

OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 205 982**

② Número de solicitud: 200101807

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

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **31.07.1999**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **01.05.2004**

Fecha de la concesión: **23.06.2005**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **16.07.2005**

⑯ Fecha de publicación del folleto de la patente:  
**16.07.2005**

⑰ Número de la solicitud inicial: **009901747**

⑲ Titular/es: **NEWBIOTECHNIC, S.A.**  
**Avda. Américo Vespucio, 69**  
**41092 Sevilla, ES**  
**Universidad de Salamanca y**  
**Universidad de Sevilla**

⑳ Inventor/es: **Montero Macarro, Manuel;**  
**Rey Barrera, Manuel;**  
**Monte Vázquez, Enrique y**  
**Llobell González, Antonio**

㉑ Agente: **No consta**

㉒ Título: **Enzima con actividad  $\beta$ -(1,6)-endoglucanasa.**

㉓ Resumen:

Enzima con actividad  $\beta$ -(1,6)-endoglucanasa.

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

ES 2 205 982 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

## DESCRIPCIÓN

Enzima con actividad  $\beta$ -(1,6)-endoglucanasa.

5 **Campo de la invención**

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

**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,  $\beta$ -1,6-glucanasas,  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -1,3-glucanos, quitina y manoproteínas. Por tanto, las enzimas que hidrolizan  $\beta$ -1,6-glucanos fúngicos bajo las condiciones previamente mencionadas deberían contribuir, junto con quitinasas y  $\beta$ -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 celolítica 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,  $\beta$ -1,3- y  $\beta$ -1,6-glucanasas y proteasas. Debido a que la quitina y el  $\beta$ -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  $\beta$ -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 ( $\beta$ -1,6-glucanos,  $\alpha$ -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  $\beta$ -(1,6)-endoglucanasas (1,6- $\beta$ -D-glucan glucano- hidrolasas, EC 3.2.1.75) son enzimas que catalizan la ruptura de los enlaces  $\beta$ -(1,6)-glucosídicos presentes en el  $\beta$ -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  $\beta$ -(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  $\beta$ -(1,6)-glucanasas.

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

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  $\beta$ -(1,6)- exoglucanasa.

Pitson et al. [Enzyme Microbiol. Technol., 1993, 15, 178- 192] describen que algunos hongos filamentosos tales

## ES 2 205 982 B1

como *Penicillium brefeldianum* o *Trichoderma harzianum* y levaduras tales como *Saccharomyces cerevisiae* producen enzimas que exhiben actividad  $\beta$ -(1,6)-endoglucanasa.

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

10 Se ha descrito una actividad  $\beta$ -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  $\beta$ -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.

15 La patente norteamericana US 5.770.406 describe una enzima con actividad  $\beta$ -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.

20 Aunque se han descrito diversas enzimas con actividad  $\beta$ -(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.

25 La invención proporciona una solución a la necesidad existente que comprende la purificación y caracterización de una enzima con actividad  $\beta$ -1,6-glucanasa de *Trichoderma harzianum*, el aislamiento y caracterización de la secuencia de ADN que codifica para dicha enzima y la clonación de dicha secuencia de ADN.

30 La invención también proporciona un método para la producción de dicha enzima, preparaciones enzimáticas que contienen dicha enzima y el empleo de dichas enzimas y preparaciones enzimáticas para la degradación o modificación de materiales que contienen  $\beta$ -(1,6)-glucano.

### 35 Breve descripción de las figuras

40 La Figura 1 muestra una imagen de microscopio óptico (200X de amplificación) en el que se aprecia el efecto anti-fúngico, 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].

### Descripción detallada de la invención

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

- a) la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC. ID. N°: 1, y
- 50 b) una secuencia de aminoácidos sustancialmente homóloga y funcionalmente equivalente a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC. ID. N°: 1.

55 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  $\beta$ -(1,6)-glucanasa.

60 La enzima cuya secuencia de aminoácidos se muestra en la SEC. ID. N°: 1 ha sido denominada BGN16.3 en esta descripción y no ha sido descrita previamente. Dicha enzima BGN16.3 presenta las características que se resumen en la Tabla 1.

65

# ES 2 205 982 B1

TABLA 1  
Propiedades de BGN16.3

	Parámetro	BGN16.3
5	Peso molecular (SDS)	47,5 kDa
	pI (IEE)	4,5
10	pI (CE)	4,1
	Tª inactivación	50°C
	Glicosilación	No
	Tª óptima	50°C
15	Km (pustulano)	0,11%
	Actividad específica	185 U/mg

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

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

25 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.

30 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 Czapek como medio de preinducción, sin necesidad de añadir quitina al medio de inducción ya que la enzima BGN16.3 no es inducida (o al menos en cantidades detectables) por quitina sino que es inducida por paredes celulares de hongos, por ejemplo, de *Botrytis*, o en ausencia de fuente de carbono.

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

40 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 cromatoenfoque de la solución dializada procedente de la adsorción-digestión a pustulano y la filtración en gel de las fracciones concentradas que presentaron mayor actividad  $\beta$ -(1-6)-glucanasa [véase el Ejemplo 3].

45 Con la enzima de la invención aislada y purificada se realizaron los ensayos físico-químicos y cinéticos que se mencionan en los Ejemplos 4-10 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 11.

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:

50 - 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;

55 - 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

60 - el análisis y selección de los clones positivos.

Todas estas etapas se describen con más detalle en el Ejemplo 12 donde se ilustra la obtención de la secuencia de ADN que codifica para la enzima BGN16.3 de *T. harzianum*.

65 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 12.1].

## ES 2 205 982 B1

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  $\lambda$  [véase el Ejemplo 12.2 y 12.3].

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 12.4].

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, el oligonucleótido directo se diseñó a partir de la secuencia del extremo amino de la enzima BGN16.3 mientras que el oligonucleótido inverso (antisentido) se diseñó a partir de la secuencia de los fragmentos trípticos de la enzima BGN16.3. En el Ejemplo 12.4 se describen las secuencias del extremo amino y del fragmento tríptico de la enzima BGN16.3 que sirvió para diseñar los oligonucleótidos utilizados para la realización de la PCR [véase el Ejemplo 12.5].

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 12.6].

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

- a) la secuencia de ADN mostrada en la SEC. ID. N°: 2; 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°: 2 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  $\beta$ -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  $\beta$ -(1,6)-glucanasa en base a la secuencia de ADN mostrada en la SEC. ID. N°: 2, o

- se construye en base a la secuencia de ADN mostrada en la SEC. ID. N°: 2, por ejemplo, mediante la introducción de sustituciones de nucleótidos conservativas, es decir, que no dan lugar a otra secuencia de aminoácidos de la  $\beta$ -(1,6)-glucanasa codificada por dicha secuencia de ADN mostrada en SEC. ID. N°: 2, 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  $\beta$ -(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 la secuencia mostrada en SEC. ID. N°: 2.

En general, la secuencia de ADN análoga es sustancialmente homóloga a la secuencia de ADN que codifica para una enzima B- (1,6)-glucanasa de la invención, por ejemplo SEC. ID. N°: 2, 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 la secuencia mencionada 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).

5 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  
10 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  
15 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,  
20 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  
25 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.  
35

El medio utilizado para cultivar las células hospedadoras transformadas puede ser cualquier medio adecuado para cultivar las células hospedadoras en cuestión. La  $\beta$ -(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.  
40

La invención también proporciona una preparación enzimática útil para la degradación o modificación de materiales que contienen  $\beta$ -(1,6)-glucano, por ejemplo, el material de la pared celular microbiana, que comprende, al menos, una enzima con actividad  $\beta$ -(1,6)-glucanasa de la invención. Dicha preparación enzimática puede contener entre 0,01% y 100% en peso de dicha enzima con actividad  $\beta$ -(1,6)-glucanasa de la invención.  
45

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  $\beta$ -(1,6)-glucanasa de la invención.  
50

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  $\beta$ -(1,6)-glucanasas,  $\beta$ -(1,3)-glucanasas, mananasas, endo- o exo- quitinasas, quitosanasas, proteasas,  $\alpha$ - o  $\beta$ -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.  
55  
60

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.  
65

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

## ES 2 205 982 B1

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.

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.

La enzima de la invención puede ser utilizada para degradar o modificar materiales que contienen  $\beta$ -(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 animales, 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 contiene un complejo proteína-manano y un glucano, la preparación enzimática podría contener, ventajosamente, una mezcla de actividades proteasa, mananasa, quitinasa y  $\beta$ -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 vínicas; 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.

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.

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.

### Ejemplo 1

#### Cultivo de *T. harzianum*

*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%.

Para la producción y purificación de la enzima 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].

Brevemente, para la producción de BGN16.3, en una primera etapa se inoculan esporas de *T. harzianum* a una concentración final de  $10^8$  esporas/ml en medio Czapek [ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,5 g/l;  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,01 g/l; KCl 0,425 g/l;  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ , 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. En este medio de preinducción se

## ES 2 205 982 B1

cultiva *T. harzianum* durante 48 horas a 28°C y con agitación orbital a 200 rpm. Posteriormente, se recoge el micelio, se lava y se transfiere a un medio de inducción bien en presencia de paredes celulares de hongos o bien en ausencia de fuente de carbono.

### 5 Ejemplo 2

#### *Ensayo de la actividad $\beta$ -(1,6)-glucanasa*

La actividad  $\beta$ -(1,6)-glucanasa se determina mediante un ensayo que consiste en preparar una mezcla de ensayo 10 conteniendo 0,8 ml de solución de pustulano [ $\beta$ -(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 incuba 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 15 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 concentraciones comprendidas entre 0 y 1 mg/ml. Se incluyen blancos de enzima y de sustrato.

Se define 1 unidad de actividad  $\beta$ -(1,6)-glucanasa como la cantidad de enzima que libera 1  $\mu$ mol de equivalentes 20 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].

### Ejemplo 3

#### 25 *Purificación de la enzima BGN16.3*

Para la purificación de la enzima BGN16.3 se siguió un procedimiento constituido por las siguientes etapas:

##### 30 a) *Precipitación con sulfato amónico*

Esta etapa, al igual que todas las demás (salvo que se indique lo contrario) se realizó a 4°C. Cultivos de *T. harzianum* 35 incubados durante 48 horas en medio Czapek suplementado con paredes celulares de *Botrytis* al 0,1% 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 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.

##### 40 b) *Adsorción-digestión a pustulano*

Para la adsorción a pustulano (*Umbilicaria papulosa*, Calbiochem) se incuban alícuotas de 3 ml de sobrenadante 45 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 50 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 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.

##### 55 c) *Cromatofoco*

La solución dializada procedente de la etapa b) se somete a cromatofoco. Para ello se utiliza una columna 60 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 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 65 la columna y 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  $\beta$ -1,6-glucanasa. Las fracciones que presentaron mayor actividad se concentraron hasta 0,5 ml aproximadamente con un concentrador Centricon 10 (Amicon, Beverly, Mass.).

##### d) *Filtración en gel*

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,



## ES 2 205 982 B1

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 280 nm.

### Ejemplo 4

5

#### *Determinación del peso molecular de la enzima BGN16.3*

El peso molecular de la enzima BGN16.3 se determinó por electroforesis analítica en condiciones desnaturalizantes. La electroforesis de la enzima BGN16.3 en condiciones desnaturalizantes [electroforesis en gel de poliacrilamida 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 la enzima BGN16.3, en las condiciones ensayadas, es de 47,5 kDa.

### 15 Ejemplo 5

#### *Determinación del punto isoeléctrico de la enzima BGN16.3*

Para determinar el punto isoeléctrico (pI) de la enzima 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 la enzima BGN16.3 se calculó por referencia a proteínas marcadoras convencionales con valores de pI comprendidos entre 3,5 y 9,3 (Amersham- Pharmacia). El valor de pI aparente calculado mediante isoelectroenfoque fue de 4,5 para la BGN16.3.

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

### 30 Ejemplo 6

#### *Efecto de la temperatura sobre la estabilidad de la enzima BGN16.3*

Para conocer la estabilidad de la enzima BGN16.3 purificada frente a la temperatura se incubó dicha enzima purificada durante 30 minutos 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 para la BNG16.3.

### 40 Ejemplo 7

#### *Temperatura óptima*

La temperatura óptima de la enzima BGN16.3 se determinó 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.

### Ejemplo 8

#### *Especificidad para los sustratos*

Para estudiar la especificidad para diferentes sustratos de la enzima BGN16.3 purificada se ha ensayado su actividad enzimática frente a diversos sustratos que tenían enlaces  $\alpha$ - o  $\beta$ -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].

La hidrólisis de los sustratos mediante la enzima BGN16.3 purificada se realizó incubando 4 mg de pustulano o 2 mg de gentibiosa (un  $\beta$ -1,6-disacárido) con 2  $\mu$ 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).

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

# ES 2 205 982 B1

TABLA 2

*Especificidad de BGN16.3 para distintos sustratos*

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

[NR: No realizado]

El pustulano (de *Umbilicaria papullosa*) y el paquiman (de *Porfia 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 BGN16.3 es específica de su sustrato (pustulano) [ $\beta$ -1,6-glucano], actúa en mucha menor medida sobre el glucano de levadura [ $\beta$ -1,3; $\beta$ -1,6 glucano (4:1)] y muestra una actividad muy reducida frente a la laminarina, un polisacárido formado fundamentalmente por  $\beta$ - (1,3)-glucano que posee un 15% aproximadamente de enlaces tipo  $\beta$ -(1,6)-glucosídicos que serían los que se hidrolizarían. No se detectó actividad con los otros sustratos ensayados.

## Ejemplo 9

### *Constante de Michaelis-Menten*

Para estudiar la afinidad de la enzima BGN16.3 para sus sustratos, se realizaron ensayos usando diferentes concentraciones de pustulano. La constante de Michaelis-Menten (Km) se determinó 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:

- Km: 1,1 mg de pustulano/ml
- Vmax: 391  $\mu$ mol de producto/minuto-mg de BGN16.3

## Ejemplo 10

### *Hidrólisis de paredes celulares fúngicas*

Se ha estudiado la capacidad que posee la enzima BGN16.3 purificada para degradar paredes celulares de distintos hongos. Para ello, se incubó la enzima purificada (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.

Los hongos ensayados fueron *Botrytis cinerea* CECT 2100, *Giberella fujikuroi* IMI 58289, *Phytophthora syringae* CECT 2351 y *Saccharomyces cerevisiae* (levadura de panadería La Cinta Roja<sup>®</sup>, 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 enzima BGN16.3 no ejerce actividad enzimática sobre ninguna de las paredes celulares ensayadas.

# ES 2 205 982 B1

TABLA 3

Acción lítica de BGN16.3 sobre paredes celulares

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

## Ejemplo 11

### Ensayo de la actividad antifúngica

Para determinar la actividad antifúngica de la enzima BGN16.3 se realizó el siguiente ensayo. En un pocillo de una microplaca se crecen 3.000 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 analiza tanto la inhibición de la germinación de las esporas como la disminución del tamaño de las hifas de *Penicillium digitatum*.

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que la enzima BGN16.3, a una concentración de 70 µg/ml, produce una reducción del tamaño de las hifas del 50% respecto del control, no observándose efecto de inhibición de la 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 3.000 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* debido a la acción antifúngica de la enzima BGN16.3.

## Ejemplo 12

### Clonación de la secuencia de ADN que codifica para la enzima BGN16.3

Para obtener el clon completo de cDNA de la enzima 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 la enzima BGN16.3.

Para el diseño del oligonucleótido directo se utilizó la secuencia del extremo amino de la enzima BGN16.3 mientras que para el diseño del oligonucleótido inverso se utilizó la secuencia del péptido interno (fragmento tríptico).

Con dichos oligonucleótidos y bajo las condiciones experimentales que se describen más adelante [véase el Ejemplo 12.5] se obtuvo una banda específica de la secuencia codificante para la enzima BGN16.3 que se subclonó en un vector pGEM-T. La secuenciación de la banda amplificada confirmó que se trataba de un fragmento del clon buscado. 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.

#### 12.1 Extracción del ADNq

El ADNq 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.

#### 12.2 Extracción del ARN total

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.

## ES 2 205 982 B1

### 12.3 Construcción de una genoteca de ADNc

A partir del ARN total de *T. harzianum* CECT 2413, obtenido tras cultivar dicho hongo en MM con 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). Finalmente, para empaquetar el ADNc ligado al fago  $\lambda$  se empleó el kit de empaquetamiento "Gigapack III gold packaging extract" (Stratagene), siguiendo las instrucciones del fabricante.

### 12.4 Microsecuenciación de proteínas

Para determinar el extremo amino de la enzima 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].

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Extremo amino: AAGAQAYASNQAGN [SEC. ID. N°: 3]

Péptido interno: GLNSNLQIFGSPW [SEC. ID. N°: 4]

### 12.5 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para los experimentos de PCR se diseñaron oligonucleótidos degenerados a partir de las secuencias parciales de la enzima BGN16.3. En este caso, los oligonucleótidos directo e inverso fueron los siguientes:

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

inverso: 5'-CCANGGNTNCCRAANATYTG-3' [SEC. ID. N°: 6]

donde

N es inosina;

Y es T o C;

R es G o A; y

D es A o G o T

Para la realización de la PCR se emplearon las siguientes condiciones:

- 1 ciclo de desnaturalización a 95°C durante 1 minuto, seguido de

- 35 ciclos de síntesis compuestos por:

- una fase de hibridación a 50°C durante 1 minuto,

- una fase de elongación a 72°C durante 1 minuto, y

- 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.

La PCR se realizó utilizando ADNg como molde y empleando 100 pmoles de cada oligonucleótido, para un volumen total de PCR de 25  $\mu$ l.

### 12.6 Escrutinio de la genoteca de ADNc

El escrutinio de la genoteca de ADNc 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  $\alpha^{32}$ 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" [Pharmacia, Suecia] y se siguieron las instrucciones del fabricante.

## ES 2 205 982 B1

### 12.7 Clonación del ADNc correspondiente a la enzima BGN16.3

Para el diseño del oligonucleótido directo se utilizó la secuencia del extremo amino de la BGN16.3 [SEC. ID. N°: 3] y para el diseño del oligonucleótido inverso se utilizó la secuencia de un péptido interno [SEC. ID. N°: 4].

5

Con dichos oligonucleótidos y bajo las condiciones experimentales previamente descritas [véase el Ejemplo 12.5] 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  $\lambda$  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 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 1,7 kpb que englobaba completamente la ORF y algo de la secuencia flanqueante de la región promotora y terminadora.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una enzima con actividad  $\beta$ -(1,6)-endoglucanasa **caracterizada** porque tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre:
- a) la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC. ID. N°: 1, y
  - b) una secuencia de aminoácidos sustancialmente homóloga y funcionalmente equivalente a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC. ID. N°: 1.
- 10 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 46 kDa aproximadamente.
- 20 4. Enzima según la reivindicación 2, **caracterizada** porque tiene un punto isoeléctrico aparente de 4,1, determinado por isoelectroenfoque.
- 25 5. Una secuencia de ADN aislado que comprende una secuencia de ADN que codifica para una enzima según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o para un fragmento funcionalmente equivalente de dicha enzima.
6. Secuencia de ADN según la reivindicación 5, **caracterizada** porque tiene una secuencia de nucleótidos seleccionada entre:
- a) la SEC. ID. N°: 2, y
  - 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).
- 35 7. Un vector recombinante **caracterizado** porque contiene una secuencia de ADN según cualquiera de las reivindicaciones 5 ó 6.
- 40 8. Una célula **caracterizada** porque contiene una secuencia de ADN según cualquiera de las reivindicaciones 5 ó 6, o un vector según la reivindicación 7.
- 45 9. Un método para la producción de una enzima según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende cultivar una célula según la reivindicación 8 bajo condiciones que permiten la producción de la enzima y recuperar la enzima del medio de cultivo.
- 50 10. Una preparación enzimática útil para la degradación o modificación de materiales que contienen  $\beta$ -(1,6)-glucano, que comprende, al menos, una enzima según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
- 55 11. Preparación enzimática según la reivindicación 10, que comprende entre 0,01% y 100% en peso de una enzima según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
- 60 12. Preparación enzimática según la reivindicación 10, que contiene como único componente una enzima según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
- 65 13. Preparación enzimática según la reivindicación 10, que contiene más de una enzima según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
14. Preparación enzimática según la reivindicación 10, que comprende, además, al menos una enzima seleccionada del grupo formado por celulasas, glucanasas, mananasas, quitinasas, proteasas y/o quitosanasas.
15. Una composición antifúngica que comprende, al menos, una enzima según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 junto con, al menos, un fungicida químico.
16. Composición según la reivindicación 15, 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.

## ES 2 205 982 B1

17. Composición según la reivindicación 15, que comprende, además, al menos, una proteína con actividad enzimática degradadora de la pared celular microbiana.

5 18. Empleo de una enzima según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o de una preparación enzimática según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 14, o de una composición antifúngica según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17, para degradar o modificar *ex vivo* materiales que contienen  $\beta$ -(1,6)-glucano.

10 19. Empleo según la reivindicación 18, en el que dicho material que contiene  $\beta$ -(1,6)-glucano es una pared celular microbiana.

20. Empleo según la reivindicación 18, en el que dicha enzima, preparación enzimática o composición antifúngica se utiliza para la preparación de protoplastos.

15 21. Empleo según la reivindicación 18, en el que dicha enzima, preparación enzimática o composición antifúngica se utiliza para la preparación de extractos de levaduras.

22. Empleo según la reivindicación 18, en el que dicha enzima, preparación enzimática o composición antifúngica se utiliza en la extracción de manoproteínas.

20 23. Empleo según la reivindicación 18, en el que dicha enzima, preparación enzimática o composición antifúngica se utiliza en la producción de vinos, mostos y zumos.

24. Empleo según la reivindicación 18, en el que dicha enzima, preparación enzimática o composición antifúngica se utiliza en la elaboración de composiciones para retirar la placa dental.

25 25. Empleo según la reivindicación 18, en el que dicha enzima, preparación enzimática o composición antifúngica se utiliza en la elaboración de composiciones para la limpieza de dientes y dentaduras.

30 26. Empleo según la reivindicación 18, 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.

27. Empleo según la reivindicación 18, en el que dicha enzima, preparación enzimática o composición antifúngica se utiliza en la elaboración de composiciones para la limpieza de lentes de contacto.

35 28. Empleo según la reivindicación 18, en el que dicha enzima, preparación enzimática o composición antifúngica se utiliza en la eliminación de hongos sobre recubrimientos.

40 29. Empleo según la reivindicación 18, en el que dicha enzima, preparación enzimática o composición antifúngica se utiliza para tratar tejidos.

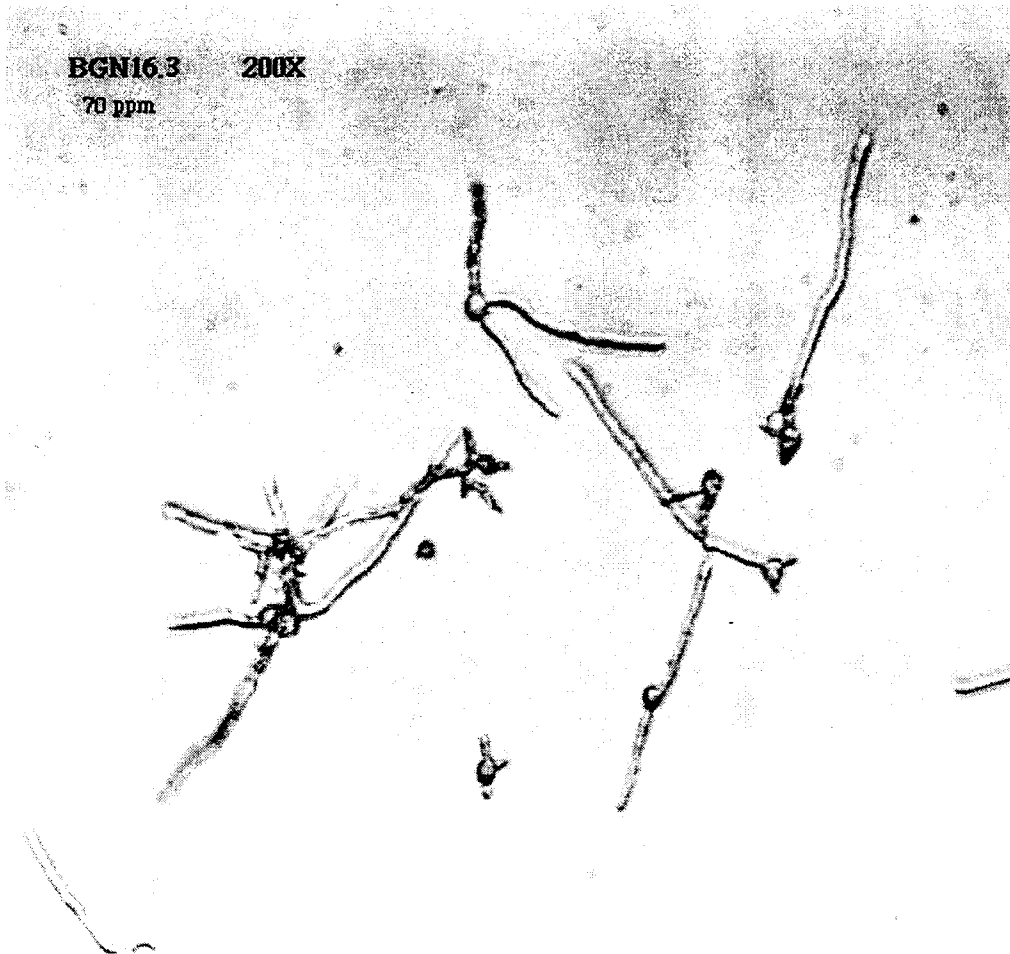
45 30. Método para controlar hongos perniciosos seleccionados entre hongos patógenos de plantas, hongos contaminantes de cosechas y hongos contaminantes de alimentos, que comprende poner en contacto dichos hongos con una enzima según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o con una preparación enzimática según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 14, o con una composición antifúngica según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17.

50 31. Empleo de una enzima según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o de una preparación enzimática según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 14, o de una composición antifúngica según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17, en la elaboración de un medicamento para el tratamiento o prevención de enfermedades causadas por hongos patógenos de animales, incluido el hombre.

55

60

65



**FIGURA 1A**



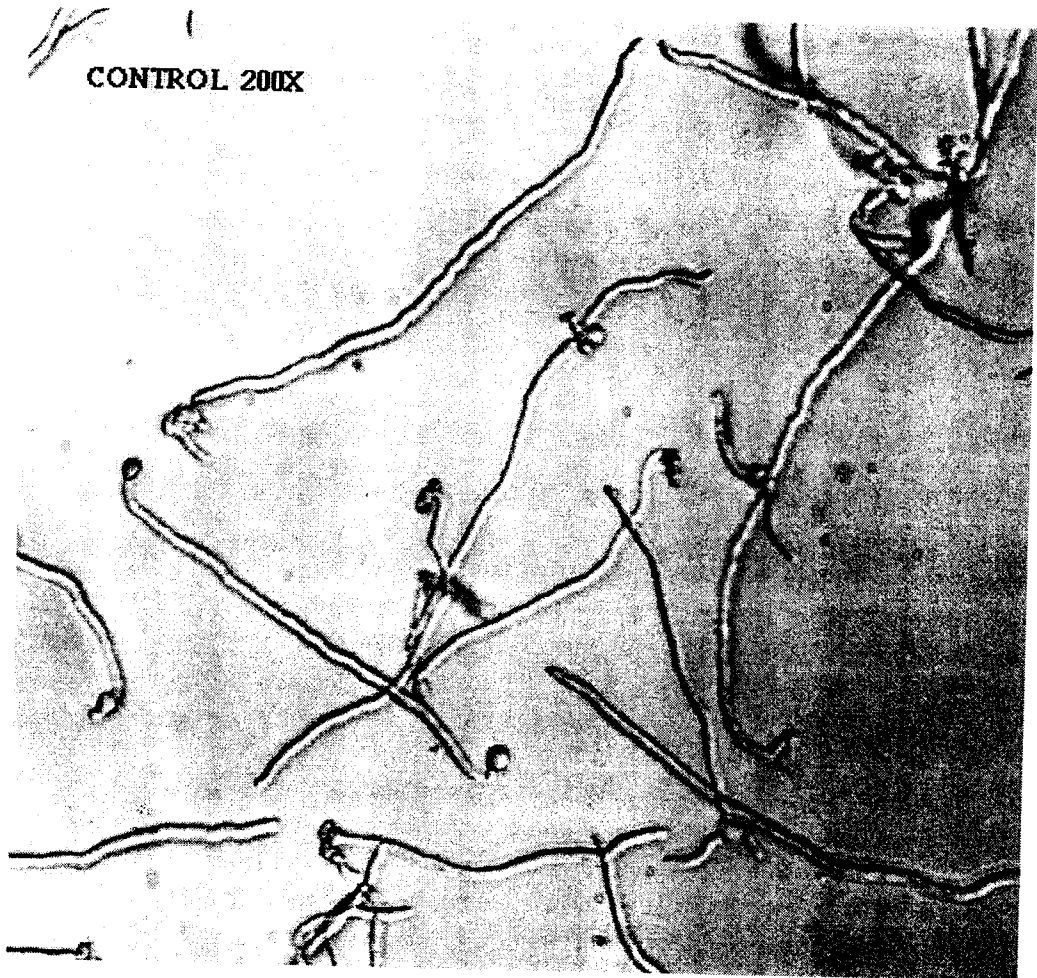


FIGURA 1B

# ES 2 205 982 B1

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> Newbiotechnic, S.A.  
<110> Universidad de Salamanca  
5 <110> Universidad de Sevilla  
<120> Enzima con actividad  $\beta$ -(1,6)-endoglucanasa  
<160> 6  
10 <170> PatentIn version 2.0  
<210> 1  
<211> 490  
<212> aminoácidos  
15 <220> proteína  
<240>  
<400> 1  
20  
Met Arg Tyr Ala Leu Ile Ala Ser Met Leu Gly Gln Ala Ala Ile Ser  
1 5 10 15  
25 Val Ala Met Pro Ser Glu Pro Ala His Ser Pro Arg Ala Ala Gly Ala  
20 25 30  
Gln Ala Tyr Ala Ser Asn Gln Ala Gly Asn Tyr Lys Leu Thr Ser Ile  
30 35 40 45  
Ala Ala Pro Val Gln Gly Asn Gly Ser Pro Gly Pro Ser Thr Trp Asn  
35 50 55 60  
Leu Ser Ile Asp Asp Thr Ser Ser Gly Tyr Lys Gln Lys Ile Val Gly  
65 70 75 80  
40 Phe Gly Ala Ala Val Thr Asp Ala Thr Val Ser Ala Phe Asn Glu Leu  
85 90 95  
Ser Ala Ser Thr Leu Ser Gln Leu Leu Asp Glu Leu Met Thr Gly Ala  
45 100 105 110  
Gly Ala Ser Phe Ser Leu Met Arg His Thr Ile Gly Ala Ser Asp Leu  
50 115 120 125

55

60

65

ES 2 205 982 B1

Ser Gly Asp Pro Ala Tyr Thr Tyr Asp Asp Asn Gly Gly Asn Ala Asp  
 130 135 140  
 5 Pro Gly Met Thr Gly Phe Asn Leu Gly Asp Arg Gly Thr Ala Met Ala  
 145 150 155 160  
 10 Thr Met Leu Ala Gln Met Lys Gly Leu Asn Ser Asn Leu Gln Ile Phe  
 165 170 175  
 Gly Ser Pro Trp Ser Ala Pro Gly Trp Met Lys Leu Asn Asn Ala Ile  
 15 180 185 190  
 Asp Gly Asn Thr Asn Asn Asn Asn Leu Asn Asp Gly Tyr Leu Thr Asn  
 195 200 205  
 20 Asn Gly Ala Gln Tyr Ser Ala Ala Phe Ala Gln Tyr Phe Val Lys Tyr  
 210 215 220  
 Ile Gln Ala Phe Glu Ser His Gly Ala Thr Ile Asn Ala Ile Thr Leu  
 25 225 230 235 240  
 Gln Asn Glu Pro Leu Asn Ser Gln Ala Gly Tyr Pro Thr Met Tyr Met  
 245 250 255  
 30 Phe Ser Tyr Glu Gln Gly Asp Leu Ile Gln Asn Tyr Val Ala Pro Ala  
 260 265 270  
 35 Leu Lys Ala Ala Gly Leu Ser Thr Lys Ile Trp Ala Tyr Asp His Asn  
 275 280 285  
 Thr Asp Gln Pro Asp Phe Pro Glu Gln Val Met Gly Ile Ala Ala Asp  
 40 290 295 300  
 Asp Val Ser Ala Val Ala Trp His Cys Tyr Ala Thr Asn Leu Asp Trp  
 305 310 315 320  
 45 Thr Val Leu Thr Asn Phe His Asn Ser Tyr Pro Asn Thr Asp Gln Tyr  
 325 330 335  
 Met Thr Glu Cys Trp Thr Pro Ser Thr Gly Ala Trp Asn Gln Ala Ala  
 50 340 345 350  
 Ser Phe Thr Met Gly Pro Leu Gln Asn Trp Ala Arg Gly Val Ala Ala  
 55 355 360 365  
 Trp Thr Leu Gly Thr Thr Ala Gln Asp Gly Pro His Leu Ser Ser Gly  
 370 375 380  
 60 Gly Cys Gly Thr Cys Thr Gly Leu Val Thr Ile Asn Asn Gly Gln Tyr  
 385 390 395 400  
 65

ES 2 205 982 B1

Thr Phe Gln Thr Ala Tyr Tyr Met Met Ala Gln Phe Ser Lys Phe Met  
 405 410 415  
 5 Pro Val Gly Ala Thr Val Leu Ser Gly Thr Gly Ser Tyr Thr Tyr Ser  
 420 425 430  
 10 Gly Ser Gly Gly Val Gln Ser Val Ala Ser Leu Asn Pro Asp Gly Thr  
 435 440 445  
 Arg Thr Val Val Ile Glu Asn Thr Phe Gly Asn Asp Ile Tyr Ile His  
 450 455 460  
 15 Leu Ser Thr Ser Ser Gly Gln Glu Trp Ser Gly Asn Val Pro Thr Asn  
 465 470 475 480  
 20 Ser Val Thr Thr Trp Val Leu Pro Ala Val  
 485 490

<210> 2

25 <211> 1.696

<212> nucleótidos

<220> AND genómico

<400> 2

30  
 TGAAGATCGA CAGCTCAAGC TCTTCAAAGG TTGTAAGCTA CAAGTCAAAG ACACTTTCAA 60  
 GTTCCCAAAC CGCCAAAATG CGTTACGCTC TCATCGCCTC CATGCTTGGC CAAGCAGCCA 120  
 35 TCAGCGTTGC TATGCCTTCG GAGCCCCTC ACAGCCCTCG TGCTGCCGGT GCTCAGGCCT 180  
 ACGCATCCAA CCAGGCCGGT AACTACAAGC TCACCTCCAT TGCTGCTCCC GTTCAAGGCA 240  
 ATGGAAGCCC TGGCCCATCT ACTTGGAAAC TGTCCATCGA CGACACCAGC AGTGGTTACA 300  
 40 AGCAGAAGAT CGTCGGTTTC GGTGCTGCCG TGACTGATGC CACCGTCTCT GCCTTCAACG 360  
 AGCTGTCTGC CAGCACCTC AGCCAGCTGC TCGACGAGCT CATGACTGGT GCTGGTGCCA 420  
 GCTTCTCTCT CATGCGCCAC ACCATCGGTG CCTCTGACTT GTCTGGCGAC CCAGCCTACA 480  
 CTTATGACGA CAACGGCGGC AACGCTGACC CTGGCATGAC TGGCTTCAAC CTCGGAGACC 540  
 45 GTGGTACTGC CATGGCCACC ATGCTGGCTC AGATGAAGGG CCTCAACTCC AACCTCCAGA 600  
 TCTTTGGATC TCCCTGGAGT GCTCCTGGAT GGATGAAGCT GAACAACGCC ATTGACGGCA 660  
 ACACCAACAA CAACAACCTG AACGATGGTT ACCTCACCAA CAACGGTGCT CAGTACTCGG 720  
 50 CCGCTTTTGC CCAGTACTTT GTCAAGTACA TCCAGGCATT CGAGTCGCAC GGCGCCACCA 780  
 TCAATGCCAT TACCCTCCAG AACGAGCCCC TGAACAGCCA GGCTGGCTAT CCCACCATGT 840  
 ACATGTTCTC GTACGAGCAG GGAGACCTGA TCCAGAATA CGTCGCCCT GCCTTGAAGG 900  
 55 CGGCCGGTCT GAGCACCAAG ATCTGGGCTT ACGACCACAA CACTGACCAA CCTGATTTCC 960  
 CCGAGCAGGT CATGGGCATC GCCGCAGACG ATGTCTCTGC CGTTGCATGG CACTGCTATG 1020  
 CCACTAACCT GGACTGGACT GTCCTGACCA ACTTCCACAA CTCCTACCCC AACACTGACC 1080  
 60 AGTACATGAC TGAGTGCTGG ACCCCCTCCA CTGGTGCTTG GAACCAGGCC GCCTCCTTCA 1140  
 CCATGGGCC TCTCCAGAAC TGGGCCCGTG GTGTTGCTGC ATGGACCCTC GGCACCACTG 1200

65

# ES 2 205 982 B1

	CCCAGGACGG CCCTCACCTG TCCAGCGGTG GCTGCGGCAC TTGCACTGGT CTCGTCACCA	1260
	TCAACAACGG CCAGTACACC TTCCAGACTG CTTACTACAT GATGGCTCAG TTCTCCAAGT	1320
5	TCATGCCCGT TGGAGCCACC GTCCTGAGCG GCACTGGCAG CTACACTTAC TCCGGCAGCG	1380
	GCGGTGTTCA GTCTGTTGCT TCTCTCAACC CCGATGGCAC CCGCACGGTC GTCATCGAGA	1440
	ACACCTTCGG CAACGACATT TACATCCACC TGAGCACCTC CAGTGGCCAG GAGTGGAGCG	1500
10	GCAACGTCCC TACCAACTCT GTCACCACCT GGGTCCTCCC CGCTGTTTAA GCAGATTACG	1560
	GATTGTTGGA GATGAAGGAA CCTTTGATGT AAATATTTGT CTACATGTGG ATTTGCCACT	1620
	GCACATACGT ATCTGGGGAT TATTTACCAT GCTGTAGAAT GAATGAATAC GGTTAGCCTA	1680
15	AAAAAAAAAA AAAAAA	1696

<210> 3

<211> 14

20 <212> aminoácidos

<220> péptido

<240> fragmento N-terminal

<400> 3

25

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

30

<210> 4

<211> 13

<212> aminoácidos

35 <220> péptido

<240> fragmento interno

<400> 4

40

	Gly	Leu	Asn	Ser	Asn	Leu	Gln	Ile	Phe	Gly	Ser	Pro	Trp
	1				5					10			

45

<210> 5

<211> 20

<212> nucleótidos

<213> secuencia artificial de ADN

50 <400> 5

GCTGGNGCNC ARGCNTAYGC

20

55 [N = Inosina]

<210> 6

<211> 21

60 <212> nucleótidos

<213> secuencia artificial de ADN

<400> 6

65

CCANGGNCTN CCRAANATYT G

21

[N = Inosina]



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 205 982

② Nº de solicitud: 200101807

③ Fecha de presentación de la solicitud: 31.07.1999

④ Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

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

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	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.	1-31
Y	LORA, I.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.	1-31
A	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, nº 7, páginas 1864-1871. Todo el documento.	1-31

#### 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 nº:

Fecha de realización del informe

06.04.2004

Examinador

J.L. Vizán Arroyo

Página

1/1