penttila *et al.*, 1986, *Gene* 45; 253-263; van Arsdell *et al.*, 1987, *Biotechnology* 5: 60-64). Se obtuvo este gen de la cepa RL-P37 de *T. reesei* como un fragmento HindIII de 4,2 kb de ADN genómico insertado en el sitio HindIII de pUC100 (un derivado de pUC18 con un oligonucleótido insertado en el sitio de clonación múltiple que añade sitios de restricción para *BglII*, *Clal* y *XhoI*), dando pUCEGI. Se retiró un fragmento EcoRV de aproximadamente 1 kb que se extiende desde una posición cercana la mitad de la secuencia de codificación de EGI hasta una posición más allá del extremo 3' de la secuencia de codificación y se reemplazó por un fragmento *ScaI* de 3,5 kb de ADN de *T. reesei* que contenía el gen *pyr4* obtenido a partir de pTpyr2. El plásmido resultante se llamó pPΔEGI

El plásmido pPΔEGI podía digerirse con HindIII, liberando un fragmento de ADN que comprende solo ADN genómico de *T. reesei* que tiene un segmento del gen *egl1* en cada extremo y el gen *pyr4*, que reemplaza a parte de la secuencia de codificación de EGI, en el centro.

12) Delección del gen *eal1* en la cepa B31P6.

Se construyeron dos formas de pPΔEGI que diferían solo en la orientación del gen *pyr4* con respecto a las regiones flanqueantes de *egl1*. Se transformó la cepa B31P6 con una mezcla de ambas formas del plásmido después de digerir con HindIII. Se extrajo el ADN total de transformantes estables, se digirió con HindIII y se sometió a análisis Southern. La sonda usada era pUCEGI radiomarcado. Se observó hibridación con un fragmento de 4,2 kb de ADN de la cepa B31P6 que representa el gen *egl1* no eliminado. Se identificó un transformante (cepa 1A52) en que estos 4,2 kb no estaban ya presentes sino que se habían reemplazado por un fragmento de aproximadamente 6,8 kb. Este es el patrón esperado si el fragmento HindIII mayor de pPΔEGI se había integrado precisamente como se predice en el locus *egl1*, conduciendo a la delección de parte de la secuencia de codificación de EGI y la inserción de *pyr4* en esta posición. Usando un plásmido pUC como sonda para análisis Southern, se confirmó que el fragmento de ADN de pUC de pPΔEGI no se había incorporado a la cepa 1A52

Puede modificarse la cepa 1A52 de *T. reesei* para formar una célula de *T. reesei* utilizable en la presente invención.

Ejemplo 11- Protocolos de ensayo

Ensayo de actividad hidrolizante de triacilglicerol (clasificada como E.C. 3.1.1.3) ensayos de LIPU/LUSol de actividad hidrolizante de Triacilglicerol

Se lleva a cabo la determinación de la actividad lipasa en LIPU mediante la enzimación de una emulsión de tributilglicerol. La hidrólisis enzimática de los lípidos libera ácidos grasos libres. Mediante la valoración continua del

ácido graso libre liberado, se determina la actividad lipasa por el consumo de base. 1 LIPU (unidad lipídica) (también llamada 1 unidad en la presente memoria) se define como la cantidad de enzima que libera 1 μmol de ácido graso libre por minuto en las condiciones de ensayo dadas.

5 Se disolvieron las muestras enzimáticas en agua desmineralizada. El valorante era NaOH 0,05 M. El sustrato era una emulsión homogeneizada de tributirina al 5% (v/v) (Merck, n° de artículo 101958), goma arábiga al 0,10% (p/v) (Sigma, n° de artículo G9752), glicerol al 7,5% (p/v) (Merck, n° de artículo 1.04092), NaCl 51 mM (p.a. Merck, n° de artículo 1.06404), KH_2PO_4 0,50 mM (p.a. Merck, n° de artículo 1.04873). El pH de la reacción era de 5,5 y la temperatura de reacción era de 30°C. Se añadió una muestra de 2,00 ml a 25,0 ml de sustrato aclimatado a la temperatura de reacción. Se calculó la actividad a partir de la pendiente de una curva de valoración lineal que representa el consumo de valorante frente al tiempo de reacción.

Los sustratos usados eran tributirina (Lipu) y aceite de girasol (LUSol).

Ensayo de DGGR de actividad hidrolizante de triacilglicerol

Se usó este ensayo para medir la lipasa de *Thermomyces lanuginosus* expresada en *Trichoderma*.

Los sustratos y tampones usados en este ensayo fueron los siguientes:

15 Éster 6-metilresorufínico del ácido 1,2-di-O-lauril-rac-glicero-3-glutárico 3,32 mM disuelto en DMSO (sustrato, 2,5 mg/ml).

20 Se somete a sonicación una solución madre consistente en 50 mg de sustrato añadidos a 20 ml de DMSO, se toman alícuotas y se almacenan a -80°C hasta el uso. El tampón usado es HEPES 0,5 M pH 8 + 1028 ppm (60 gpg) de dureza de agua de Ca:Mg 3:1 (véase CAM300) y goma arábiga al 4%. Se usa solución madre de enzima lipasa (1 mg/l) como patrón. Para el ensayo, se preparan 50 ml de tampón de ensayo añadiendo 5 ml de HEPES + dureza y 25 ml de goma arábiga al 4% a 10 ml de agua. Se incuba el tampón de ensayo a la temperatura de ensayo deseada (típicamente 25°C). Se añaden muestras enzimáticas de 10 μl a placas de 96 pocillos a la temperatura de ensayo. Se recomiendan 1-10 ppm de enzima activa en la muestra. Para mejores resultados, se ajusta la concentración desconocida a ± 2 veces la actividad del patrón.

25 Se determina la velocidad de fondo (sin enzima, concretamente tampón de ensayo). Se añaden 10 ml de sustrato DGGR 3,32 mM en DMSO a tampón de ensayo y se mezclan bien usando un vórtex. Se añaden inmediatamente 200 μl de sustrato en tampón de ensayo a las muestras enzimáticas en microplacas desde un depósito de reactivo usando una pipeta multicanal. Se mezcla bien la placa de microvaloración y se transfiere inmediatamente a un lector de placas. Se mide la DO a 580 nm durante hasta 10 min a la temperatura de ensayo deseada (típicamente 25°C).

30 Se hace el cálculo de la actividad enzimática restando la velocidad de fondo de la desconocida y del patrón para obtener las velocidades diferenciales. Se determina la relación de las velocidades diferenciales para desconocido a patrón y se multiplica por la concentración del patrón. Se incluyen en el cálculo todas las diluciones.

Concentración desconocida = (velocidad desconocida x concentración del patrón) / velocidad del patrón.

35 Determinación de la actividad lipasa de triacilglicérido: ensayo basado en triglicérido (tributirina) como sustrato (LIPU):

Se mide la actividad lipasa basada en tributirina según el "Food Chemical Codex", 4ª edición, National Academy Press, 1996, pág. 803, con las modificaciones que la muestra se disuelve en agua desionizada en lugar de tampón de glicina y el punto de ajuste del peachímetro es 5,5 en lugar de 7.

40 1 LIPU se define como la cantidad de enzima que puede liberar 1 mol de ácido butírico por minuto en condiciones de ensayo.

Ensayo de actividad fosfolipasa

Actividad fosfolipasa A1 (E.C. 3.1.1.32)

Actividad fosfolipasa A2 (E.C. 3.1.1.4)

Actividad fosfolipasa B (E.C. 3.1.1.5)

45 Sustrato

Se disuelven 1,75% de L-fosfatidilcolina de planta al 95% (441601, Avanti Polar Lipids), 6,3% de Triton X-100 (n° T9284, Sigma) y CaCl_2 5 mM en tampón HEPES 50 mM pH 7,0.

Procedimiento de ensayo

50 Se diluyeron las muestras, calibración y control en HEPES 10 mM pH 7,0 y 0,1% de Triton X-100 (n° T9284, Sigma). Se llevó a cabo el análisis usando un autoanalizador Konelab (Thermo, Finlandia). Se realizó el ensayo a 30°C. Se

termostataron 34 μ l de sustrato durante 180 s, antes de añadir una muestra de 4 μ l. La enzimación duró 600 s. Se midió la cantidad de ácido graso libre liberada durante la enzimación usando el kit NEFA C (999-75406, WAKO, Alemania). Se añadieron 56 μ l de NEFA A y se incubó la mezcla durante 300 s. Después, se añadieron 113 μ l de NEFA B y se incubó la mezcla durante 300 s. Después, se añadieron 113 μ l de NEFA B y se incubó durante 300 s.

5 Se midió entonces la DO a 520 nm. Se calculó la actividad enzimática LATU (μ mol de FFA/min·ml) basándose en una preparación enzimática patrón.

Ensayo de actividad glicolipasa (galactolipasa)

Sustrato

10 Se disolvieron 1,75% de didalactosildiglicérido (DGDG, purificado de lípidos de trigo), 6,3% de Triton X-100 (n° T9284, Sigma) y CaCl_2 5 mM en tampón HEPES 50 mM pH 7,0.

Procedimiento de ensayo

15 Se diluyeron muestras, calibración y control en HEPES 10 mM pH 7,0 y 0,1% de Triton X-100 (n° T9284, Sigma). Se llevó a cabo el análisis usando un autoanalizador Konelab (Thermo, Finlandia). Se realizó el ensayo a 30°C. Se termostataron 34 μ l de sustrato durante 180 s, antes de añadir 4 μ l de muestra. La enzimación duró 600 s. Se midió la cantidad de ácido graso libre liberada durante la enzimación usando el kit NEFA C (999-75406, WAKO, Alemania). Se añadieron 56 μ l de NEFA A y se incubó la mezcla durante 300 s. Después, se añadieron 113 μ l de NEFA B y se incubó la mezcla durante 300 s. Después, se añadieron 113 μ l de NEFA B y se incubó la mezcla durante 300 s. Se midió entonces la DO a 520 nm. Se calculó la actividad enzimática de GLU-K (μ mol de FFA/min·ml) basándose en una preparación enzimática patrón.

20

Listado de Secuencias

<110> DANISCO A/S
 <120> Método
 <130> P034976WO
 5 <150> GB 0908770.1
 <151> 20-05-2009
 <150> US 61/172272
 <151> 24-04-2009
 <160> 5
 10 <170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
 <211> 297
 <212> PRT
 <213> *Aspergillus tubingensis*
 15 <400> 1
 Met Phe Ser Gly Arg Phe Gly Val Leu Leu Thr Ala Leu Ala Ala Leu
 1 5 10 15
 Gly Ala Ala Ala Pro Ala Pro Leu Ala Val Arg Ser Val Ser Thr Ser
 20 25 30
 Thr Leu Asp Glu Leu Gln Leu Phe Ala Gln Trp Ser Ala Ala Ala Tyr
 35 40 45
 Cys Ser Asn Asn Ile Asp Ser Lys Asp Ser Asn Leu Thr Cys Thr Ala
 50 55 60
 Asn Ala Cys Pro Ser Val Glu Glu Ala Ser Thr Thr Met Leu Leu Glu
 65 70 75 80
 Phe Asp Leu Thr Asn Asp Phe Gly Gly Thr Ala Gly Phe Leu Ala Ala
 85 90 95
 Asp Asn Thr Asn Lys Arg Leu Val Val Ala Phe Arg Gly Ser Ser Thr
 100 105 110
 Ile Glu Asn Trp Ile Ala Asn Leu Asp Phe Ile Leu Glu Asp Asn Asp
 115 120 125
 Asp Leu Cys Thr Gly Cys Lys Val His Thr Gly Phe Trp Lys Ala Trp
 130 135 140
 Glu Ser Ala Ala Asp Glu Leu Thr Ser Lys Ile Lys Ser Ala Met Ser
 145 150 155 160

ES 2 616 057 T3

Thr Tyr Ser Gly Tyr Thr Leu Tyr Phe Thr Gly His Ser Leu Gly Gly
165 170 175

Ala Leu Ala Thr Leu Gly Ala Thr Val Leu Arg Asn Asp Gly Tyr Ser
180 185 190

Val Glu Leu Tyr Thr Tyr Gly Cys Pro Arg Ile Gly Asn Tyr Ala Leu
195 200 205

Ala Glu His Ile Thr Ser Gln Gly Ser Gly Ala Asn Phe Arg Val Thr
210 215 220

His Leu Asn Asp Ile Val Pro Arg Val Pro Pro Met Asp Phe Gly Phe
225 230 235 240

Ser Gln Pro Ser Pro Glu Tyr Trp Ile Thr Ser Gly Asn Gly Ala Ser
245 250 255

Val Thr Ala Ser Asp Ile Glu Val Ile Glu Gly Ile Asn Ser Thr Ala
260 265 270

Gly Asn Ala Gly Glu Ala Thr Val Ser Val Val Ala His Leu Trp Tyr
275 280 285

Phe Phe Ala Ile Ser Glu Cys Leu Leu
290 295

<210> 2

<211> 270

<212> PRT

5 <213> *Aspergillus tubingensis*

<400> 2

Ser Val Ser Thr Ser Thr Leu Asp Glu Leu Gln Leu Phe Ala Gln Trp
1 5 10 15

Ser Ala Ala Ala Tyr Cys Ser Asn Asn Ile Asp Ser Lys Asp Ser Asn
20 25 30

Leu Thr Cys Thr Ala Asn Ala Cys Pro Ser Val Glu Glu Ala Ser Thr
35 40 45

Thr Met Leu Leu Glu Phe Asp Leu Thr Asn Asp Phe Gly Gly Thr Ala
50 55 60

Gly Phe Leu Ala Ala Asp Asn Thr Asn Lys Arg Leu Val Val Ala Phe
65 70 75 80

ES 2 616 057 T3

Arg Gly Ser Ser Thr Ile Glu Asn Trp Ile Ala Asn Leu Asp Phe Ile
85 90 95

Leu Glu Asp Asn Asp Asp Leu Cys Thr Gly Cys Lys Val His Thr Gly
100 105 110

Phe Trp Lys Ala Trp Glu Ser Ala Ala Asp Glu Leu Thr Ser Lys Ile
115 120 125

Lys Ser Ala Met Ser Thr Tyr Ser Gly Tyr Thr Leu Tyr Phe Thr Gly
130 135 140

His Ser Leu Gly Gly Ala Leu Ala Thr Leu Gly Ala Thr Val Leu Arg
145 150 155 160

Asn Asp Gly Tyr Ser Val Glu Leu Tyr Thr Tyr Gly Cys Pro Arg Ile
165 170 175

Gly Asn Tyr Ala Leu Ala Glu His Ile Thr Ser Gln Gly Ser Gly Ala
180 185 190

Asn Phe Arg Val Thr His Leu Asn Asp Ile Val Pro Arg Val Pro Pro
195 200 205

Met Asp Phe Gly Phe Ser Gln Pro Ser Pro Glu Tyr Trp Ile Thr Ser
210 215 220

Gly Asn Gly Ala Ser Val Thr Ala Ser Asp Ile Glu Val Ile Glu Gly
225 230 235 240

Ile Asn Ser Thr Ala Gly Asn Ala Gly Glu Ala Thr Val Ser Val Val
245 250 255

Ala His Leu Trp Tyr Phe Phe Ala Ile Ser Glu Cys Leu Leu
260 265 270

<210> 3
<211> 1045
<212> ADN

5 <213> *Aspergillus tubingensis*

<400> 3

atgttctctg gacggtttgg agtgcttttg acagcgcttg ctgcgctggg tgctgccgcg 60
ccggcaccgc ttgctgtgcg gagtaggtgt gcccgatgtg agatggttgg atagcactga 120
tgaaggggtga ataggtgtct cgacttccac gttggatgag ttgcaattgt tcgcgcaatg 180
gtctgccgca gcttattgct cgaataatat cgactcgaaa gactccaact tgacatgcac 240
ggccaacgcc tgtccatcag tcgaggaggc cagtaccacg atgctgctgg agttcgacct 300

ES 2 616 057 T3

gtatgtcact cagatcgcag acatagagca cagctaattt gaacaggacg aacgactttg 360
gaggcaacagc cggtttcctg gccgcggaca acaccaacaa gcggctcctg gtgccttcc 420
ggggaagcag cacgattgag aactggattg ctaatcctga cttcatcctg gaagataacg 480
acgacctctg caccggctgc aaggccata ctggtttctg gaaggcatgg gagtccgctg 540
ccgacgaact gacgagcaag atcaagtctg cgatgagcac gtattcgggc tataccctat 600
acttcaccgg gcacagtttg ggcggcgcac tggctacgct gggagcgaca gttctgcgaa 660
atgacggata tagcgttgag ctggtgagtc cttcacaag gtgatggagc gacaatcggg 720
ttctgacagt caatagtaca cctatggatg tcctcgaatc ggaaactatg cgctggctga 780
gcatatcacc agtcagggat ctggggccaa cttcctgtgt acacacttga acgacatcgt 840
cccccggtg ccaccatgg actttggatt cagtcagcca agtccggaat actggatcac 900
cagtggcaat ggagccagtg tcacggcgtc ggatatacga gtcatcgagg gaatcaattc 960
aacggcggga aatgcaggcg aagcaacggt gagcgttctg gctcacttgt ggtacttttt 1020
tgcgatttcc gagtgcctgc tataa 1045

<210> 4
<211> 964
<212> ADN

5 <213> *Aspergillus tubingensis*

<400> 4

agtaggtgtg cccgatgtga gatggttga tagcactgat gaagggtgaa taggtgtctc 60
gacttccacg ttggatgagt tgcaattgtt cgcgcaatgg tctgccgcag cttattgctc 120
gaataatata gactcgaag actccaactt gacatgcacg gccaacgcct gtccatcagt 180
cgaggaggcc agtaccacga tgctgctgga gttcgacctg tatgtcactc agatcgcaga 240
catagagcac agctaatttg aacaggacga acgactttgg aggcacagcc ggtttcctgg 300
ccgcggacaa caccaacaag cggctcgtgg tcgccttccg ggggaagcagc acgattgaga 360
actggattgc taatcctgac ttcacctcgg aagataacga cgacctctgc accggctgca 420
aggtccatac tggtttctgg aaggcatggg agtccgctgc cgacgaactg acgagcaaga 480
tcaagtctgc gatgagcacg tattcgggct ataccctata cttcaccggg cacagtttgg 540
gcgccgcatt ggctacgctg ggagcgacag ttctgcgaaa tgacggatat agcgttgagc 600
tggtgagtcc ttcacaaggt tgatggagcg acaatcgggt tctgacagtc aatagtacac 660
ctatggatgt cctcgaatcg gaaactatgc gctggctgag catatcacca gtcagggatc 720
tggggccaac ttccgtgtta cacacttgaa cgacatcgtc ccccggtgac caccatgga 780
ctttggattc agtcagccaa gtcgggaata ctggatcacc agtggcaatg gagccagtgt 840
cacggcgtcg gatatacgaag tcatcgaggg aatcaattca acggcgggaa atgcaggcga 900
agcaacggtg agcgttctgg ctcaacttctg gtactttttt gcgatttccg agtgcctgct 960
ataa 964

ES 2 616 057 T3

<210> 5
 <211> 2236
 <212> ADN
 <213> *Trichoderma reesei*

5 <400> 5

cagccaacttg cagtcocctg gaattctcac ggtgaatgta ggccttttgt agggtaggaa 60
 ttgtcactca agcacccecca acctccatta cgctccccc atagagtcc caatcagtga 120
 gtcattggcac tgttctcaaa tagattgggg agaagttgac ttccgccag agctgaaggt 180
 cgcacaaccg catgatatag ggtcggcaac ggcaaaaaag cacgtggctc accgaaaagc 240
 aagatgtttg cgatctaaca tccaggaacc tggatacatc catcatcacg cacgaccact 300
 ttgatctgct ggtaaactcg tattcgccct aaaccgaagt gcgtggtaaa tctacacgtg 360
 ggcccccttc ggtatactgc gtgtgtcttc tctaggtgcc attcttttcc ctctctctag 420
 tgttgaattg tttgtgttg agtccgagct gtaactacct ctgaatctct ggagaatggt 480
 ggactaacga ctaccgtgca cctgcatcat gtatataata gtgatcctga gaaggggggt 540
 ttggagcaat gtgggacttt gatggctatc aaacaaagaa cgaagacgcc tcttttgcaa 600
 agttttgttt cggctacggt gaagaactgg atacttgttg tgtcttctgt gtatttttgt 660
 ggcaacaaga ggccagagac aatctattca aacaccaagc ttgctctttt gagctacaag 720
 aacctgtggg gtatataatc agagttgtga agtcggtaat cccgctgtat agtaatacga 780
 gtgcactcta aatactccga agctgctgag aaccocggaga atcgagatgt gctggaaagc 840
 ttctagcagc cggctaaatt agcatgaaag gctatgagaa attctggaga cggcttgttg 900
 aatcatggcg ttccattctt cgacaagcaa agcgttccgt cgcagtagca ggcactcatt 960
 cccgaaaaaa ctcggagatt cctaagtagc gatggaaccg gaataatata ataggcaata 1020
 cattgagttg cctcgacggt tgcaatgcag gggactgag cttggacata actgttccgt 1080
 accccaacct ttctcaacct ttggcgtttc cctgattcag cgtaccgta caagtcgtaa 1140
 tcaactattaa cccagactga ccggacgtgt tttgcccttc atttggagaa ataatgtcat 1200
 tgcgatgtgt aatttgctg cttgaccgac tggggctggt cgaagcccga atgtaggatt 1260
 gttatccgaa ctctgctcgt agaggcatgt tgtgaatctg tgtcgggcag gacacgcctc 1320
 gaaggttcac ggcaagggaa accaccgata gcagtgtcta gtagcaacct gtaaagccgc 1380
 aatgcagcat cactggaaaa taaaaaccaa tggctaaaag tacataagtt aatgcctaaa 1440
 gaagtcatat accagcggct aataattgta caatcaagtg gctaaacgta ccgtaatttg 1500
 ccaacggctt gtgggggttc agaagcaacg gcaaagcccc acttccccac gtttgtttct 1560
 tcaactcagtc caatctcagc tggatgccc ccaattgggt cgcttgtttg ttccgggtgaa 1620

ES 2 616 057 T3

gtgaaagaag acagaggtaa gaatgtctga ctcgagcgt tttgcataca accaagggca	1680
gtgatggaag acagtgaaat gttgacattc aaggagtatt tagccagggga tgcttgagtg	1740
tatcgtgtaa ggaggtttgt ctgocgatac gacgaatact gtatagtcac ttctgatgaa	1800
gtggtocata ttgaaatgta aagtcggcac tgaacaggca aaagattgag ttgaaactgc	1860
ctaagatctc gggccctcgg gccttcggcc tttgggtgta catgtttgtg ctccgggcaa	1920
atgcaaagtg tggtaggatc gaacacactg ctgcctttac caagcagctg agggtatgtg	1980
ataggcaaat gttcaggggc cactgcatgg tttogaatag aaagagaagc ttagccaaga	2040
acaatagccg ataaagatag cctcattaaa cggaatgagc tagtaggcaa agtcagcgaa	2100
tgtgtatata taaaggttcg aggtcogtgc ctccctcatg ctctcccat ctactcatca	2160
actcagatcc tccaggagac ttgtacacca tcttttgagg cacagaaacc caatagtcaa	2220
ccatcacaag tttgta	2236

REIVINDICACIONES

1. Un método de producción de una enzima lipolítica que comprende las etapas de:
 - (i) proporcionar una célula de *Trichoderma reesei* transformada o transfectada que comprende
 - 5 a) al menos una secuencia nucleotídica heteróloga que codifica una enzima lipolítica que comprende una secuencia aminoacídica mostrada como SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 o una secuencia aminoacídica que tiene al menos un 40% de identidad de secuencia con las SEQ ID NO: 1 o 2; y/o
 - 10 b) al menos una secuencia nucleotídica heteróloga que codifica una enzima lipolítica, en la que la secuencia nucleotídica comprende la secuencia nucleotídica mostrada como SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4 o una secuencia nucleotídica que tiene al menos un 40% de identidad de secuencia con las SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4; y/o
 - c) al menos una secuencia nucleotídica heteróloga que codifica una enzima lipolítica, en la que la secuencia nucleotídica comprende una secuencia nucleotídica que hibrida con las SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4 o una secuencia nucleotídica que tiene al menos un 40% de identidad de secuencia con las SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4 o el complemento de una cualquiera de las mismas en condiciones rigurosas y,
 - 15 (ii) cultivar la célula en condiciones que permitan la expresión de dicha secuencia o secuencias nucleotídicas heterólogas que codifican dicha enzima lipolítica; y
 - (iii) elevar el pH al final de la fermentación a un pH por encima del pH de las condiciones de cultivo en la etapa (ii).
2. Un método según la reivindicación 1, en el que la secuencia nucleotídica heteróloga comprende además una secuencia promotora, siendo dicha secuencia promotora una secuencia promotora de celobiohidrolasa.
- 20 3. Un método según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que se produce la enzima lipolítica en una cantidad de al menos 20 g/litro de sobrenadante de cultivo.
4. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que se prepara la célula de *Trichoderma reesei* mediante transformación o transfección de una célula de *Trichoderma reesei* con la secuencia nucleotídica.
5. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que se proporciona la célula de *Trichoderma reesei* transformándola con o se transforma con la secuencia nucleotídica usando transformación biolística.
- 25 6. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la célula de *Trichoderma reesei* comprende uno o más genes suprimidos que codifican una enzima o enzimas no lipolíticas, preferiblemente dos o más genes suprimidos que codifican enzimas no lipolíticas, preferiblemente tres o más genes suprimidos que codifican enzimas no lipolíticas, preferiblemente cuatro genes suprimidos que codifican enzimas no lipolíticas.
- 30 7. El método según la reivindicación 6, en el que al menos uno o cada uno de los genes suprimidos que codifican enzimas no lipolíticas es un gen suprimido que codifica una celulasa.
8. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que después de la expresión de la secuencia nucleotídica, se retira la célula de *Trichoderma reesei* del medio en que se ha secretado la enzima, y
- 35 opcionalmente se concentra entonces el medio exento de células.
9. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que se eleva el pH del medio en que se secreta la enzima después de un periodo de tiempo, procurando niveles suficientes de la enzima secretada y antes del aislamiento y/o purificación y/o concentración de la enzima.
10. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que se llevan a cabo las siguientes etapas en el medio en que se ha secretado la enzima de la presente invención después del cultivo de la célula: ajuste del pH del medio, dilución del medio con agua, separación de la célula o células del medio, concentración del medio en el que dicho medio está exento de células y opcionalmente granulación de dicho medio en el que dicho medio está exento de células.
- 40 11. Un método de producción de una enzima lipolítica que comprende las etapas de:
 - 45 (i) proporcionar una célula de *Trichoderma reesei* transformada o transfectada que comprende al menos una secuencia nucleotídica heteróloga que codifica una enzima lipolítica;
 - (ii) cultivar la célula a un pH de 4 a pH 5,5 en condiciones que permitan la expresión de dicha secuencia o secuencias nucleotídicas heterólogas que codifican dicha enzima lipolítica;
 - (iii) aislar, purificar o concentrar la enzima en un medio de un pH de 5,5 a pH 6,5.

FIGURA 1

10 20 30 40 50 60
 SVSTSTLDEL QLFAQWSAAA YCSNNIDSKD SNLTOTANAC PSVEEASTTM LLEFDLTNDF
 70 80 90 100 110 120
 GGTAGFLAAD NTKRLWAF RGSSTIENWI ANLDFILEDN DDLOTGCKVH TGFWKAWESA
 130 140 150 160 170 180
 ADELTSKIKS AMSTYSGYTL YFTGHS LGGA LATLGATVLR NDGYSVELYT YGCPRIGNYA
 190 200 210 220 230 240
 LAEHITSQGS GANFRVTHLN DVPRVPPMD FGFSQPSPEY WITSGNGASV TASDIEVIEG
 250 260 270
 INSTAGNAGE ATVSVVAVHLW YFFAISEOLL

FIGURA 2

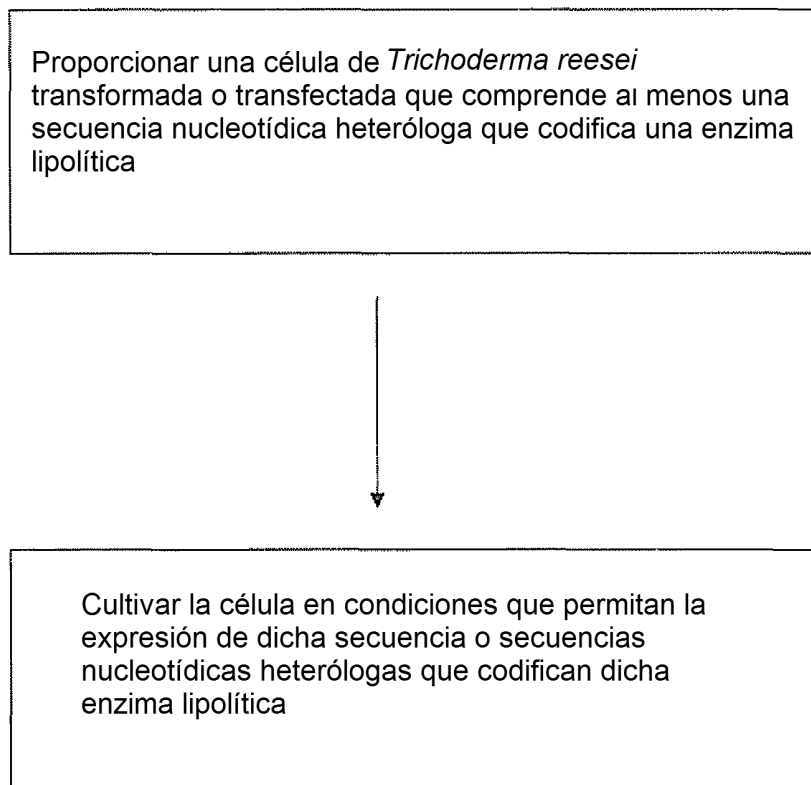


FIGURA 3

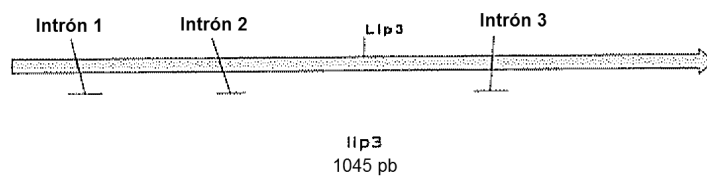


FIGURA 4

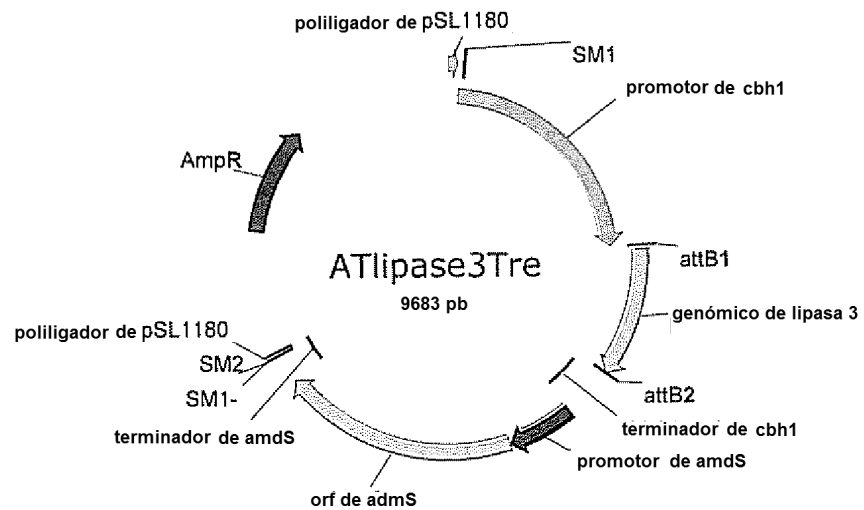


FIGURA 5

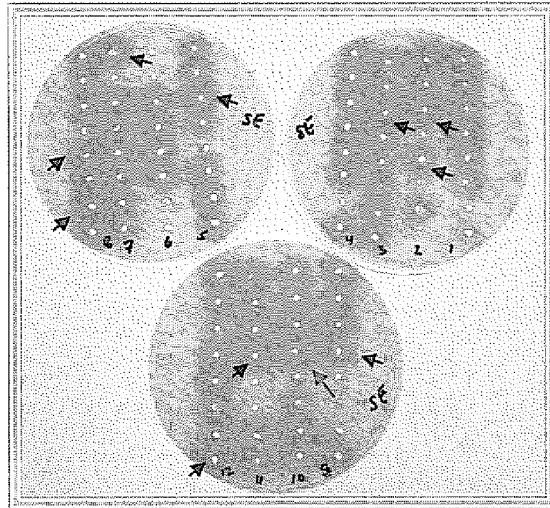


FIGURA 6

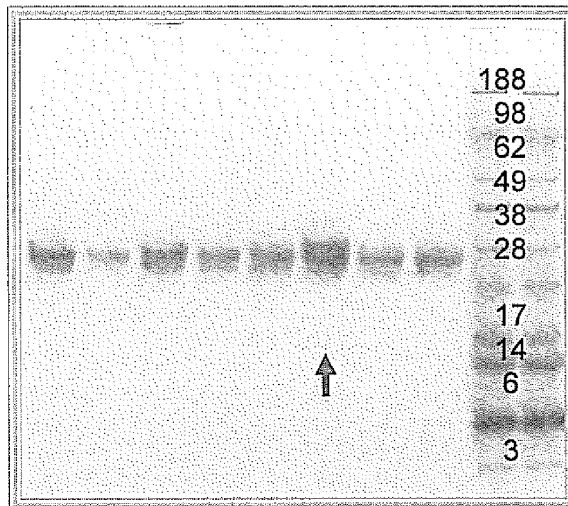


FIGURA 7

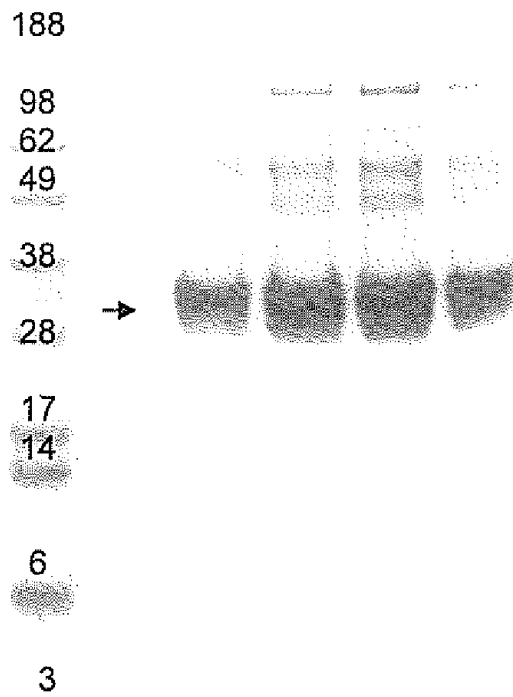


FIGURA 8

Hospedador de expresión	% de aumento del rendimiento de lipasa 3
1. <i>Aspergillus tubigenensis</i>	100
2. <i>Pichia pastoris</i>	570
3. <i>Hansenula polymorpha</i>	850
4. <i>Trichoderma reesei</i>	4200
5. <i>Trichoderma reesei</i>	8570

FIGURA 9

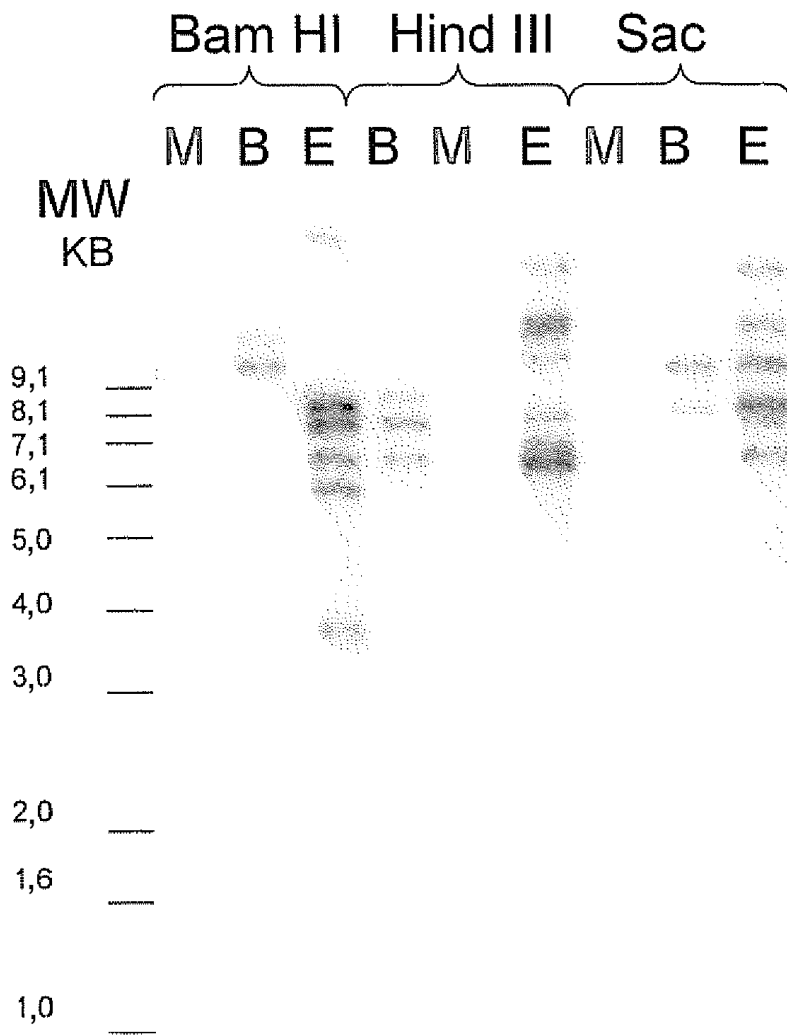


FIGURA 10

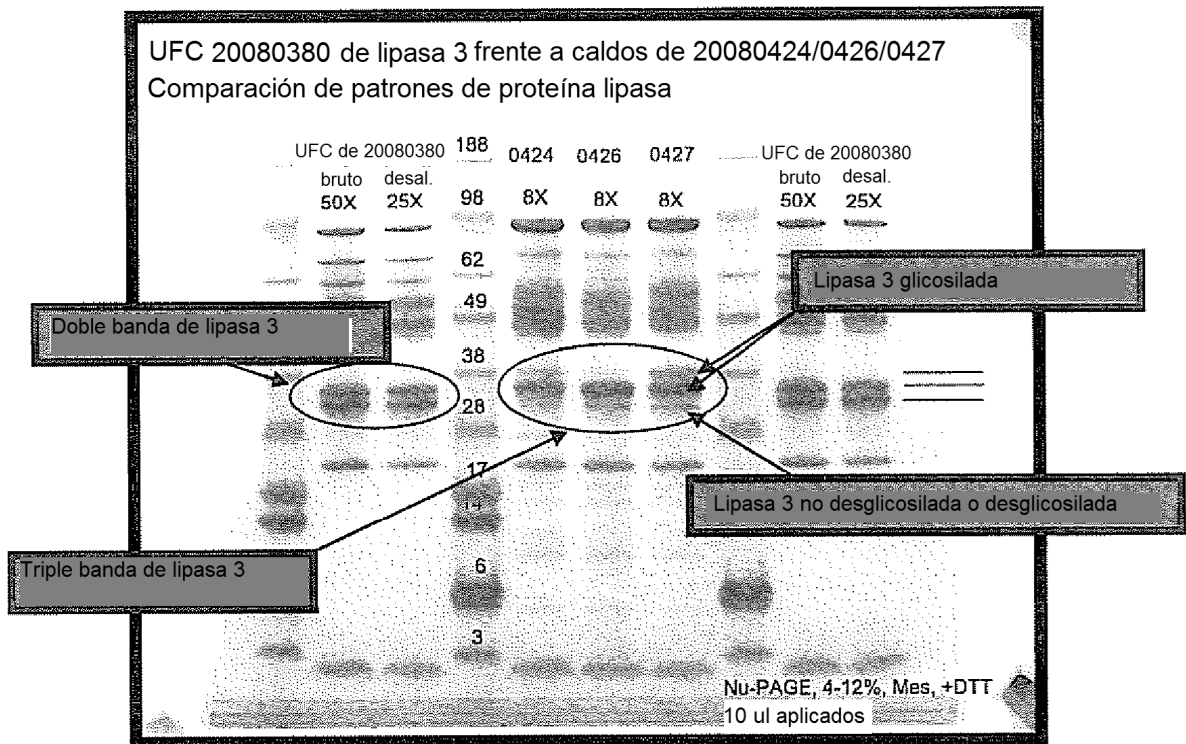


FIGURA 11a

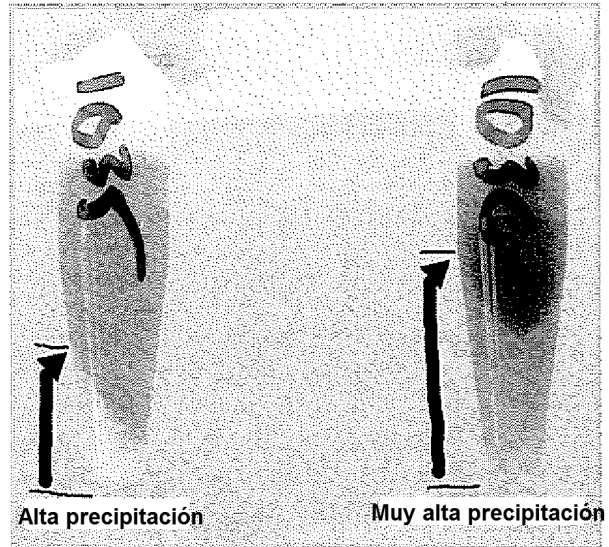


FIGURA 11b

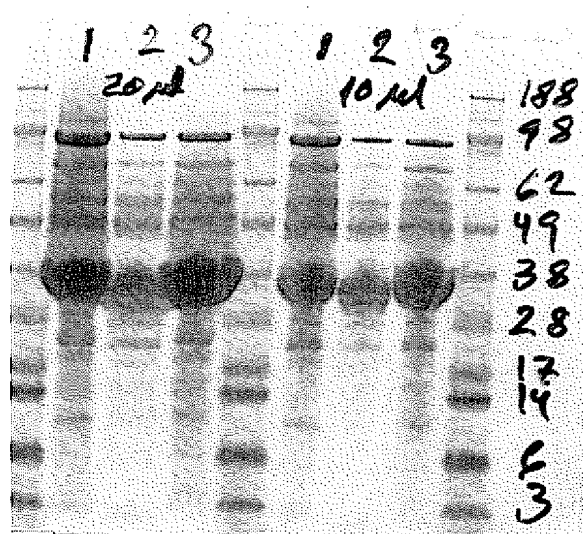


FIGURA 12

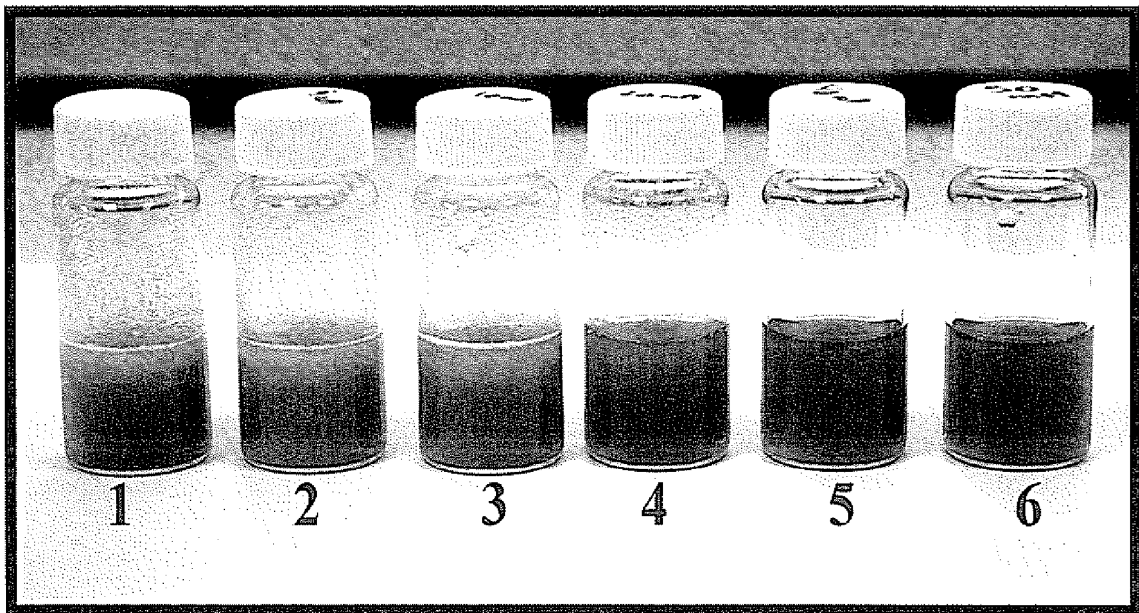


FIGURA 13

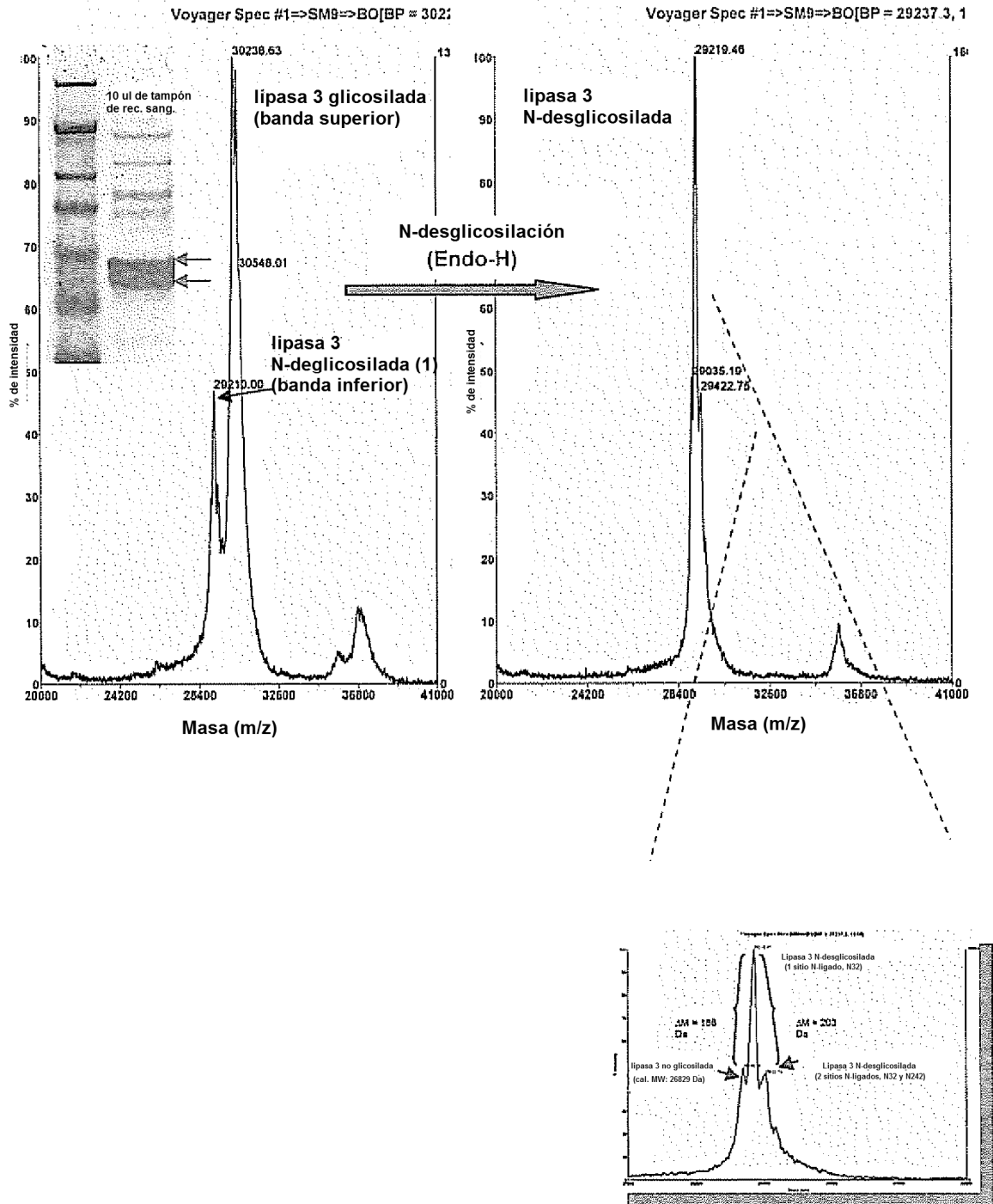


FIGURA 14

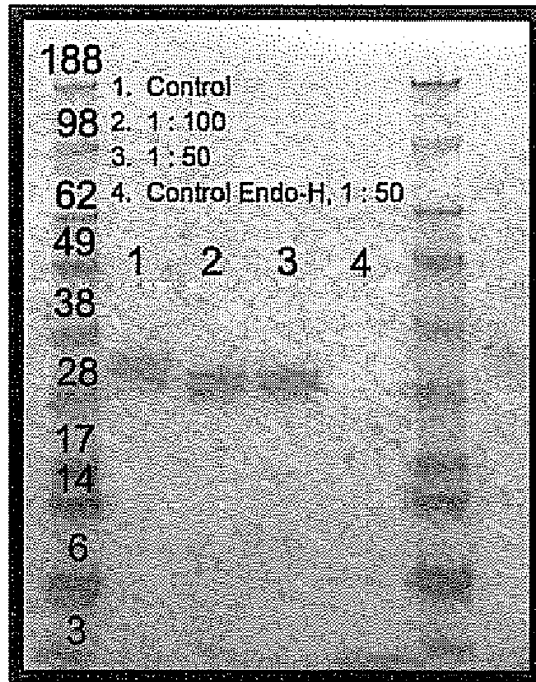


FIGURA 15

Sequence ID #1

```

1  MFSGRFGVLL TALAALGAAA PAPLAVRSVS TSTLDELQLF AQWSAAAYCS
51  NNIDSKDSNL TCTANACPSV EEASTTMLE FDLTNDFGGT AGFLADNTN
101 KRLVVAFRGS STIENWIANL DFILEDNDDL CTGCKVHTGF WKAWESAAD
151 LTSKIKSAMS TYSGYTLYFT GHSLGGALAT LGATVLRNDG YSVELYTYGC
201 PRIGNYALAE HITSQSGAN FRVTHLNDIV PRVPPMDFGF SQSPPEYWIT
251 SNGASVTAS DIEVIEGINS TAGNAGEATV SVVAHLWYFF AISECLL

```

Secuencia aminoacídica de lipasa 3 con péptido señal (en negrita)

FIGURA 16

Seq. ID # 2

1 SVSTSTLDEL QLFQAQMSAAA YCSNNIDSKD SNLTCTANAC PSVEEASTTM
 51 LLEFDLTNDE GGTAGEFLAAD NTNKRLLVVAE RGSSTIENWI ANLDFILLEDN
 101 DDLCTGCKVH TGFWKAMESA ADELTSKIKS AMSTYSCYTL YFTGHSLGGA
 151 LATLGATVLR NDGYSVELYF YGCPRIGNYA LAEHITSQGS GANERVTHLN
 201 DIVPRVPPMD EGFSQPSEFY WITSGNGASV TASDIEVIEG INSTAGNAGE
 251 ATVSVVAHLW YFFAISECLL

Secuencia aminoacídica de lipasa 3 sin péptido señal

FIGURA 17

Seq. ID #3 con sec. señal

ATGTTCTGGACGGTTTGGAGTGGCTTTTGACAGCGCTTGCTGCGCTGGGTGC
TGCCGCGCGGACCGCTTGCTGTGCGGAGtaggtgcccgatgagatggttggatagcact
gataagggtgaatagTGTCGACTTCCACGTTGGATGAGTTGCAATTGTTCCGCCGA
ATGGTCTGCCCGAGCTTATTGCTCGAATAATACTGACTCGAAAGACTCCAACCTTG
ACATGCACGGCCAACGCCCTGTCCATCAGTCGAGGAGGCCAGTACCACGATGCT
GCTGGAGTTCGACCTgtaatgtcactcagatcgagacatagcagcaagctatattgaaacagGACGAAC
GACTTTGGAGGCACAGCCGGTTTCCTGGCCGGACACACCCAAACAGCGGCT
CGTGGTCCCTTCCGGGGAAGCAGCACGATTGAGAACTGGATTGCTAATCTTGA
CTTCATCCTGGAAGATAACGACGACCTCTGCACCCTGCAAGGTCCATACTGG
TTTCTGGAAGGCATGGGAGTCCGCTGCCGACGAACTGACGAGCAAGATCAAGT
CTCGATGAGCACGTAATCGGGCTATACCCTATACTTACCCGGCACAGTTTGG
GCGCGCAATGGCTACGCTGGGAGCGACAGTTCTGCGAAATGACGGATATAGC
GTTGAGCTGgtagcttcacaaggtagagcgacaatcgggttcgacagtcaatagTACACCTAT
GGATGTCTCGAATCGGAAACTATGCGCTGGCTGAGCATATCACCCAGTCAGGGA
TCTGGGGCCAAC TTCCGTGTACACACTTGAACGACATCGTCCCCCGGTGCCA
CCCATGGACTTGGATTCAGTCAGCCAAAGTCCGGATACTGGATCACCCAGTGGC
AATGGAGCCAGTGTACGGCGTCCGGATATCGAAGTCAATCGAGGGAATCAATCA
ACGGCGGGAATGCAGGCGAAGCAACGGTGAGCGTTGTGGCTCACTTGTTGGTA
CTTTTTTGGGATTTCCGAGTGCCTGCTATAA

Secuencia señal (negrita)
 Intrones (minúscula)

FIGURA 18

Seq ID # 4 sin sec. señal

AgtaggtgcccgatgagatgggttgatagcactgatgaagggtaaatagGTGTCTCGACT
 TCCACGTTGGATGAGTTGCAATTTGTTTCGCGCAATGGTCTGCCCGCAGCT
 TATTGCTCGAATAATATCGACTCGAAAGACTCCAACTTGACATGCCACGG
 CCAACGCCCTGTCCATCAGTCGAGGAGGCCAGTACCACGATGCTGCTG
 GAGTTCGACCTgtatgtaactcagatcgagacatagacacagctatttgaacagGACGA
 ACGACTTTGGAGGCACAGCCGGTTTCTGCGCCGGACAAACCCAAC
 AAGCGGCTCGTGGTCGCCTTCGGGGAAGCAGCACGATTGAGAACTG
 GATTGCTAATCTTGACTTCACTCCTGGAAGATAACGACGACCTCTGCAC
 CCGCTGCAAGGTCCATACTGGTTTCTGGAAGGCATGGGAGTCCGCTG
 CCGACGAACTGACGAGCAAGATCAAGTCTGCGATGAGCACGTATTCCG
 GGCTATACCTATACCTTACCAGGACAGTTTGGCGGCGCATTTGGCT
 ACGCTGGAGCGACAGTTCTGCCGAAATGACGGATATAGCGTTGAGCT
 GtgagtccttcacaaggtgatggagcacaatcgggttctgacagtaaatagTACACCTATG
 GATGTCCTCGAATCGGAACATATGCGCTGGCTGAGCATATCACCCAGTC
 AGGATCTGGGGCCAACTTCCGTGTTACACACTTGAACGACATCGTCC
 CCCGGTGCCACCCTCATGGACTTTGGATTCAGTCAGCCAAAGTCCGGAA
 TACTGGATCACCCAGTGGCAATGGAGCCAGTGTACGGCGTCCGGATAT
 CGAAGTCAATCGAGGGAATCAATTCACCGCGGGAATGCAGGCGGAAG
 CAACGGTGAGCGTTGTGGCTCACTTGTGTTTTCGCGATTTCGG
 AGTGCCCTGCTATAA

FIGURA 19

Secuencia promotora de CBH1

SEQ ID NO 5

cagccactgcaagtcocgtagaattcaccggtgaatgtaggctttttaggtaggaaattgctactcaagcacccccaacccctcattacg
ccctcccaatagagttcccaatcagtagcagtcagcactgctcaaaatagatgggagaaagttgacctcccccagagcigaaggctcgc
acaaccgcaatgatatagggcgcgcaacggcaaaaagcaccggctaccgaaagcaagatgcttgcgatacaacatccaggaaac
ctggatacaccatacacaacgaccacttgcgtaacacgctattcgccttaaccgaaagctttgtagtccgagcttaataccctc
gccccttccggtatactcgtgctcctctagggccactctctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctc
gaaactcggagaatggtagaactaacgactaccgaccctgcaatgataatagtaicctgagaaaggggggtgagcaatgig
ggactttgatgctatcaacaacaagaacgaaagacgctcttggcaagtttggcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcct
gtagtatttggycacaagaaggccagagacaatctatcaaacaccacaagcttctctttgagctacaagaacctggtgggtataata
gagttggaagtcggtaatcccgcgtatagtaatacagagctgcatacaatacctcgaagctcggaaacctggaatcgagatgig
ctggaaagctctagccgagcggtaattagcaltgaaggtctatgagaatctcggagacggctgltgaaatcattgcttccattctcga
caagcaaaagcttccgtaglagcagccactctatccgaaaaaacccggagatccttaagtagcagatggaacctccggaataataaa
taggcaatacattgagttcccgaggtgcattgcagggtgactgagctggacataacgttccctaccctccctcctcctcctcctcctc
cgttccctgattcagcctacagctgtaacagctgtaatacactataaccagactgaccggacgtgtttgcccctcattggagaaataatg
attgctgattgtaattgctgcttgcacccgactgggctgttccgaaagcccgaatgaggttatccgaactcgtctgtagaggcattgt
gaaactgctcgggcaggacaagccctcgaaggctcagcaataaaglacataagtaataagcctaaagaaagcctacataaccagcggctaataatgt
acaatacaagtggctaaacgtaccctaatitgcccacggcttggggtgcaagaagcaacggcaaaagcccactcccccacttctttctt
cacicagccaafctcagctgggatcccccaattggctctgttttccggtgaagtagaagaagacagaggtaagaatgctgactc
ggagcgtttgcatacaaccaaggcagtgatggaagacagtagaagtagacatcaaggatattagccagggtgctgtagtctatc
gtagtagggtttgctcgcgatacgcgaatactgtatagctacttctgtaagtggttccatitgaatgtaaaagtcggccacitgaa
ggcaaaagattgattgaactgcttaagatctcggccctcggcccttgggttactatgctcctccgggcaaatgcaaa
gtgtggtaggaatgaaacacigctcttaccaggctgagggtatgtaggaatgttcagggggcactgcatggtttcgaat
agaaagtagagcttagccaaagacaatagccgataaagatagcccttcaaaaacggaaatgtagtaggcaagctcagcgaatg
atataaaaggctcaggtccgctccctc
gcacagaaacccaatagctcaaccatcacaagtgtgta