



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



①① Número de publicación: **2 164 545**

②① Número de solicitud: 009901747

⑤① Int. Cl.⁷: C12N 9/24

C12N 15/56

A61K 38/47

A01N 63/02

①②

SOLICITUD DE PATENTE

A1

②② Fecha de presentación: **31.07.1999**

④③ Fecha de publicación de la solicitud: **16.02.2002**

④③ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
16.02.2002

⑦① Solicitante/s: **NEWBIOTECHNIC, S.A.**
C/ Zaragoza, 52
41001 Sevilla, ES
UNIVERSIDAD DE SEVILLA
UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

⑦② Inventor/es: **Montero Macarro, Manuel;**
Rey Barrera, Manuel;
Monte Vázquez, Enrique y
Llobell González, Antonio

⑦④ Agente: **No consta**

⑤④ Título: **Enzimas con actividad beta-(1,6)-endoglucanasa.**

⑤⑦ Resumen:

Enzimas con actividad beta-(1,6)-endoglucanasa.
La invención se refiere a enzimas con actividad beta-(1,6)-endoglucanasa, a construcciones de ADN que codifican para dichas enzimas, a métodos para la producción de dichas enzimas, a preparaciones enzimáticas que contienen dichas enzimas y al empleo de dichas enzimas y preparaciones enzimáticas para la degradación o modificación de materiales que contiene beta-(1,6)-glucano.

ES 2 164 545 A1

DESCRIPCION

Enzimas con actividad β -(1,6)-endoglucanasa.

5 **Campo de la invención**

Esta invención se refiere a enzimas con actividad β -(1,6)-endoglucanasa, a construcciones de ADN que codifican para dichas enzimas, a métodos para la producción de dichas enzimas, a preparaciones enzimáticas que contienen dichas enzimas y al empleo de dichas enzimas y preparaciones enzimáticas para la degradación o modificación de materiales que contienen β -(1,6)-glucano.

10 **Antecedentes de la invención**

Existen organismos con la capacidad de actuar como agentes de control biológico. Entre estos organismos se encuentran algunas especies de hongos, por ejemplo, del género *Trichoderma*, útiles como agentes de control biológico frente a diversos fitopatógenos fúngicos. La degradación y posterior asimilación de los hongos fitopatógenos, proceso conocido como micoparasitismo, se ha propuesto como el mecanismo principal para explicar la actividad antagonista de tales hongos frente a patógenos fúngicos. El micoparasitismo es un proceso complejo que comprende varias etapas, entre las que se encuentra la penetración del micoparásito en el micelio del hongo fitopatógeno, lo cual parece que va acompañado de una degradación, al menos parcial, de la pared celular del hongo fitopatógeno.

El estudio de los modelos de expresión de las enzimas que degradan la pared celular de hongos en distintas fuentes nutrientes, y la caracterización bioquímica de estas enzimas son requisitos previos para comprender las bases moleculares de la acción antagonista de los agentes de control biológico frente a hongos fitopatógenos. En base a esto, se ha analizado la producción de quitinasas, β -1,6-glucanasas, β -1,3-glucanasas y proteasas extracelulares por distintos organismos potencialmente útiles como agentes de control biológico cuando se cultivan en condiciones que asemejan dicho antagonismo, tales como la presencia de polisacáridos abundantes en las paredes celulares de los hongos (por ejemplo, quitina), paredes celulares fúngicas purificadas o micelios esterilizados en autoclave como fuentes de nutrientes. Algunas de estas hidrolasas han sido purificadas y se las considera enzimas clave durante las primeras etapas del antagonismo.

Debido a la complejidad de las paredes celulares de los hongos, también son interesantes las actividades hidrolíticas con capacidad para degradar otros polisacáridos no abundantes en la pared celular. Recientes estudios han puesto de manifiesto que el β -1,6-glucano es un polímero clave en la estructura de la pared celular de los hongos ya que está implicado en la unión de los componentes mayoritarios que incluyen β -1,3-glucanos, quitina y manoproteínas. Por tanto, las enzimas que hidrolizan β -1,6-glucanos fúngicos bajo las condiciones previamente mencionadas deberían contribuir, junto con quitinasas y β -1,3-glucanasas, a una ruptura eficaz de las paredes celulares de los hongos (fitopatógenos, patógenos de animales, contaminantes de alimentos, etc.) durante el antagonismo.

Los hongos del género *Trichoderma* han sido estudiados desde hace mucho tiempo tanto por su actividad celulolítica como por sus propiedades antagonistas de los patógenos fúngicos de las plantas. El mecanismo antifúngico de *Trichoderma* implica el empleo de enzimas que degradan la pared celular del hongo, entre las que se encuentran quitinasas, β -1,3- y β -1,6-glucanasas y proteasas. Debido a que la quitina y el β -1,3-glucano son los principales componentes estructurales de las paredes celulares fúngicas (excepto de los *Oomycetes*), se ha propuesto que las quitinasas y las β -1,3-glucanasas sean las enzimas clave en la lisis de las paredes celulares de los hongos fitopatógenos durante la acción antagonista de *Trichoderma*. Sin embargo, parece que otras enzimas que degradan las paredes celulares, incluyendo aquéllas que hidrolizan los polímeros minoritarios (β -1,6-glucanos, α -1,3-glucanos, etc.) también pueden estar implicadas en la degradación eficaz y completa de las paredes del micelio y de los conidios de hongos fitopatógenos por *Trichoderma*.

Las β -(1,6)-endoglucanasas (1,6- β -D-glucan glucano-hidrolasas, EC 3.2.1.75) son enzimas que catalizan la ruptura de los enlaces β -(1,6)-glucosídicos presentes en el β -glucano, uno de los componentes de las paredes celulares de numerosos organismos, por ejemplo, hongos y levaduras. Estas enzimas también se denominan pustulaninas debido a su capacidad para degradar el pustulano.

La presencia de una actividad β -(1,6)-glucanasa ha sido detectada en diversos organismos.

Martin et al. [Applied and Environmental Microbiology, 1980, 40(6), 1136-1138] describen algunas especies de *Bacillus* que secretan β -(1,6)-glucanasas.

Schep et al. [Biochem J., 1984, 223, 707-714] describen la purificación y propiedades de una β -(1,6)-glucanasa de *Penicillium brefeldianum*.

5 Dubourdiou et al. [Carbohydrate Research, 144, 277-287 (1985)] han descrito una preparación enzimática industrial [NOVOZYM SP-116, de Novo Industri A/S] derivada de una cepa de *T. harzianum* que, entre otras glucanasas, comprende una β -(1,6)-exoglucanasa.

10 Pitson et al. [Enzyme Microbiol. Technol., 1993, 15, 178-192] describen que algunos hongos filamentosos tales como *Penicillium brefeldianum* o *Trichoderma harzianum* y levaduras tales como *Saccharomyces cerevisiae* producen enzimas que exhiben actividad β -(1,6)-endoglucanasa.

Mullenga et al. [Microbios, 1994, 80(234), 143-154] describen el aislamiento y caracterización de una β -(1,6)-glucanasa en una cepa de *Saccharomycopsis fibuligera*.

15 Se ha descrito una actividad β -1,6-glucanasa extracelular a partir de una cepa de *Trichoderma harzianum*, descrita como un eficaz agente de control biológico, que crece sobre quitina como única fuente de carbono [de la Cruz et al., 1993, Arch. Microbiol., 159, 316-322]. Dicha actividad es debida a la presencia de, al menos, dos β -1,6-glucanasas, denominadas BGN16.1 y BGN16.2 [De la Cruz et al., 1995, J. Bacteriol., 177, 1864-1871]. La enzima BGN16.2 y el gen *bgn16.2* ya han sido analizados [De la Cruz et al., 1995, J. Bacteriol., 177, 1864-1871; Lora et al., 1995, Mol. Gen. Genet., 247, 639-645]. Sin embargo, la enzima BGN16.1 no ha sido purificada ni caracterizada previamente ni el gen que codifica para dicha enzima, por lo que se desconoce tanto la estructura de dicha enzima como sus relaciones con otras enzimas o las inferencias evolutivas.

25 La patente norteamericana US 5.770.406 describe una enzima con actividad β -1,6-endoglucanasa derivada de *Trichoderma harzianum* que se caracteriza porque tiene un peso molecular aparente de 50 kDa determinado por electroforesis en condiciones desnaturalizantes, un pH óptimo de 5, una temperatura óptima comprendida entre 30°C y 40°C, una Km de 0,3% aproximadamente sobre pustulano, un pI aparente de 5,6, una actividad específica de alrededor de 100 U/mg de enzima y un modo de acción endo.

35 Aunque se han descrito diversas enzimas con actividad β -(1,6)-glucanasa en diferentes organismos (bacterias, hongos, levaduras), la enorme variedad existente en cuanto a los mecanismos de acción, afinidad a sustrato, especificidad, capacidad lítica, etc., hace que siga siendo necesario incrementar el arsenal de enzimas con capacidad para degradar o modificar la pared celular de organismos perjudiciales, por ejemplo, hongos fitopatógenos y saprofitos, con el fin de poder evitar de forma eficaz las pérdidas causadas por tales hongos.

40 La invención proporciona una solución a la necesidad existente que comprende la purificación y caracterización de unas enzimas con actividad β -1,6-glucanasa de *Trichoderma harzianum*, el aislamiento y caracterización de las secuencias de ADN que codifican para dichas enzimas y la clonación de dichas secuencias de ADN.

45 La invención también proporciona un método para la producción de dichas enzimas, preparaciones enzimáticas que contienen dichas enzimas y el empleo de dichas enzimas y preparaciones enzimáticas para la degradación o modificación de materiales que contienen β -(1,6)-glucano.

Breve descripción de las figuras

50 La Figura 1 muestra una imagen de microscopio óptico (200X de amplificación) en el que se aprecia el efecto antifúngico, determinado por la reducción del tamaño de las hifas del hongo fitopatógeno *Penicillium digitatum*, producido por la enzima BGN16.3 [Figura 1A] y el efecto de un control negativo [Figura 1B].

55 Descripción detallada de la invención

La invención proporciona una enzima con actividad β -(1,6)-glucanasa, en adelante enzima de la invención, que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre:

- 60 a) la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC. ID. N°.: 1,
b) la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC. ID. N°.: 2, y

ES 2 164 545 A1

c) una secuencia de aminoácidos sustancialmente homóloga y funcionalmente equivalente a las secuencias de aminoácidos mostradas en la SEC. ID. N.º.: 1 o en la SEC. ID. N.º.: 2.

En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión “sustancialmente homóloga” significa que las secuencias de aminoácidos en cuestión tienen un grado de identidad, a nivel de aminoácidos, de, al menos, un 70 %, preferentemente de, al menos, un 85 %, y, más preferentemente de, al menos, un 95 %.

Asimismo, en el sentido utilizado en esta descripción, la expresión “funcionalmente equivalente” significa que la proteína en cuestión tiene, al menos, actividad β -(1,6)-glucanasa.

La enzima cuya secuencia de aminoácidos se muestra en la SEC. ID. N.º.: 1 se relaciona con la enzima denominada BGN16.1, por lo que a dicha enzima se la identificará es esta descripción con la denominación BGN16.1, cuya existencia había sido propuesta previamente [De la Cruz et al., 1995, J. Bacteriol., 177, 1864-1871] aunque no ha sido purificada ni caracterizada con anterioridad ni tampoco la secuencia de ADN que codifica para dicha enzima, debido en gran medida a las dificultades técnicas que plantean los bajísimos niveles de expresión que presenta [determinado por ensayos northern y por el número de clones escrutado para conseguir uno positivo].

La enzima cuya secuencia de aminoácidos se muestra en la SEC. ID. N.º.: 2 ha sido denominada BGN16.3 en esta descripción y no ha sido descrita previamente.

Las enzimas BGN16.1 y BGN16.3 presentan las características que se resumen en la Tabla 1.

TABLA 1

Propiedades de BGN16.1 y BGN16.3

Parámetro	BGN16.1	BGN16.3
Peso molecular (SDS)	51 kDa	47,5 kDa
pI (IEE)	7,4	4,5
pI (CE)	7,7	4,1
T ^a inactivación	50°C	50°C
Glicosilación	No	No
T ^a óptima	50°C	50°C
Km (pustulano)	0,08%	0,11%
Modo de acción	Endo	
Halos de lisis en paredes	No	
Actividad específica	170 U/mg	185 U/mg

[SDS: dodecilsulfato sódico; pI: punto isoeléctrico; IEE: isoelectroenfoque; CE: cromatoenfoque]

En los Ejemplos que acompañan a esta descripción se describen detalladamente los métodos utilizados para la determinación de dichas propiedades.

La enzima de la invención puede obtenerse a partir de un organismo productor de la misma, tal como un hongo del género *Trichoderma*, mediante un procedimiento que comprende el cultivo del organismo productor bajo condiciones apropiadas para la expresión de dicha enzima y, posteriormente, recuperar dicha enzima. En una realización particular de esta invención, el hongo utilizado pertenece a la especie *Trichoderma harzianum*, concretamente a la cepa depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con el número de acceso CECT 2413.

El cultivo del organismo productor puede hacerse en dos etapas, tal como se menciona en el Ejemplo 1. En una primera etapa se inoculan esporas del hongo en un medio de cultivo suplementado con glucosa como fuente de carbono y, a continuación, se recoge el micelio, se lava y se cultiva en medio mínimo adecuado suplementado con quitina como única fuente de carbono para inducir la BGN16.1. A diferencia de la BGN16.1, la BGN16.3 tiene la particularidad de no inducirse, o de hacerlo en cantidades no detectables, por quitina sino que se induce en presencia de paredes celulares de hongos, por ejemplo, de *Botrytis*, o en ausencia de fuente de carbono.

ES 2 164 545 A1

La actividad β -(1,6)-glucanasa se puede ensayar mediante el protocolo descrito en el Ejemplo 2.

El aislamiento y la purificación de la enzima de la invención se puede llevar a cabo mediante un procedimiento que comprende la precipitación de la enzima con sulfato amónico, la adsorción-digestión a pustulano, el cromatofoco de la solución dializada procedente de la adsorción-digestión a pustulano y la filtración en gel de las fracciones concentradas que presentaron mayor actividad β -(1-6)-glucanasa [véase el Ejemplo 3].

Con la enzima de la invención aislada y purificada se realizaron los ensayos físico-químicos y cinéticos que se mencionan en los Ejemplos 4-11 y cuyos resultados se recogen en la Tabla 1 previamente mostrada. La actividad antifúngica de la enzima de la invención se muestra en el Ejemplo 12.

A partir de la enzima de la invención se puede identificar y aislar la secuencia de ADN que codifica para dicha enzima mediante un procedimiento que comprende:

- la creación de genotecas de ADN genómico (ADNg) o de ADN copia (ADNc) de organismos productores de la enzima de la invención;

- la secuenciación del extremo amino de la enzima de la invención y de fragmentos trípticos de la misma;

- el diseño de oligonucleótidos adecuados para amplificar, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), una región del clon genómico de los organismos productores de la enzima de la invención que sirva para obtener sondas destinadas a escrutar dichas genotecas; y

- el análisis y selección de los clones positivos.

Todas estas etapas se describen con más detalle en el Ejemplo 13 donde se ilustra la obtención de las secuencias de ADN que codifican para las enzimas BGN16.1 y BGN16.3 de *T. harzianum*.

La extracción del ADNg se puede llevar a cabo mediante un protocolo estándar [Kaiser et al., 1994, Methods in yeast genetics. A Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York] con algunas modificaciones, por ejemplo, la adición de un paso de purificación con fenol [véase el Ejemplo 13.1].

Para la creación de la genoteca de ADNc se extrae el ARN total del organismo productor de la enzima de la invención siguiendo un protocolo estándar [Chomczynski y Sacchi, 1987, Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal. Biochem. 162:156-159] con ligeras modificaciones. En una realización particular, el organismo productor de la enzima de la invención es *T. harzianum* CECT 2413 el cual se cultiva en un medio mínimo con paredes de organismos de la especie *Botrytis* como única fuente de carbono, aislándose el ARN mensajero (ARNm) mediante cromatografía de afinidad a oligo(dT)celulosa. Posteriormente, se sintetiza el ADNc, por ejemplo, utilizando un kit comercial, se le unen unos adaptadores apropiados, se liga a un vector adecuado y se empaqueta en un hospedador apropiado, por ejemplo, el fago λ [véase el Ejemplo 13.2 y 13.3].

La secuenciación del extremo amino de la enzima de la invención y de fragmentos trípticos de la misma se puede realizar mediante cualquier procedimiento convencional, por ejemplo, mediante el método de Edmans Matsudaira [A practical guide to protein and peptide purification for microsequencing. Academic press, Inc. New York, Edmans Matsudaira (eds.) 1989] [véase el Ejemplo 13.4].

A partir de la información obtenida de la secuencia del extremo amino y de los fragmentos trípticos de la enzima de la invención se procedió a diseñar un conjunto de oligonucleótidos destinados a amplificar una secuencia específica correspondiente a la secuencia de ADN que codifica para la enzima de la invención. En una realización particular, los oligonucleótidos directos se diseñaron a partir de las secuencias de los extremos amino de las enzimas BGN16.1 y BGN16.3 mientras que los oligonucleótidos inversos (antisentido) se diseñaron a partir de las secuencias de los fragmentos trípticos de las enzimas BGN16.1 y BGN16.3. En el Ejemplo 13.4 se describen las secuencias de los extremos amino y de los fragmentos trípticos de las enzimas BGN16.1 y BGN16.3 que sirvieron para diseñar los oligonucleótidos utilizados para la realización de la PCR [véase el Ejemplo 13.5].

Los fragmentos adecuados resultantes de la amplificación mediante PCR se pueden marcar y utilizar como sondas para escrutar una genoteca (de ADNg o de ADNc) con el fin de aislar los clones de interés

mediante hibridación *in situ* [véase el Ejemplo 13.6].

Por tanto, la invención proporciona una construcción de ADN que codifica para la enzima de la invención que comprende:

- a) una secuencia de ADN seleccionada entre la SEC. ID. N°: 3 y la SEC. ID. N°: 4; o
- b) una secuencia de ADN análoga a la secuencia definida en a) que
 - i) es sustancialmente homóloga a la secuencia de ADN definida en a); y/o
 - ii) codifica para un polipéptido que es sustancialmente homólogo a la proteína codificada por la secuencia de ADN definida en a).

La SEC. ID. N°: 3 corresponde a la secuencia de nucleótidos que codifica para la BGN16.1 mientras que la SEC. ID. N°: 4 corresponde a la secuencia de nucleótidos que codifica para la BGN16.3.

En el sentido utilizado en esta descripción, el término “análogo/a” pretende incluir a cualquier secuencia de ADN que codifica para una enzima con actividad β -1,6-endoglucanasa que tiene las propiedades i)-ii) arriba mencionadas. Típicamente, la secuencia de ADN análoga:

- se puede aislar de otro organismo que produce la enzima con actividad β -(1,6)-glucanasa en base a la secuencia de ADN mostrada en la SEC. ID. N°: 3 o en la SEC. ID. N°: 4, o

- se construye en base a la secuencia de ADN mostrada en la SEC. ID. N°: 3 o en la SEC. ID. N°: 4, por ejemplo, mediante la introducción de sustituciones de nucleótidos conservativas, es decir, que no dan lugar a otra secuencia de aminoácidos de la β -(1,6)-glucanasa codificada por dicha secuencia de ADN mostrada en SEC. ID. N°: 3 o en SEC. ID. N°: 4, pero que corresponde al empleo de codones del organismo hospedador destinado a la producción de la enzima, o bien mediante la introducción de sustituciones de nucleótidos que dan lugar a una secuencia de aminoácidos diferente y, por tanto, posiblemente, a una estructura proteica diferente que pudiera dar lugar a una β -(1,6)-glucanasa mutante con propiedades diferentes a las de la enzima nativa. Otros ejemplos de posibles modificaciones incluyen la inserción de uno o más nucleótidos en la secuencia, la adición de uno o más nucleótidos en cualquiera de los extremos de la secuencia, o la delección de uno o más nucleótidos en cualquier extremo o en el interior de la secuencia. Por ejemplo, la secuencia de ADN análogo puede ser una subsecuencia de la secuencia de ADN mostrada en cualquiera de las secuencias mostradas en SEC. ID. N°: 3 o SEC. ID. N°: 4.

En general, la secuencia de ADN análoga es sustancialmente homóloga a la secuencia de ADN que codifica para una enzima β -(1,6)-glucanasa de la invención, por ejemplo SEC. ID. N°: 3 o SEC. ID. N°: 4, es decir, presenta una homología a nivel de nucleótidos de, al menos, un 70 %, preferentemente, al menos un 85 %, o más preferentemente, al menos, un 95 % respecto a cualquiera de las secuencias mencionadas previamente.

La secuencia de ADN que codifica para la enzima de la invención puede proceder no solo de *T. harzianum* CECT 2413 sino de cualquier otra cepa de *Trichoderma* o de un organismo hospedador transformado con dicha secuencia de ADN.

Alternativamente, la secuencia de ADN que codifica para la enzima de la invención, puede ser aislada, mediante técnicas convencionales, a partir del ADN de cualquier organismo mediante el empleo de sondas o de oligonucleótidos preparados a partir de la información sobre la secuencia de ADN proporcionada en esta descripción, o mediante iniciadores (por PCR).

La secuencia de ADN que codifica para la enzima de la invención, o la construcción que la contiene, puede ser insertada en un vector apropiado. Por tanto, la invención también se refiere a un vector, tal como un vector de expresión, que comprende dicha secuencia de ADN, o una construcción que la contiene. La elección del vector dependerá de la célula hospedadora en la que se va a introducir posteriormente. A modo de ejemplo, el vector donde se introduce dicha secuencia de ADN puede ser un plásmido o un vector que, cuando se introduce en una célula hospedadora, se integra en el genoma de dicha células y se replica junto con el cromosoma (o cromosomas) en el que (en los que) se ha integrado.

En el vector proporcionado por esta invención, la secuencia de ADN que codifica para la enzima de la invención debe estar conectada operativamente a un promotor y a una secuencia terminadora. El promotor puede ser cualquier secuencia de ADN que muestra una actividad transcripcional en la célula

hospedadora elegida y puede derivar bien de genes que codifican para proteínas homólogas o heterólogas de la célula hospedadora. Los procedimientos utilizados para ligar la secuencia de ADN que codifica para la enzima de la invención al promotor y a la secuencia terminadora, respectivamente, y para insertar dicha construcción en un vector son bien conocidos por los técnicos en la materia y han sido descritos, por ejemplo, por Sambrook et al. [Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY, 1989].

La invención también proporciona una célula que comprende una secuencia de ADN que codifica para la enzima de la invención, o una construcción de ADN que contiene a dicha secuencia o dicho vector mencionado más arriba. Las células hospedadoras que se pueden transformar con la secuencia de ADN que codifica para la enzima de la invención pueden ser células procarióticas o, preferentemente, células eucarióticas, tales como células de tejidos vegetales o células fúngicas, por ejemplo, células de levadura o de hongos filamentosos. La transformación de estas células puede llevarse a cabo mediante técnicas convencionales, por ejemplo, mediante técnicas que implican la formación de protoplastos y la transformación de los mismos seguido de la regeneración de la pared celular. La transformación de células de tejidos vegetales puede ser muy interesante desde diversos puntos de vista, por ejemplo, para aumentar la resistencia a hongos fitopatógenos.

La invención también proporciona un método para la producción de una enzima de la invención, que comprende cultivar una célula hospedadora adecuada que contiene la secuencia de ADN que codifica para la enzima de la invención bajo condiciones que permiten la producción de la enzima y recuperar la enzima del medio de cultivo.

El medio utilizado para cultivar las células hospedadoras transformadas puede ser cualquier medio adecuado para cultivar las células hospedadoras en cuestión. La β -(1,6)-glucanasa expresada puede ser, ventajosamente, secretada al medio de cultivo y puede ser recuperada mediante un procedimiento como el descrito en el Ejemplo 3 o por cualquier otro procedimiento convencional de aislamiento de proteínas que comprende la separación de las células del medio de cultivo, la precipitación de las proteínas y la separación por métodos cromatográficos.

La invención también proporciona una preparación enzimática útil para la degradación o modificación de materiales que contienen β -(1,6)-glucano, por ejemplo, el material de la pared celular microbiana, que comprende, al menos, una enzima con actividad β -(1,6)-glucanasa de la invención. Dicha preparación enzimática puede contener entre 0,01 % y 100 % en peso de dicha enzima con actividad β -(1,6)-glucanasa de la invención.

En una realización particular, la preparación enzimática proporcionada por esta invención es una preparación enzimática de componente único y contiene mayoritariamente una o más de las enzimas con actividad β -(1,6)-glucanasa de la invención.

En otra realización particular, la preparación enzimática proporcionada por esta invención comprende múltiples actividades enzimáticas, por ejemplo, diferentes actividades enzimáticas requeridas para la modificación o degradación de paredes celulares microbianas. A modo de ejemplo, dicha preparación enzimática puede incluir enzimas líticas, en particular de origen microbiano (fúngico o bacteriano), por ejemplo, derivadas de diversas especies de los géneros *Trichoderma*, *Oerskovia*, *Arthrobacter*, *Rhizotocnia*, *Staphylococcus* o *Streptomyces*. También puede contener una o más enzimas capaces de modificar o degradar paredes celulares, por ejemplo, enzimas con actividad celulolítica, mananolítica, quitinolítica o proteolítica, tales como celulasas, otras β -(1,6)-glucanasas, β -(1,3)-glucanasas, mananasas, endo- o exo-quitinasas, quitosanasas, proteasas, α - o β -manosidasas, mutanasas, etc. Estas enzimas pueden proceder de cualquier organismo productor de las mismas, tales como diversas especies del género *Aspergillus* o los mencionados más arriba en relación con las enzimas líticas.

La preparación enzimática de la invención puede prepararse por métodos convencionales y puede presentarse en forma líquida o sólida, por ejemplo, en forma de un granulado. La preparación enzimática puede contener aditivos, por ejemplo, estabilizantes que prolonguen la estabilidad de la misma.

La invención proporciona, además, una composición antifúngica que comprende, al menos, una enzima de la invención junto con, al menos, un fungicida químico. Como fungicida químico puede utilizarse cualquiera de los usados habitualmente, preferentemente, un fungicida químico seleccionado del grupo formado por los fungicidas químicos que afectan a la membrana, los fungicidas químicos que afectan a la síntesis de la pared celular y sus mezclas. Opcionalmente, la composición antifúngica de la invención puede contener, además, al menos, una proteína con actividad enzimática degradadora de la pared celular

microbiana. Cualquier enzima con actividad degradadora de la pared celular microbiana puede utilizarse, si se desea, en la composición antifúngica de la invención.

5 La composición antifúngica de la invención, que puede contener entre 0,01% y 99,99% en peso de la enzima de la invención, puede prepararse por métodos convencionales y puede presentarse en forma líquida o sólida, por ejemplo, en forma de un granulado. La composición antifúngica de la invención también puede contener aditivos, por ejemplo, estabilizantes con el fin de prolongar la estabilidad de la misma.

10 La enzima de la invención puede ser utilizada para degradar o modificar materiales que contienen β -(1,6)-glucano, por ejemplo, las paredes celulares microbianas. En una realización particular preferida, la enzima de la invención puede ser utilizada como biofungicida frente a diversos organismos perniciosos, por ejemplo, frente a hongos fitopatógenos, hongos que causen daños en cultivos, hongos patógenos de animales, incluido el hombre, por ejemplo *Candida* spp., responsable de candidiasis en humanos y ani-
15 males, hongos contaminantes de alimentos, etc.

La enzima de la invención también puede utilizarse para romper o lisar las paredes celulares de diversos microorganismos para recuperar productos de interés producidos por dichos microorganismos. En este sentido, cabe destacar que la BGN16.1 es aproximadamente unas 10 veces más efectiva en la ruptura o lisis de la pared celular de *Saccharomyces cerevisiae* que la enzima descrita en la patente norteamericana US 5.770.406.

La preparación enzimática de la invención puede diseñarse a voluntad con una composición específicamente adaptada para la pared celular a romper o lisar. Por ejemplo, si la pared celular a romper
25 contiene un complejo proteína-manano y un glucano, la preparación enzimática podría contener, ventajosamente, una mezcla de actividades proteasa, mananasa, quitinasa y β -glucanasa, con el fin de romper de forma eficiente dicha pared celular.

Otras aplicaciones de la enzima de la invención incluyen, a modo ilustrativo, no limitativo, la extracción de manoproteínas de la capa externa de las paredes celulares de levadura; la producción de protoplastos a partir de levaduras u hongos; la preparación de extractos de levaduras y hongos; la mejora de las operaciones de filtración en procesos para la producción de vinos, mostos y zumos; la elaboración de vinos con propiedades organolépticas alteradas mediante la sobreexpresión del gen en las levaduras
35 vnicas; la elaboración de composiciones para la limpieza de dientes y dentaduras; la elaboración de composiciones para la limpieza de lentes de contacto; la eliminación de hongos sobre recubrimientos; el tratamiento de tejidos, por ejemplo, la retirada del exceso de colorante en los tejidos; la elaboración de composiciones para retirar la placa dental; la elaboración de composiciones para retirar películas biológicas (biofilms) depositadas en superficies, por ejemplo en la superficie de una lente de contacto.

La enzima o la preparación enzimática proporcionadas por esta invención pueden utilizarse en el control de organismos perniciosos, por ejemplo, hongos, patógenos de plantas, animales, incluido el hombre, o contaminantes de cosechas y alimentos. En el sentido utilizado en esta descripción, el término “controlar” incluye la reducción o paralización del crecimiento y/o de la germinación que puede resultar en la eliminación de dichos organismos perniciosos o en la disminución de los daños causados por éstos.

45 La composición antifúngica de la invención puede ser usada para controlar todo tipo de hongos perniciosos, por ejemplo, patógenos de plantas, animales, incluido el hombre, o contaminantes de cosechas y alimentos, mediante el mecanismo de lucha conocido como control integrado.

50 La dosificación de la preparación enzimática y de la composición antifúngica proporcionadas por esta invención y sus condiciones de uso pueden ser determinados en base a los métodos conocidos en la técnica.

Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar la presente invención y no deben ser considerados como limitativos del alcance de la misma.

55 Ejemplo 1

Cultivo de T. harzianum

60 *T. harzianum* CECT 2413 se obtuvo de la Colección Española de Cultivos Tipo, CECT (Valencia, España) y se mantuvo en un medio de cultivo PPG (puré de patata + glucosa, ambos al 2%), suplementado con agar al 2%.

ES 2 164 545 A1

Para la producción y purificación de las enzimas BGN16.1 y BGN16.3, así como para la producción de la genoteca de ADNc se cultivó *T. harzianum* en dos etapas siguiendo protocolos ya descritos por De la Cruz et al. [J. Bacteriol., 1995, Vol. 177, No. 7, 1864-1871].

5

Brevemente, para la producción de BGN16.1, en una primera etapa se inoculan esporas de *T. harzianum* a una concentración final de 10^8 esporas/ml en medio mínimo (MM) [KH_2PO_4 , 15 g/l; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 5 g/l; 1 ml/l de oligoelementos ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5 g/l; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 1,6 g/l; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,4 g/l; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 3,7 g/l)] suplementado con glucosa al 2% como fuente de carbono. El pH final del medio de cultivo se ajusta a 5,5 con KOH 1 M. En este medio de preinducción se cultiva *T. harzianum* durante 48 horas a 28°C y con agitación orbital a 200 rpm. Posteriormente, se recoge el micelio, se lava sucesivamente con MgCl_2 y H_2O y se transfiere a MM suplementado con quitina al 1,5% como fuente de carbono.

10
15 Para la producción de BGN16.3 se siguió un proceso similar al descrito para la producción de BGN16.1 pero utilizando medio Czapek [$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g/l; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,01 g/l; KCl 0,425 g/l, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,115 g/l; NH_4Cl , 2,1 g/l; NaH_2PO_4 , 0,92 g/l] como medio de preinducción y sin añadir quitina al medio de inducción ya que la BGN16.3 tiene la peculiaridad de que no es inducida por quitina (o al menos en cantidades detectables) sino por paredes celulares de hongos o en ausencia de fuente de carbono.

20 Ejemplo 2

Ensayo de la actividad β -(1,6)-glucanasa

25 La actividad β -(1,6)-glucanasa se determina mediante un ensayo que consiste en preparar una mezcla de ensayo conteniendo 0,8 ml de solución de pustulano [β -(1,6)-glucano] al 0,5% (p/v) en tampón acetato potásico 50 mM, pH 5,5, y 0,2 ml de la solución enzimática apropiadamente diluida en el mismo tampón. La mezcla de reacción se incubaba a 37°C durante un periodo de tiempo comprendido entre 30 minutos y 1 hora, deteniendo la reacción calentándola a 100°C durante 7 minutos. Posteriormente se determina el incremento de azúcares reductores en 0,15 ml de mezcla de reacción por el método de Somogyi [J. Biol. Chem., 1952, 195, 19-23] y Nelson [Methods Enzymol., 1957, 3, 85-86], usando como patrón glucosa a 30 concentraciones comprendidas entre 0 y 1 mg/ml. Se incluyen blancos de enzima y de sustrato.

35 Se define 1 unidad de actividad β -(1,6)-glucanasa como la cantidad de enzima que libera 1 μmol de equivalentes de azúcares reductores, expresados como glucosa, por minuto, bajo las condiciones ensayadas.

La concentración de proteína se determina mediante el método de Bradford [Anal. Biochem., 1976, 72, 248-254].

40 Ejemplo 3

Purificación de las enzimas BGN16.1 y BGN16.3

45 Para la purificación de las enzimas BGN16.1 y BGN16.3 se siguió un procedimiento constituido por las siguientes etapas:

a) *Precipitación con sulfato amónico*

50 Esta etapa, al igual que todas las demás (salvo que se indique lo contrario) se realizó a 4°C. Cultivos de *T. harzianum* incubados durante 48 horas en MM suplementado con quitina al 1,5% (para la producción de BGN16.1) o en medio Czapek suplementado con paredes celulares de *Botrytis* al 0,1% (para la producción de BGN16.3) se filtraron a través de papel Whatman n° 1 y se centrifugaron a 6.000 g durante 10 minutos. A continuación, el sobrenadante (unos 200 ml) se precipitó con sulfato amónico al 80% de saturación. Tras una noche de incubación, el precipitado se recuperó centrifugando a 12.000 g 55 durante 20 minutos, se resuspendió en el menor volumen posible de agua destilada y se dializó frente a tampón acetato potásico 50 mM, pH 5,5.

b) *Adsorción-digestión a pustulano*

60 Para la adsorción a pustulano (*Umbilicaria papulosa*, Calbiochem) se incuban alícuotas de 3 ml de sobrenadante dializado con 0,6 ml de pustulano particulado con etanol siguiendo el procedimiento descrito por De la Cruz et al. [J. Bacteriol., 1995, Vol. 177, No. 7, 1864-1871]. La incubación se realiza durante

20 minutos con agitación magnética y posteriormente se centrifuga a 12.000 g durante 10 minutos. El sobrenadante (la fracción no adsorbida a pustulano) se vuelve a incubar con pustulano (este proceso se repite dos veces más). Los precipitados obtenidos tras las sucesivas adsorciones se lavan tres veces con 3 ml de una solución de NaCl 1 M en tampón fosfato-KOH 70 mM, pH 6,0 y, finalmente, se resuspende en
 5 tampón acetato potásico 50 mM, pH 5,5 con fluoruro de fenilmetil-sulfonilo 1 mM y azida sódica 1 mM. Estas muestras se incuban durante toda la noche a 37°C. La fracción clarificada fruto de la degradación del pustulano se centrifuga a 12.000 g durante 10 minutos. El sobrenadante (5-10 ml) se dializa nuevamente frente a tampón imidazol-HCl 25 mM, pH 7,4.

10 c) Cromatoenfoque

La solución dializada procedente de la etapa b) se somete a cromatoenfoque. Para ello se utiliza una columna de vidrio calibrada, modelo C10/20 (1 cm de diámetro y 20 cm de altura) de Pharmacia (Suecia), que contiene un lecho de 18 ml de Polybuffer Exchanger 94 de la misma marca, limitado en su
 15 parte superior por 1 ml de Sephadex G-25 (Pharmacia) y un émbolo AC 10 y se empaqueta siguiendo el procedimiento descrito por el fabricante. La cromatografía se desarrolla a 4°C. La columna se equilibra con 20 volúmenes de tampón imidazol-HCl. Como eluyente se usó Polybuffer 74 (Pharmacia) diluido en agua en una proporción 1:8. La solución se desgasificó previamente y el pH se ajustó a 4,0. Se aplicó un flujo de 9 ml/h por medio de una bomba peristáltica LKB 10200 conectada a la salida de la columna y
 20 se recogieron fracciones de aproximadamente 1,5 ml mediante un colector automático Pharmacia modelo Frac-100. Después de medir el pH de las distintas fracciones, se ensayó la actividad β -1,6-glucanasa. Las fracciones que presentaron mayor actividad se concentraron hasta 0,5 ml aproximadamente con un concentrador Centricon 10 (Amicon, Beverly, Mass.).

25 d) Filtración en gel

El conjunto de fracciones concentradas de BGN16.1 se aplica a una columna (1,6 x 40 cm) de Sephacryl S-200 HR (Pharmacia) equilibrada con tampón acetato potásico 100 mM, pH 5,5 con KCl 100 mM y se eluye con el mismo tampón a un flujo de 7 ml/h. Nuevamente, las fracciones se ensayan para evaluar
 30 la actividad β -(1,6)-glucanasa, seleccionándose aquéllas que muestran los mayores niveles, las cuales se recogen, se lavan y se concentran en tampón acetato potásico 50 mM, pH 5,5 en un concentrador Centricon 10. Las proteínas purificadas se almacenan a 4°C.

La purificación de la BGN16.3 se realizó por filtración en gel en un FPLC con una columna Protein Pack 125 (Waters). Después de introducir la muestra se aplicó una solución de KCl 0,1 M en tampón acetato potásico 50 mM, pH 5,5, a un flujo de 0,2 ml/min. Se recogieron fracciones cada 60 segundos (0,2 ml/fracción). La aparición de la proteína se monitorizó mediante un detector de absorbancia ajustado a
 35 280 nm.

40 Ejemplo 4

Determinación del peso molecular de las enzimas BGN16.1 y BGN16.3

El peso molecular de las enzimas BGN16.1 y BGN16.3 se determinó mediante electroforesis analítica
 45 en condiciones desnaturizantes y por cromatografía en filtración en gel.

4.1 SDS-PAGE

La electroforesis de las enzimas BGN16.1 y BGN16.3 en condiciones desnaturizantes [electroforesis
 50 en gel de poli-acrilamida tratado con dodecilsulfato sódico, SDS-PAGE] se realizó según el procedimiento descrito por Weber y Osborn (1975) [The Proteins (Vol. 1), págs. 179-221, Neurath y Hill (eds.), Academic Press, Inc., New York], usando geles al 12% de acrilamida-bisacrilamida y un aparato Mini-Protean II de Bio-Rad (EEUU) y siguiendo las instrucciones del fabricante.

El peso molecular aparente de las enzimas BGN16.1 y BGN16.3, en las condiciones ensayadas, es de
 55 51 kDa y 47,5 kDa, respectivamente.

4.2 Filtración en gel

Se determinó el peso molecular de la enzima BGN16.1 nativa mediante la técnica de filtración en
 60 gel en una columna de Sephacryl S-200 HR (Pharmacia) (1,6 x 40 cm) calibrada con unas proteínas marcadoras, obteniéndose un valor de 20-25 kDa para la BGN16.1.

Ejemplo 5

Determinación del punto isoeléctrico de las enzimas BGN16.1 y BGN16.3

5

Para determinar el punto isoeléctrico (pI) de las enzimas BGN16.1 y BGN16.3 se han empleado técnicas de isoelectroenfoque (IEE) y de cromatoenfoque (CE).

El isoelectroenfoque se realizó siguiendo el procedimiento descrito por Robertson et al. [Anal. Biochem., 1987, 167, 290-294]. Las proteínas se visualizaron mediante tinción con azul de Coomassie. El valor del pI aparente para las enzimas BGN16.1 y BGN16.3 se calculó por referencia a proteínas marcadoras convencionales con valores de pI comprendidos entre 3,5 y 9,3 (Amersham-Pharmacia). Los valores de pI aparentes calculados mediante isoelectroenfoque fueron de 7,4 para la BGN16.1 y de 4,5 para la BGN16.3.

15

Mediante cromatoenfoque ácido se calculó un pI de 4,1 para la BGN16.3 y mediante cromatoenfoque básico un pI de 7,7 para la BGN16.1.

Ejemplo 6

20

Efecto de la temperatura sobre la estabilidad de las enzimas BGN16.1 y BGN16.3

Para conocer la estabilidad de las enzimas BGN16.1 y BGN16.3 purificadas frente a la temperatura se incubaron las proteínas purificadas durante 30 minutos (BGN16.1) o durante 5 ó 10 minutos (BGN16.3) a temperaturas comprendidas entre 20°C y 80°C en tampón acetato potásico 50 mM, pH 5,5, y, a continuación, se midió la actividad remanente a 37°C añadiendo pustulano (5 mg/ml) como sustrato de ensayo. La temperatura de inactivación, que se define como la temperatura en la que la actividad específica se reduce un 50 % en las condiciones descritas, es de 50°C tanto para la BGN16.1 como para la BNG16.3.

Ejemplo 7

30

Temperatura óptima

Las temperaturas óptimas de las enzimas BGN16.1 y BGN16.3 se determinaron mediante ensayos convencionales en los que se valoró la actividad enzimática en un intervalo de temperaturas comprendido entre 20°C y 80°C. La temperatura óptima obtenida fue de 50°C, a pH 5,5, para la BGN16.1, es decir, la misma que la temperatura de inactivación, lo que parece sugerir que el pustulano estabiliza a la enzima. Asimismo, la temperatura óptima obtenida para la BGN16.3 fue de 50°C a pH 5,5.

Ejemplo 8

40

Especificidad para los sustratos

Para estudiar la especificidad para diferentes sustratos de las enzimas BGN16.1 y BGN16.3 purificadas se han ensayado sus actividades enzimáticas frente a diversos sustratos que tenían enlaces α - o β -glicosídicos a una concentración de 5 mg/ml. Cuando se utilizaron glucanos, los productos de reacción se determinaron mediante los ensayos convencionales descritos previamente. Las actividades quitinasa y quitosanasas se determinaron mediante el procedimiento descrito por De la Cruz [Eur. J. Biochem., 1992, 206, 856-867].

50

La hidrólisis de los sustratos mediante las enzimas BGN16.1 y BGN16.3 purificadas se realizó incubando 4 mg de pustulano o 2 mg de gentibiosa (un β -1,6-disacárido) con 2 μ g de proteína purificada en 1 ml de agua destilada a diferentes tiempos a 37°C. Se incluyeron blancos de sustrato en paralelo. Después de la hidrólisis, las reacciones se pararon calentándolas a 100°C durante 5 minutos y los oligómeros de pustulano se analizaron mediante cromatografía líquida de alta presión [HPLC] utilizando una columna HPX 42-A mantenida a 60°C. Se utilizó agua como eluyente a una velocidad de flujo de 0,6 ml/min. Los productos se detectaron en base a su absorbancia a 195 nm y se identificaron por comparación con patrones de glucosa, gentibiosa y oligosacáridos de celulosa (velocidad de oligomerización de 2 a 5).

55

La Tabla 2 recoge los distintos sustratos ensayados y muestra los resultados obtenidos en porcentaje respecto al máximo de actividad alcanzado en cada caso.

60

TABLA 2

Especificidad de BGN16.1 y BGN16.3 para distintos sustratos

Sustratos	Enlace principal	BGN16.1	BGN16.3
Laminarina	β -1,3: β -1,6(Glc)	22	8
Paquiman	β -1,3(Glc)	0	0
Pustulano	β -1,6(Glc)	100	100
Glucano (<i>S. cerevisiae</i>)	β -1,3: β -1,6(Glc)	73	18
Carboximetilcelulosa	β -1,4(Glc)	0	0
Quitina coloidal	β -1,4(GlcNAc)	0	0
Glicol-quitosano	β -1,4(GlcN)	0	NR
Nigeran	α -1,3: α -1,4 (Glc)	0	0
Almidón soluble	α 1,4: α -1,6 (Glc)	0	0
Dextrano	α -1,6(Glc)	0	NR

[NR: No realizado]

El pustulano (de *Umbilicaria papullosa*) y el paquiman (de *Poria cocos*) eran de Calbiochem (La Jolla, CA). La carboximetil-celulosa, la quitina (de conchas de cangrejo), el dextrano (de *Leuconostoc mesenteroides*), el glicol-quitosano, la laminarina (de *Laminaria digitata*), el nigeran (de *Aspergillus nidulans*) y el almidón soluble fueron adquiridos a Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). El glucano de levadura se prepara a partir de levadura de panadería según la metodología descrita por Rombouts y Phaff [Eur. J. Biochem., 1976, 63, 109-120].

Como puede apreciarse, la actividad de la enzima BGN16.1 es específica de su sustrato (pustulano) [β -1,6-glucano], actúa en menor medida sobre el glucano de levadura [β -1,3: β -1,6 glucano (4:1)] y muestra una actividad reducida frente a la laminarina, un polisacárido formado fundamentalmente por β -(1,3)-glucano que posee un 15% aproximadamente de enlaces tipo β -(1,6)-glucosídicos que serían los que se hidrolizarían. No se detectó actividad con los otros sustratos ensayados.

Los resultados mostrados en la Tabla 2 también ponen de manifiesto que la actividad de la enzima BGN16.3 es específica de pustulano (sustrato) y muestra una actividad muy reducida frente al glucano de levadura y frente a la laminarina, no detectándose actividad con los otros sustratos ensayados.

Ejemplo 9

Constantes de Michaelis-Menten

Para estudiar la afinidad de las enzimas BGN16.1 y BGN16.3 para sus sustratos, se realizaron ensayos usando diferentes concentraciones de pustulano. Las constantes de Michaelis-Menten (Km) se determinaron según la representación de Lineweaver-Burk a partir de los datos obtenidos midiendo la velocidad inicial de la hidrólisis de pustulano y utilizando un intervalo de concentraciones de pustulano de 20 a 0,5 mg/ml. Las velocidades iniciales de hidrólisis de pustulano se calcularon midiendo la actividad bajo las condiciones de ensayo descritas antes a diferentes tiempos de 0 a 30 minutos.

Los resultados obtenidos fueron:

BGN16.1

- Km: 0,8 mg de pustulano/ml
- Vmax: 312 μ mol de producto/minuto-mg de BGN16.1

BGN16.3

- Km: 1,1 mg de pustulano/ml
- Vmax: 391 pmol de producto/minuto-mg de BGN16.3

Ejemplo 10

Productos de reacción y mecanismos de acción

5

Para determinar si el mecanismo de acción de la enzima BGN16.1 es de tipo exo o endo-hidrolítico se realizó un ensayo consistente en analizar por HPLC los productos liberados a distintos tiempos de la hidrólisis de pustulano por la enzima BGN16.1 purificada. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que la incubación con pustulano de la BGN16.1 purificada genera una serie de oligosacáridos de menor peso molecular que se hidrolizan a oligosacáridos aún menores cuando se incrementa el tiempo de incubación enzimática. En concreto, el análisis reveló una liberación inicial de oligosacáridos largos que se escindieron en sacáridos más pequeños, que oscilan de glucosa (Glc) a gentitetraosa (Glc4) y siendo gentibiosa (Glc2) el producto final mayoritario de la hidrólisis de pustulano por la BGN16.1. Cuando se utilizaba gentibiosa como sustrato, el disacárido no era hidrolizado por la enzima BGN16.1. Por tanto, estos resultados ponen de manifiesto que la BGN16.1 purificada tiene un modo de acción endohidrolítico.

10

Ejemplo 11

Hidrólisis de paredes celulares fúngicas

20

Se ha estudiado la capacidad que poseen las enzimas BGN16.1 y BGN16.3 purificadas para degradar paredes celulares de distintos hongos. Para ello, se incubaron las enzimas (BGN16.1 en unos casos y BGN16.3 en otros) purificadas (0,5 U) con 4 mg de paredes celulares liofilizadas de diferentes hongos en 1 ml de ensayo en tampón acetato potásico 50 mM, pH 5,5.

25

Los hongos ensayados para estudiar la capacidad de BGN16.1 purificada fueron *Botrytis cinerea* CECT 2100, *Giberella fujikuroi* IMI 58289, *Phytophthora syringae* CECT 2351 y *Saccharomyces cerevisiae* (levadura de panadería La Cinta Roja[®], España). Las mezclas se incubaron a 37°C durante 16 horas con agitación ocasional. Las reacciones se pararon mediante centrifugación (10.000 x g, 10 minutos) y la cantidad de azúcares reductores liberados en los sobrenadantes se determinó mediante el método descrito por Somogyi [J. Biol. Chem., 1952, 195, 19-23] y Nelson [Methods Enzymol., 1957, 3, 85-86]. Se incluyen blancos de enzima y de sustrato. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3 y ponen de manifiesto que la BGN16.1 sólo ejerce actividad enzimática sobre las paredes celulares de *S. cerevisiae*, mientras que BGN16.3 no ejerce actividad enzimática sobre ninguna de las paredes celulares ensayadas.

35

TABLA 3

Acción lítica sobre paredes celulares de BGN16.1 y BGN16.3

40

Paredes celulares	BGN16.1 (%)	BGN16.3 (%)
<i>B. cinerea</i> CECT 2100	0	0
<i>G. fujikuroi</i> IMI 58289	0	0
<i>P. syringae</i> CECT 2351	0	0
<i>S. cerevisiae</i>	20	0

45

La actividad lítica sobre las paredes celulares se determinó igualmente observando los halos de clareamiento en placas de agar que contenían las paredes celulares fúngicas previamente mencionadas (concentración final 1 mg/ml), utilizando el procedimiento descrito por Tanaka y Phaff [J. Bacteriol., 1965, 89, 1570-1580]. Después de 48 horas de incubación a 37°C se tiñeron las placas según el procedimiento descrito por Grenier et al. [Plant Physiol., 1993, 103, 1277-1283] con 0,005% (p/v) de azul de anilina y se lavaron con agua. Los halos hidrolíticos se observaron mediante luz ultravioleta y se midieron los radios de los halos de gran longitud. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que la BGN16.1 no originó halos de clareamiento sobre las paredes celulares de hongos filamentosos o levaduras. Sin embargo, cuando se combinó BGN16.1 con otras glucanasas [BGN13.1 y BGN16.2] de *T. harzianum* [De la Cruz, J. Bacteriol., 1995, 177, 1864-1987] se observaron tanto halos de clareamiento como actividad antifúngica frente a hongos fitopatógenos, lo que pone de manifiesto un posible efecto sinérgico en la asociación de enzimas con distintas actividades líticas.

60

Ejemplo 12

Ensayo de la actividad antifúngica

5 Para determinar la actividad antifúngica de las enzimas de la invención se realizó el siguiente ensayo. En un pocillo de una microplaca se crecen 3000 esporas de *Penicillium digitatum* en PDA (Patata Dextrosa Agar, Difco) diluido tres veces respecto a la concentración recomendada por el fabricante, junto con la enzima cuyo efecto antifúngico quiere observarse. Se mantiene 18 horas a 25°C y posteriormente se observa al microscopio. Como control negativo se realiza un ensayo sólo con PDB y esporas. Se
10 analiza tanto la inhibición de la germinación de las esporas como la disminución del tamaño de las hifas de *Penicillium digitatum*.

Para la enzima BGN16.3 se ha observado que a una concentración de 70 µg/ml se produce una reducción del tamaño de las hifas del 50 % respecto del control, no observándose efecto de inhibición de la
15 germinación de las esporas.

En la Figura 1A se muestra el efecto antifúngico producido por la enzima BGN16.3, a una concentración de 70 µg/ml (70 ppm), sobre 3000 esporas de *Penicillium digitatum* tras 18 horas de incubación. En la Figura 1B se muestra el resultado de un control negativo que contenía únicamente PDA y esporas. La Figura 1 pone de manifiesto claramente la reducción del tamaño de las hifas de *Penicillium digitatum*
20 debido a la acción antifúngica de la enzima BGN16.3.

Ejemplo 13

25 *Clonación de las secuencias de ADN que codifican para las enzimas BGN16.1 y BGN16.3*

Para obtener el clon completo de cDNA de las enzimas BGN16.1 y BGN16.3 se siguió una estrategia que comprendía el empleo de PCR. Para ello, se diseñaron oligonucleótidos degenerados a partir de la microsecuenciación del extremo amino y de péptidos trípticos de las enzimas BGN16.1 y BGN16.3.
30

Para el diseño de los oligonucleótidos directos se utilizaron las secuencias de los extremos amino de las enzimas BGN16.1 y BGN16.3 mientras que para el diseño de los oligonucleótidos inversos se utilizaron las secuencias de los péptidos internos (fragmentos trípticos).

35 Con dichos oligonucleótidos y bajo las condiciones experimentales que se describen más adelante [véase el Ejemplo 13.5] se obtuvieron unas bandas específicas de las secuencias codificantes para las enzimas BGN16.1 y BGN16.3 respectivamente que se subclonaron en un vector pGEM-T. La secuenciación de las bandas amplificadas confirmó que se trataba de fragmentos de los clones buscados. A continuación, los fragmentos obtenidos por PCR se marcaron radiactivamente y se utilizaron como sonda para escrutar una genoteca de ADNc de *T. harzianum* CECT 2413. Del total de clones escrutados se obtuvieron unos clones positivos, cuyos análisis pusieron de manifiesto que portaban unos insertos que englobaban completamente la ORF y algo de las secuencias flanqueantes de las regiones promotora y terminadora.
40

13.1 *Extracción del ADNg*

45 El ADNg de *Trichoderma harzianum* CECT 2413 se obtuvo según el protocolo descrito por Kaiser et al. (1994) [Methods in yeast genetics. A Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York], con algunas modificaciones, incluyendo la adición de un paso de purificación con fenol. Brevemente, 0,3-0,5 g de micelio liofilizado se resuspende en Tris-HCl 50 mM y EDTA 20 mM, se homogeniza y se añaden 200 ml de dodecilsulfato sódico (SDS) al 10 %. A continuación, se incuba a 65°C durante 30 minutos, se añade acetato sódico y se incuba otros 30 minutos a 4°C. Finalmente se centrifuga y el sobrenadante se trata con fenol y se precipita con etanol.
50

13.2 *Extracción del ARN total*

55 El ARN total de *T. harzianum* CECT 2413 se extrajo utilizando el método del fenol ácido descrito por Chomczynski y Sacchi (1987) [Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal. Biochem. 162:156] con ligeras modificaciones.

60 13.3 *Construcción de una genoteca de ADNc*

A partir del ARN total de *T. harzianum* CECT 2413, obtenido tras cultivar dicho hongo en MM con

ES 2 164 545 A1

paredes celulares de *Botrytis* al 0,5% como fuente de carbono durante 9 horas, se aisló el ARNm. Para ello se utilizó una cromatografía de afinidad a oligo(dt)celulosa (Stratagene, La Jolla, CA). A continuación, se sintetizó el ADNc empleando el kit comercial “ZAP-cDNA synthesis kit” (Stratagene). Al ADNc así obtenido se le unieron los adaptadores Eco RI y Xho I y se ligó al vector Uni-Zap XR (Stratagene).
5 Finalmente, para empaquetar el ADNc ligado al fago λ se empleó el kit de empaquetamiento “Gigapack III gold packaging extract” (Stratagene), siguiendo las instrucciones del fabricante.

13.4 *Microsecuenciación de proteínas*

10 Para determinar el extremo amino de las enzimas BGN16.1 y BGN16.3, así como para obtener fragmentos internos que permitieran la clonación del gen correspondiente, se realizó la microsecuenciación siguiendo el método de Edmans Matsudaira [A practical guide to protein and peptide purification for microsequencing. Academic Press, Inc., New York, Edmans Matsudaira (eds.) 1989].

15 Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

BGN16.1:

Extremo amino: ASSFASSQDGRYQFTAAQAP [SEC. ID. N°.: 5]

20 Péptido interno: KVKGKLLIGGGRGNNKLNHY [SEC. ID. N°.: 6]

BGN16.3:

25 Extremo amino: AAGAQAYASNQAGN [SEC. ID. N°.: 7]

Péptido interno: GLNSNLQIFGSPW [SEC. ID. N°.: 8]

13.5 *Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)*

30 Para los experimentos de PCR se diseñaron oligonucleótidos degenerados a partir de las secuencias parciales de las enzimas BGN16.1 y BGN16.3.

En el caso de la BGN16.1, los oligonucleótidos directo e inverso fueron los siguientes:

35 directo: 5'-GATGGNCGNTAYCARTTYACNGC-3' [SEC. ID. N°.: 9]

inverso: 5'-CCDATNARYTTNCCYTTNACYTT-3' [SEC. ID. N°.: 10]

40 donde

N es inosina;

Y es T o C;

45 R es G o A; y

D es A o G o T

50 En el caso de la BGN16.3, los oligonucleótidos directo e inverso fueron los siguientes:

directo: 5'-GCTGGNCGNCARGCNTAYGC-3' [SEC. ID. N°.: 11]

inverso: 5'-CCANGGNCTNCCRAANATYTG-3' [SEC. ID. N°.: 12]

55 donde

N es inosina;

60 Y es T o C;

R es G o A; y

D es A o G o T

Para la realización de las PCR se emplearon los siguientes parámetros:

- 5 - 1 ciclo de desnaturalización a 95°C durante 1 minuto, seguido de
- 35 ciclos de síntesis compuestos por:
 - 10 - una fase de hibridación a:
 - i) 55°C durante 1 minuto (para la secuencia que codifica para la BGN16.1), o
 - ii) 50°C durante 1 minuto (para la secuencia que codifica para la BGN16.3),
 - una fase de elongación a 72°C durante 1 minuto, y
 - 15 - una fase de desnaturalización a 95°C durante 1 minuto; y finalmente
- 1 ciclo de elongación adicional de 7 minutos a 72°C para completar los productos inacabados.

20 En todos los casos la PCR se realizó utilizando ADN_g como molde y empleando 100 pmoles de cada oligonucleótido, para un volumen total de PCR de 25 μ l.

13.6 *Escurutinio de la genoteca de ADN_c*

25 El escurutinio de la genoteca de ADN_c se realizó siguiendo procedimientos convencionales descritos por Sambrook et al. [Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY, 1989], empleando sondas marcadas radiactivamente con α^{32} P-dCTP siguiendo el método de cebadores al azar descrito por Feingerg y Vogelstein (1983) en Anal. Biochem., 132: 6. Para ello, se utilizó el kit comercial "Oligolabelling kit" [Farmacia, Suecia] y se siguieron las instrucciones del fabricante.

30 13.7 *Clonación del ADN_c correspondiente a la enzima BGN16.1*

Para el diseño del oligonucleótido directo se utilizó la secuencia del extremo amino de BGN16.1 [SEC. ID. N°.: 5] y para el diseño del oligonucleótido inverso se utilizó la secuencia de un péptido interno [SEC. ID. N°.: 6].

35 Con dichos oligonucleótidos y bajo las condiciones experimentales previamente descritas [véase el Ejemplo 13.5] se obtuvo una banda específica de 455 nucleótidos que se subclonó en el vector comercial pGEM-T (Promega, WI). Posteriormente, la secuenciación de esta banda confirmó que se trataba de un fragmento del clon buscado. A continuación, el fragmento obtenido por PCR se marcó radiactivamente y se utilizó como sonda para escrutar una genoteca de λ Zap construida a partir de ARN extraído de 40 *T. harzianum* CECT 2413 tras 48 horas de inducción en MM con paredes de *Botrytis*. De unos 400.000 clones escrutados se obtuvieron 2 clones positivos (Zbgn1.I y ZBgn1.II). Para el análisis de tales clones, en primer lugar se escindió el fago siguiendo las instrucciones del fabricante, procediendo después a la secuenciación por ambas cadenas de los insertos que portaba. Los dos clones secuenciados portaban 45 clones truncados de 1,4 kpb en los que se encontraba toda la ORF salvo el péptido señal y un fragmento de la región 3' no codificante.

13.8 *Clonación del ADN_c correspondiente a la enzima BGN16.3*

50 Para el diseño del oligonucleótido directo se utilizó la secuencia del extremo amino de la BGN16.3 [SEC. ID. N°.: 7] y para el diseño del oligonucleótido inverso se utilizó la secuencia de un péptido interno [SEC. ID. N°.: 8].

55 Con dichos oligonucleótidos y bajo las condiciones experimentales previamente descritas [véase el Ejemplo 13.5] se obtuvo una banda específica de 450 nucleótidos que se subclonó en el vector comercial pGEM-T (Promega, WI). Posteriormente, la secuenciación de esta banda confirmó que se trataba de un fragmento del clon buscado. A continuación, el fragmento obtenido por PCR se marcó radiactivamente y se utilizó como sonda para escrutar una genoteca de λ Zap construida a partir de ARN extraído de *T. harzianum* CECT 2413 tras 48 horas de inducción en MM con paredes de *Botrytis*. De unos 400.000 clones 60 escrutados se obtuvieron 2 clones positivos, identificados como ZBgn3.I y ZBgn3.II. Para el análisis de tales clones, en primer lugar se escindió el fago siguiendo las instrucciones del fabricante, y el fagémido así obtenido se secuenció por ambas cadenas. En los dos casos los vectores eran portadores de un inserto de

ES 2 164 545 A1

1,7 kpb que englobaba completamente la ORF y algo de la secuencia flanqueante de la región promotora y terminadora.

Lista de secuencias

5

(1) INFORMACION GENERAL:

(i) SOLICITANTE:

10

(A) NOMBRE: NEWBIOTECHNIC, S.A.

(B) CALLE: Zaragoza, 52

(C) CIUDAD: Sevilla

15

(D) ESTADO: Sevilla

(E) PAIS: ES

20

(F) CODIGO POSTAL (ZIP): 41001

(G) TELEFONO: 954 502 459

(H) FAX: 954 502 458

25

(ii) TITULO DE LA INVENCION:

ENZIMAS CON ACTIVIDAD β -(1,6)-ENDOGLUCANASA

30

(iii) NUMERO DE SECUENCIAS: 12

(iv) FORMA LEGIBLE POR ORDENADOR:

35

(A) TIPO DE SOPORTE: Floppy disk

(B) ORDENADOR: IBM PC compatible

(C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS

40

(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (OEP)

(2) INFORMACION DE LA SEC. ID. N°: 1:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

45

(A) LONGITUD: 452 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

50

(C) NUMERO DE CADENAS: desconocido

(D) TOPOLOGIA: desconocido

(ii) TIPO DE MOLECULA: Proteína

55

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC. ID. N°: 1:

60

ES 2 164 545 A1

	Asp	Gly	Arg	Tyr	Gln	Phe	Thr	Ala	Ala	Gln	Ala	Pro	Val	Leu	Gly	Ala
	1				5					10					15	
5	Gly	Asn	Pro	Gly	Ile	Gln	Asp	Trp	Gln	Leu	Phe	Ile	Lys	Glu	Lys	Ser
				20					25					30		
10	Gly	Arg	Lys	Gln	Thr	Val	Arg	Gly	Phe	Gly	Ala	Ala	Ile	Thr	Asp	Ala
			35					40					45			
	Thr	Val	Ala	Ala	Phe	Asn	Lys	Leu	Asn	Ala	Asn	Ser	Arg	Thr	Gln	Leu
		50					55					60				
15	Phe	Asn	Asp	Leu	Met	Thr	Pro	Ser	Gly	Leu	Asn	Phe	Asn	Leu	Leu	Arg
	65					70					75					80
20	His	Thr	Val	Ala	Ser	Ser	Asp	Leu	Ser	Ala	Asp	Leu	Ala	Tyr	Thr	Tyr
					85					90					95	
25	Asp	Asp	Ala	Gly	Gly	Asn	Val	Asp	Thr	Gly	Leu	Asn	Ser	Phe	Gly	Leu
				100						105					110	
	Gly	Asp	Arg	Gly	Asn	Ala	Met	Ile	Ser	Met	Leu	Ala	Asn	Phe	Arg	Arg
				115						120					125	
30	Leu	Gln	Pro	Gln	Leu	Thr	Ile	Val	Gly	Ser	Pro	Trp	Ser	Ala	Pro	Gly
				130						135				140		
35	Trp	Met	Lys	Val	Lys	Gly	Lys	Leu	Ile	Gly	Gly	Gly	Thr	Gly	Asn	Asn
	145					150					155					160
	Lys	Leu	Asn	His	Ala	Tyr	Glu	Asn	Ala	Tyr	Ala	Gln	Tyr	Phe	Val	Lys
					165						170					175
40	Tyr	Leu	Gln	Ala	Tyr	Glu	Ala	Gly	Gly	Ala	His	Ile	Asp	Ala	Ile	Thr
					180						185				190	
45	Leu	Gln	Asn	Glu	Pro	Leu	Asn	Asn	Lys	Asp	Asp	Met	Pro	Thr	Met	Gln
				195						200				205		
	Ile	Glu	Ala	Ala	Glu	Ser	Gly	Ala	Leu	Ile	Arg	Asp	Lys	Val	Gly	Pro
		210							215				220			
50	Ala	Leu	Arg	Asn	Ala	Gly	Leu	Asn	Thr	Gln	Ile	Trp	Ala	Trp	Asp	His
	225					230						235				240
55	Asn	Gln	Asp	Val	Tyr	Ser	Tyr	Pro	Gln	Thr	Val	Met	Asn	Thr	Ala	Ser
					245						250				255	
	Gln	Tyr	Val	Gln	Ala	Ala	Ala	Trp	His	Cys	Tyr	Ala	Gly	Asn	Ala	Pro
60					260						265				270	

ES 2 164 545 A1

	Met	Arg	Tyr	Ala	Leu	Ile	Ala	Ser	Met	Leu	Gly	Gln	Ala	Ala	Ile	Ser
	1				5					10					15	
5	Val	Ala	Met	Pro	Ser	Glu	Pro	Ala	His	Ser	Pro	Arg	Ala	Ala	Gly	Ala
				20					25					30		
10	Gln	Ala	Tyr	Ala	Ser	Asn	Gln	Ala	Gly	Asn	Tyr	Lys	Leu	Thr	Ser	Ile
			35					40					45			
15	Ala	Ala	Pro	Val	Gln	Gly	Asn	Gly	Ser	Pro	Gly	Pro	Ser	Thr	Trp	Asn
		50					55					60				
20	Leu	Ser	Ile	Asp	Asp	Thr	Ser	Ser	Gly	Tyr	Lys	Gln	Lys	Ile	Val	Gly
	65				70					75					80	
25	Phe	Gly	Ala	Ala	Val	Thr	Asp	Ala	Thr	Val	Ser	Ala	Phe	Asn	Glu	Leu
				85					90						95	
30	Ser	Ala	Ser	Thr	Leu	Ser	Gln	Leu	Leu	Asp	Glu	Leu	Met	Thr	Gly	Ala
				100					105					110		
35	Gly	Ala	Ser	Phe	Ser	Leu	Met	Arg	His	Thr	Ile	Gly	Ala	Ser	Asp	Leu
			115					120					125			
40	Ser	Gly	Asp	Pro	Ala	Tyr	Thr	Tyr	Asp	Asp	Asn	Gly	Gly	Asn	Ala	Asp
		130					135					140				
45	Pro	Gly	Met	Thr	Gly	Phe	Asn	Leu	Gly	Asp	Arg	Gly	Thr	Ala	Met	Ala
	145					150					155					160
50	Thr	Met	Leu	Ala	Gln	Met	Lys	Gly	Leu	Asn	Ser	Asn	Leu	Gln	Ile	Phe
				165					170					175		
55	Gly	Ser	Pro	Trp	Ser	Ala	Pro	Gly	Trp	Met	Lys	Leu	Asn	Asn	Ala	Ile
				180					185					190		
60	Asp	Gly	Asn	Thr	Asn	Asn	Asn	Asn	Leu	Asn	Asp	Gly	Tyr	Leu	Thr	Asn
			195					200				205				
65	Asn	Gly	Ala	Gln	Tyr	Ser	Ala	Ala	Phe	Ala	Gln	Tyr	Phe	Val	Lys	Tyr
		210					215					220				
70	Ile	Gln	Ala	Phe	Glu	Ser	His	Gly	Ala	Thr	Ile	Asn	Ala	Ile	Thr	Leu
	225				230						235					240
75	Gln	Asn	Glu	Pro	Leu	Asn	Ser	Gln	Ala	Gly	Tyr	Pro	Thr	Met	Tyr	Met
				245						250				255		
80	Phe	Ser	Tyr	Glu	Gln	Gly	Asp	Leu	Ile	Gln	Asn	Tyr	Val	Ala	Pro	Ala
			260					265						270		

ES 2 164 545 A1

```

Leu Lys Ala Ala Gly Leu Ser Thr Lys Ile Trp Ala Tyr Asp His Asn
      275                      280                      285
5  Thr Asp Gln Pro Asp Phe Pro Glu Gln Val Met Gly Ile Ala Ala Asp
      290                      295                      300
10 Asp Val Ser Ala Val Ala Trp His Cys Tyr Ala Thr Asn Leu Asp Trp
      305                      310                      315                      320
    Thr Val Leu Thr Asn Phe His Asn Ser Tyr Pro Asn Thr Asp Gln Tyr
                      325                      330                      335
15 Met Thr Glu Cys Trp Thr Pro Ser Thr Gly Ala Trp Asn Gln Ala Ala
                      340                      345                      350
    Ser Phe Thr Met Gly Pro Leu Gln Asn Trp Ala Arg Gly Val Ala Ala
20                      355                      360                      365
    Trp Thr Leu Gly Thr Thr Ala Gln Asp Gly Pro His Leu Ser Ser Gly
      370                      375                      380
25 Gly Cys Gly Thr Cys Thr Gly Leu Val Thr Ile Asn Asn Gly Gln Tyr
      385                      390                      395                      400
    Thr Phe Gln Thr Ala Tyr Tyr Met Met Ala Gln Phe Ser Lys Phe Met
30                      405                      410                      415
    Pro Val Gly Ala Thr Val Leu Ser Gly Thr Gly Ser Tyr Thr Tyr Ser
                      420                      425                      430
35 Gly Ser Gly Gly Val Gln Ser Val Ala Ser Leu Asn Pro Asp Gly Thr
      435                      440                      445

40 Arg Thr Val Val Ile Glu Asn Thr Phe Gly Asn Asp Ile Tyr Ile His
      450                      455                      460
45 Leu Ser Thr Ser Ser Gly Gln Glu Trp Ser Gly Asn Val Pro Thr Asn
      465                      470                      475                      480
    Ser Val Thr Thr Trp Val Leu Pro Ala Val
                      485                      490
50

```

(2) INFORMACION DE LA SEC. ID. N°: 3:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

- 55 (A) LONGITUD: 1528 bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- 60 (C) NUMERO DE CADENAS: sencilla
- (D) TOPOLOGIA: desconocido

ES 2 164 545 A1

(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC. ID. N°: 3:

5

GATGGGCGGT ACCAGTTCAC GGCCGCCCAA GCTCCTGTCC TGGGTGCCGG CAACCCTGGC 60

ATCCAAGACT GGCAGCTGTT CATCAAGGAG AAGTCCGGAC GCAAGCAGAC CGTCAGGGGT 120

10 TTTGGTGTCTG CCATCACCGA TGCCACCGTC GCCGCCTTCA ACAAGCTCAA CGCAAACCTCT 180

CGCACGCAGC TGTTCAACGA CCTGATGACC CCTTCGGGCC TCAACTTCAA CCTGCTGCGT 240

CACACCGTCG CTAGCTCGGA TCTCTCTGCT GATCTCGCCT ACACTTACGA CGACGCCGGT 300

15 GGTAATGTCTG AACTGGTCT CAACAGCTTT GGCCTGGGTG ATCGTGGAAA TGCCATGATC 360

AGCATGCTGG CCAACTTCCG CCGCCTGCAG CCCAGCTGA CCATTGTCTGG CTCGCCTTGG 420

TCTGCACCGG GATGGATGAA GGTC AAGGGC AAGCTGATTG GCGGCGGCAC GGGCAACAAC 480

AAGCTCAACC ACGCGTACGA GAACGCCTAC GCCCAGTACT TTGTCAAGTA CCTCCAGGCG 540

20 TACGAGGCTG GCGGTGCTCA CATTGACGCC ATCACTTTGC AGAACGAGCC CCTGAACAAC 600

AAGGACGATA TGCCTACCAT GCAGATCGAG GCGGCGGAGT CTGGTGTCTT GATCCGCGAC 660

AAGGTTGGCC CTGCTCTGCG CAATGCCGGC CTCAACACCC AGATCTGGGC TTGGGACCAC 720

25 AACCAGGATG TGTACTCTTA CCCCAGACT GTCATGAACA CGGCCAGCCA GTACGTCCAG 780

GCCGCTGCTT GGCAC TGCTA CGCCGGCAAC GCCCCTGAGA ACTGGACTCC TCTGACCCAG 840

TTCCACAACG AGTTCCCGG CAAGGAGCAG TACATGACCG AGTGCTGGAC CTCCGTCCCTC 900

30 TCCGGCGGCA CCGACTGGGT CCACAAGCTC CAGCTTCGCC CTGTTCCCCC TCCAAACTGG 960

GCCAACGGCA TCATCGCCTG GACTCTGGGT ACTTCAACGG CGGCGGGCCT GCGCTTTCTG 1020

GTGGCGGTAA CTGCCACAAC TGC ACTGGTCTGTTACCGT CAACGCTGAT GGTAACGGGT 1080

35 ACAAAAAGGA GATTGACTAC TACAATGCTG GGGCAATTCT CGCGCTACAT CCTAAAGGGC 1140

GCTGTTGTTG TTGATGGTAC TGGTAGCTGG TTGTTTGATC CCAACACTGG TGTTGAGAGT 1200

GTTGCTACTG TTAACCTGA TGGCACCCGC ACGGTCGTCA TTCAGAACCG ATACAACAAT 1260

GATATTTGGG TTCGTTTGGC TACGGAGTCG GAGAGCCAGA CTTGGAACGC GCGTGTTCCT 1320

40 GCTCGGGCTG TACTACTTG GATCCTGCC AAGGCTTAAG GCGGAGAACA TGGTATGTGA 1380

TGAAATGATG AATTTGAAAT GAAGATGGGA TGGGTGGTGG AAGCACTGTA TATATCTACC 1440

TAGCTTCGTC TGTATATAGA CAACTGAGT ACATGTA ACT GTCTAAAATG AATATACATG 1500

45

TATAAATGGT AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA 1528

(2) INFORMACION DE LA SEC. ID. N°: 4:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 1696 bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) NUMERO DE CADENAS: sencilla

(D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN (genómico)

ES 2 164 545 A1

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC. ID. N°: 4:

5	TGAAGATCGA CAGCTCAAGC TCTTCAAAGG TTGTAAGCTA CAAGTCAAAG ACACTTTCAA	60
	GTTCCCAAAC CGCCAAAATG CGTTACGCTC TCATCGCCTC CATGCTTGGC CAAGCAGCCA	120
	TCAGCGTTGC TATGCCTTCG GAGCCCGCTC ACAGCCCTCG TGCTGCCGGT GCTCAGGCCT	180
10	ACGCATCCAA CCAGGCCGGT AACTACAAGC TCACCTCCAT TGCTGCTCCC GTTCAAGGCA	240
	ATGGAAGCCC TGGCCCATCT ACTTGGAACC TGTCCATCGA CGACACCAGC AGTGGTTACA	300
	AGCAGAAGAT CGTCGGTTTC GGTGCTGCCG TGACTIONGCT CACCGTCTCT GCCTTCAACG	360
	AGCTGTCTGC CAGCACCTC AGCCAGCTGC TCGACGAGCT CATGACTGGT GCTGGTGCCA	420
15	GCTTCTCTCT CATGCGCCAC ACCATCGGTG CCTCTGACTT GTCTGGCGAC CCAGCCTACA	480
	CTTATGACGA CAACGGCGGC AACGCTGACC CTGGCATGAC TGGCTTCAA C TCGGAGACC	540
	GTGGTACTGC CATGGCCACC ATGCTGGCTC AGATGAAGGG CCTCAACTCC AACCTCCAGA	600
20	TCTTTGGATC TCCCTGGAGT GCTCCTGGAT GGATGAAGCT GAACAACGCC ATTGACGGCA	660
	ACACCAACAA CAACAACCTG AACGATGGTT ACCTCACCAA CAACGGTGCT CAGTACTCGG	720
	CCGCTTTTGC CCAGTACTTT GTCAAGTACA TCCAGGCATT CGAGTCGCAC GGCGCCACCA	780
25	TCAATGCCAT TACCTCCAG AACGAGCCCC TGAACAGCCA GGCTGGCTAT CCCACCATGT	840
	ACATGTTCTC GTACGAGCAG GGAGACCTGA TCCAGAACTA CGTCGCCCT GCCTTGAAGG	900
	CGGCCGGTCT GAGCACCAAG ATCTGGGCTT ACGACCACAA CACTGACCAA CCTGATTTCC	960
	CCGAGCAGGT CATGGGCATC GCCGAGACG ATGTCTCTGC CGTTGCATGG CACTGCTATG	1020
30	CCACTAACCT GGACTGGACT GTCCTGACCA ACTTCCACAA CTCTACCCC AACACTGACC	1080
	AGTACATGAC TGAGTGCTGG ACCCCCTCCA CTGGTGCTTG GAACCAGGCC GCCTCCTTCA	1140
	CCATGGGCC TCTCCAGAAC TGGGCCCGTG GTGTTGCTGC ATGGACCCTC GGCACCCTG	1200
35	CCCAGGACGG CCTCACCTG TCCAGCGGTG GCTGCGGCAC TTGCACTGGT CTCGTCACCA	1260
	TCAACAACGG CCAGTACACC TTCCAGACTG CTTACTACAT GATGGCTCAG TTCTCCAAGT	1320
	TCATGCCCGT TGGAGCCACC GTCCTGAGCG GCACTGGCAG CTACACTTAC TCCGGCAGCG	1380
40	GCGGTGTTCA GTCTGTTGCT TCTCTCAACC CCGATGGCAC CCGCACGGTC GTCATCGAGA	1440
	ACACCTTCGG CAACGACATT TACATCCACC TGAGCACCTC CAGTGGCCAG GAGTGGAGCG	1500
	GCAACGTCCC TACCAACTCT GTCACCACCT GGGTCCTCCC CGCTGTTTAA GCAGATTACG	1560
45	GATTGTTGGA GATGAAGGAA CCTTTGATGT AAATATTTGT CTACATGTGG ATTTGCCACT	1620
	GCACATACGT ATCTGGGGAT TATTTACCAT GCTGTAGAAT GAATGAATAC GGTTAGCCTA	1680
	AAAAAAAAAA AAAAAA	1696

(2) INFORMACION DE LA SEC. ID. N°: 5:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 20 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) NUMERO DE CADENAS: desconocido

(D) TOPOLOGIA: desconocido

(ii) TIPO DE MOLECULA: Péptido

ES 2 164 545 A1

(v) TIPO DE FRAGMENTO: N-terminal

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC. ID. N°: 5:

5 Ala Ser Ser Phe Ala Ser Ser Gln Asp Gly Arg Tyr Gln Phe Thr Ala
1 5 10 15
10 Ala Gln Ala Pro
20

(2) INFORMACION DE LA SEC. ID. N°: 6:

15 (i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 19 aminoácidos

20 (B) TIPO: aminoácido

(C) NUMERO DE CADENAS: desconocido

(D) TOPOLOGIA: desconocido

25 (ii) TIPO DE MOLECULA: Péptido

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

30 (xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC. ID. N°: 6:

Lys Val Lys Gly Lys Leu Ile Gly Gly Gly Arg Gly Asn Asn Lys Leu
1 5 10 15
35 Asn His Tyr

(2) INFORMACION DE LA SEC. ID. N°: 7:

40 (i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 14 aminoácidos

45 (B) TIPO: aminoácido

(C) NUMERO DE CADENAS: desconocido

(D) TOPOLOGIA: desconocido

50 (ii) TIPO DE MOLECULA: Péptido

(v) TIPO DE FRAGMENTO: N-terminal

55 (xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC. ID. N°: 7:

Ala Ala Gly Ala Gln Ala Tyr Ala Ser Asn Gln Ala Gly Asn
1 5 10

60

(2) INFORMACION DE LA SEC. ID. N°: 8:

ES 2 164 545 A1

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 13 aminoácidos

5 (B) TIPO: aminoácido

(C) NUMERO DE CADENAS: desconocido

10 (D) TOPOLOGIA: desconocido

(ii) TIPO DE MOLECULA: Péptido

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

15 (xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC. ID. N°: 8:

Gly Leu Asn Ser Asn Leu Gln Ile Phe Gly Ser Pro Trp

20 1 5 10

(2) INFORMACION DE LA SEC. ID. N°: 9:

25 (i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 23 bases

(B) TIPO: ácido nucleico

30 (C) NUMERO DE CADENAS: sencilla

(D) TOPOLOGIA: lineal

35 (ii) TIPO DE MOLECULA: Otro ácido nucleico

(A) DESCRIPCION: /desc = "sintético"

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC. ID. N°: 9:

40 GATGGNCGNT AYCARTTYAC NGC

23

[N = Inosina]

45 (2) INFORMACION DE LA SEC. ID. N°: 10:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

50 (A) LONGITUD: 23 bases

(B) TIPO: ácido nucleico

55 (C) NUMERO DE CADENAS: sencilla

(D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: Otro ácido nucleico

60 (A) DESCRIPCION: /desc = "sintético",

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC. ID. N°: 10:

CCDATNARYT TNCCYTTNAC YTT

23

5 [N = Inosina]

(2) INFORMACION DE LA SEC. ID. N°: 11:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

10

(A) LONGITUD: 20 bases

(B) TIPO: ácido nucleico

15

(C) NUMERO DE CADENAS: sencilla

(D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: Otro ácido nucleico

20

(A) DESCRIPCION: /desc = "sintético"

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC. ID. N°: 11:

25

GCTGGNGCNC ARGCNTAYGC

20

[N = Inosina]

30 (2) INFORMACION DE LA SEC. ID. N°: 12:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

35

(A) LONGITUD: 21 bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) NUMERO DE CADENAS: sencilla

40

(D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: Otro ácido nucleico

45

(A) DESCRIPCION: /desc = "sintético"

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC. ID. N°: 12:

50

CCANGGNCNTN CCRAANATYTT G

21

[N = Inosina]

55

60

REIVINDICACIONES

1. Una enzima con actividad β -(1,6)-endoglucanasa **caracterizada** porque tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre:
- 5 a) la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC. ID. N°.: 1,
- b) la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC. ID. N°.: 2, y
- 10 c) una secuencia de aminoácidos sustancialmente homóloga y funcionalmente equivalente a las secuencias de aminoácidos mostradas en la SEC. ID. N°.: 1 o en la SEC. ID. N°.: 2.
2. Enzima según la reivindicación 1, **caracterizada** porque tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC. ID. N°.: 1.
- 15 3. Enzima según la reivindicación 2, **caracterizada** porque tiene un peso molecular aparente determinado en condiciones desnaturalizantes de 51 kDa aproximadamente.
4. Enzima según la reivindicación 2, **caracterizada** porque tiene un punto isoeléctrico aparente de 7,4, determinado por isoelectroenfoque.
- 20 5. Enzima según la reivindicación 2, **caracterizada** porque tiene una temperatura óptima de 50°C.
6. Enzima según la reivindicación 2, **caracterizada** porque la Km para pustulano es de aproximadamente 0,08%.
- 25 7. Enzima según la reivindicación 1, **caracterizada** porque tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC. ID. N°.: 2.
8. Enzima según la reivindicación 7, **caracterizada** porque tiene un peso molecular aparente determinado en condiciones desnaturalizantes de 46 kDa aproximadamente.
- 30 9. Enzima según la reivindicación 7, **caracterizada** porque tiene un punto isoeléctrico aparente de 4,1, determinado por isoelectroenfoque.
- 35 10. Una secuencia de ADN aislado que comprende una secuencia de ADN que codifica para una enzima según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, o un fragmento de la misma.
11. Secuencia de ADN según la reivindicación 10, **caracterizada** porque tiene una secuencia de nucleótidos seleccionada entre:
- 40 a) la SEC. ID. N°.: 3,
- b) la SEC. ID. N°.: 4, y
- 45 c) una secuencia de ADN análoga a las secuencias definidas en a) y en b) que (i) es sustancialmente homóloga a la secuencia de ADN definida en a) o en b); y/o (ii) codifica para un polipéptido que es sustancialmente homólogo a la proteína codificada por las secuencias de ADN definidas en a) o en b).
- 50 12. Un vector recombinante **caracterizado** porque contiene una secuencia de ADN según cualquiera de las reivindicaciones 10 u 11.
13. Una célula **caracterizada** porque contiene una secuencia de ADN según cualquiera de las reivindicaciones 10 u 11, o un vector según la reivindicación 12.
- 55 14. Un método para la producción de una enzima según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende cultivar una célula según la reivindicación 13 bajo condiciones que permiten la producción de la enzima y recuperar la enzima del medio de cultivo.
- 60 15. Una preparación enzimática útil para la degradación o modificación de materiales que contienen β -(1,6)-glucano, que comprende, al menos, una enzima según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

ES 2 164 545 A1

16. Preparación enzimática según la reivindicación 15, que comprende entre 0,01 % y 100 % en peso de una enzima según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

17. Preparación enzimática según la reivindicación 15, que contiene como único componente una
5 enzima según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

18. Preparación enzimática según la reivindicación 15, que contiene más de una enzima según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

19. Preparación enzimática según la reivindicación 15, que comprende, además, al menos una enzima
10 seleccionada del grupo formado por celulasas, glucanasas, mananasas, quitinasas, proteasas y/o quitosanasas.

20. Una composición antifúngica que comprende, al menos, una enzima según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 junto con, al menos, un fungicida químico.

21. Composición según la reivindicación 20, en la que dicho fungicida químico se selecciona del grupo formado por un fungicida químico que afecta a la membrana, un fungicida químico que afecta a la síntesis de la pared celular y sus mezclas.

22. Composición según la reivindicación 20, que comprende, además, al menos, una proteína con actividad enzimática degradadora de la pared celular microbiana.

23. Empleo de una enzima según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, o de una preparación enzimática según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 19, o de una composición antifúngica según cualquiera de las reivindicaciones 20 a 22, para degradar o modificar materiales que contienen β -(1,6)-glucano.

24. Empleo según la reivindicación 23, en el que dicho material que contiene β -(1,6)-glucano es una pared celular microbiana.

25. Empleo según la reivindicación 23, en el que dicha enzima, preparación enzimática o composición antifúngica se utiliza para la preparación de protoplastos.

26. Empleo según la reivindicación 23, en el que dicha enzima, preparación enzimática o composición antifúngica se utiliza para la preparación de extractos de levaduras.

27. Empleo según la reivindicación 23, en el que dicha enzima, preparación enzimática o composición antifúngica se utiliza en la extracción de manoproteínas.

28. Empleo según la reivindicación 23, en el que dicha enzima, preparación enzimática o composición antifúngica se utiliza en la producción de vinos, mostos y zumos.

29. Empleo según la reivindicación 23, en el que dicha enzima, preparación enzimática o composición antifúngica se utiliza en la elaboración de composiciones para retirar la placa dental.

30. Empleo según la reivindicación 23, en el que dicha enzima, preparación enzimática o composición antifúngica se utiliza en la elaboración de composiciones para la limpieza de dientes y dentaduras.

31. Empleo según la reivindicación 23, en el que dicha enzima, preparación enzimática o composición antifúngica se utiliza en la elaboración de composiciones para retirar películas biológicas (biofilms) depositadas en superficies.

32. Empleo según la reivindicación 23, en el que dicha enzima, preparación enzimática o composición antifúngica se utiliza en la elaboración de composiciones para la limpieza de lentes de contacto.

33. Empleo según la reivindicación 23, en el que dicha enzima, preparación enzimática o composición antifúngica se utiliza en la eliminación de hongos sobre recubrimientos.

34. Empleo según la reivindicación 23, en el que dicha enzima, preparación enzimática o composición antifúngica se utiliza para tratar tejidos.

35. Empleo según la reivindicación 23, en el que dicha enzima o preparación enzimática se utiliza en

ES 2 164 545 A1

el control de organismos patógenos de plantas, animales, incluido el hombre y contaminantes de cosechas o alimentos.

5 36. Empleo según la reivindicación 23, en el que dicha composición antifúngica se utiliza en el control de organismos patógenos de plantas, animales, incluido el hombre, y contaminantes de cosechas o alimentos.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

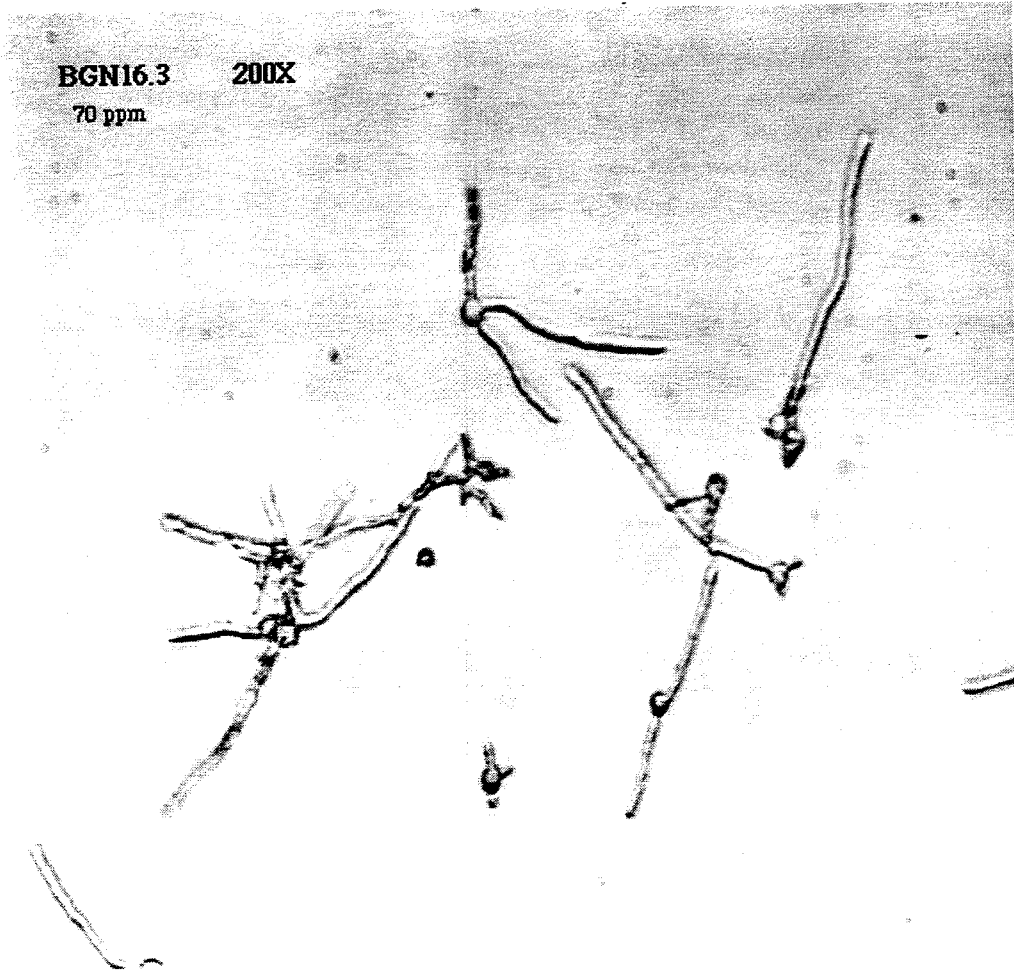


FIGURA 1A

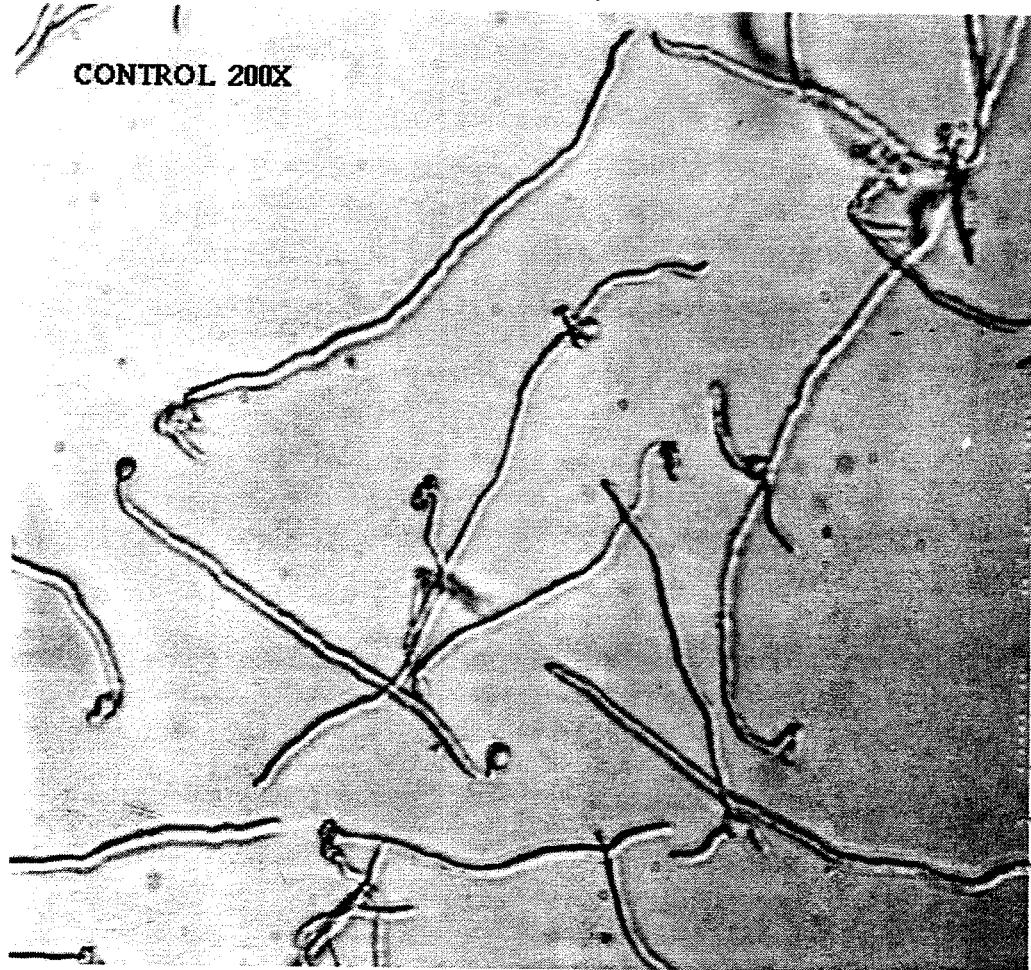


FIGURA 1B



INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.⁷: C12N 9/24, 15/56, A61K 38/47, A01N 63/02

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	DE LA CRUZ, J. et al. "Purification and characterization of an Endo-beta-1,6-glucanase from Trichoderma harzianum that is related to its mycoparasitism", JOURNAL OF BACTERIOLOGY, 1995, Vol. 177, N° 7, páginas 1864-1871. Todo el documento.	1-6,12-33
X	SOLER, A. et al. "Detection of 1,6-glucanase isozymes from Trichoderma strains in sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis and isoelectrofocusing gels", JOURNAL OF MICROBIOLOGICAL METHODS, 1999, Vol. 35, páginas 245-251. Todo el documento.	1-6,12-33
Y	Todo el documento.	7-11
Y	LORA, J.M. et al. "Molecular characterization and heterologous expression of an endo-beta-1,6-glucanase gene from the mycoparasitic fungus Trichoderma harzianum", MOL. GEN. GENET., 1995, Vol. 247, páginas 639-645. Todo el documento.	7-11
A	US 5770406 A (KOFOD et al.) 23.06.1998, todo el documento.	1-33
A	VASSEUR, V. et al. "Trichoderma harzianum genes induced during growth on Rhizoctonia solani cell walls", MICROBIOLOGY, 1995, Vol. 141, páginas 767-774. Todo el documento.	1-33

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n.º:

Fecha de realización del informe

21.01.2002

Examinador

J.L. Vizán Arroyo

Página

1/1