



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 360 529**

51 Int. Cl.:

<b>C11D 3/386</b> (2006.01)	<b>C12N 9/42</b> (2006.01)
<b>D06M 16/00</b> (2006.01)	<b>D06P 5/13</b> (2006.01)
<b>D06P 5/15</b> (2006.01)	<b>D06P 5/02</b> (2006.01)
<b>D21C 5/00</b> (2006.01)	<b>C12S 11/00</b> (2006.01)
<b>D21H 17/00</b> (2006.01)	<b>D21H 21/10</b> (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05109384 .7**

96 Fecha de presentación : **08.03.1995**

97 Número de publicación de la solicitud: **1632557**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **08.03.2006**

54

Título: **Nuevas celulasas alcalinas.**

30

Prioridad: **08.03.1994 DK 270/94**  
**30.03.1994 DK 365/94**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**06.06.2011**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**06.06.2011**

73

Titular/es: **NOVOZYMES A/S**  
**Krogshøjvej 36**  
**2880 Bagsværd, DK**

72

Inventor/es: **Schülein, Martin;**  
**Rosholm, Peter;**  
**Nielsen, Jack Bech;**  
**Hansen, Svend Aage y**  
**Osten, Claus von der**

74

Agente: **Tomás Gil, Tesifonte Enrique**

ES 2 360 529 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Nuevas celulasas alcalinas.

5 La presente invención se refiere a una celulasa capaz de eliminar suciedad de tejido, una composición detergente que comprende la celulasa, un método de tratamiento de tejido manchado con la enzima celulolítica, y uso de la celulasa p. ej. en composiciones detergentes, en suavizantes de tejido, para la clarificación de color de tejidos textiles (eliminación de pelusas y bolitas), para evitar la redeposición en el lavado del tejido, para eliminar la suciedad, para el desentintado de papel usado, y para reciclar pasta de papel.

10 **Antecedentes de la invención**

15 El lavado repetido de los tejidos, especialmente tejidos que contienen celulosa, suelen causar una aspereza en el tejido usado. El uso de celulasas, es decir enzimas celulolíticas, para la reducción de la aspereza de los tejidos que contienen celulosa, p. ej. algodón, fue sugerido y demostrado hace mucho tiempo.

20 La explotación práctica de las celulasas ha sido, hasta cierto punto, atrasada por la naturaleza de las preparaciones con celulasa conocidas que suelen ser mezclas complejas de una variedad de componentes individuales de celulasa, y que pueden tener una actividad específica más bien baja. Es difícil optimizar la producción de componentes individuales en múltiples sistemas enzimáticos y así llevar a cabo una producción industrial de celulasas con buena relación entre coste y eficacia, y su uso real ha sido impedido por las dificultades que surgen de la necesidad de emplear cantidades más bien grandes de enzimas para conseguir el efecto deseado.

25 Los inconvenientes de las celulasas previamente sugeridas pueden ser remediados usando enzimas monocomponentes seleccionadas por una alta actividad específica. Las celulasas monocomponentes están descritas en, p. ej. WO 91/17243, WO 91/17244 y WO 91/10732.

30 P. ej. en WO 91/17244 se describe una enzima de degradación de celulosa (una celulasa) derivable de un hongo distinto a *Trichoderma* o *Phanerochaete* que comprende un dominio de enlace de carbohidrato homólogo a una región A-terminal de celulasas de *Trichoderma reesei*, el dominio de enlace de carbohidrato siendo capaz de efectuar el enlace de la enzima a un sustrato celulósico insoluble, que puede ser empleado para el tratamiento textil, p. ej. para reducir la aspereza de tejidos que contienen algodón y para eliminar la suciedad y clarificar el color de tejidos. En el ejemplo 3 y fig. 13 se describe la preparación de una endoglucanasa de la familia C de *Fusarium oxysporum* y la secuencia de ADN y secuencia de aminoácidos derivada, respectivamente. Más tarde se descubrió que la secuencia de aminoácidos descrita no era correcta; la secuencia correcta está publicada en Sheppard, P.O., Grant, F.J., Oort, P.J., Sprecher, C.A., Foster, D.C., Hagen, F.S., Upshall, A., Mcknight, G.L. y Ohara, P.J.: Uso de secuencias específicas de familias de celulasa conservadas para clonar ADNc de homólogos de celulasa de *Fusarium oxysporum*. Gen. 150:163-167, 1994. En el ejemplo 4 y Fig. 14A-E se describe la preparación de una endoglucanasa I de *Hemicola insolens* (EG I) y la secuencia de ADN y secuencia de aminoácidos derivada, respectivamente. Además, en el ejemplo 4 (página 32, línea 1 a 5) se describe la construcción del plásmido de expresión de una EG I truncada (denominada EG I') donde los últimos 13 aminoácidos de la región de codificación fueron eliminados y se alteró Val a Leu en la posición 421 (posición 401 en la secuencia de la enzima). El quid de la invención descrita en WO 91/17244 es proporcionar una celulasa que, además de la holoenzima, tenga un dominio de enlace de carbohidrato (CBD) que sea homólogo a la región A de las celulasas de *Trichoderma reesei*, puesto que se pensó que la función del CBD en la molécula de enzima mediaba el enlace a sustratos sólidos incluyendo celulosa y consecuentemente potenciaba la actividad de tales enzimas hacia tales sustratos.

50 El problema subyacente de la presente invención es obtener endoglucanasas monocomponentes que tengan una actividad enzimática mejorada en un rango de pH alcalino, mientras ejerza a la vez una acción celulolítica moderada en el sustrato celulósico. En otras palabras, la endoglucanasa no debería destruir el sustrato celulósico como tal. Por ejemplo, cuando el sustrato es un tejido celulósico, la endoglucanasa usada no debería suponer una pérdida de fuerza de tracción sustancial del tejido. La actividad alcalina mejorada de la enzima es también esencial, puesto que la mayoría de las aplicaciones de endoglucanasas tienen lugar ventajosamente en un rango de pH alcalino.

55 **Resumen de la invención**

60 Sorprendentemente, se acaba de descubrir que determinadas celulasas que no comprenden un dominio de enlace de carbohidrato, es decir, consisten esencialmente en la holoenzima, o que al menos no comprenden un dominio de enlace de carbohidrato que sea homólogo a la región A de las celulasas de *Trichoderma reesei*, pueden tener una actividad mejorada. Esto puede por ejemplo suponer una mejor eliminación de suciedad de los tejidos.

Las celulasas de la invención son endoglucanasas según se define en las reivindicaciones. Pueden tener el residuo de aminoácido triptófano (Trp o W) en la posición correspondiente a la posición 55 del marco de homología estructural en la Figura 5.

65 Más específicamente, se ha descubierto que las celulasas seleccionadas del grupo consistente en celulasas clasificadas en la familia 7 como se describe en Henrissat, B. *et al.*: Biochem. J. (1993), 293, p. 781-788, y variantes de celulasa derivada de una celulasa madre clasificada en la familia C, comprendiendo un núcleo y opcionalmente un

## ES 2 360 529 T3

enlace C-terminal consistente en 10 aminoácidos como mucho, puede resultar excelente en detergentes con respecto a la eliminación de suciedad en comparación con las celulasas conocidas.

5 En un aspecto, la invención se refiere a endoglucanasas que pueden ser truncadas, p. ej. genéticamente truncadas, variantes de endoglucanasas conocidas, y su uso, p. ej. para lavar, limpiar, desentintar y elaborar pasta de papel.

Las endoglucanasas presentes son útiles p. ej. para eliminar la suciedad y pueden así ser aplicadas a composiciones detergentes, aditivos detergentes y/o suavizantes para tejidos.

10 Otros usos de las presentes endoglucanasas son la clarificación de color de tejidos textiles (eliminación de pelusas y bolitas), prevención de la redeposición en el lavado del tejido, eliminación de suciedad, desentintado de papel usado, y para reciclar pasta de papel.

### Descripción detallada de la invención

15 En la presente descripción y reivindicaciones, el término “celulasa” denota una enzima que hidroliza celulosa. La celulosa puede ser un componente que ocurre en un sistema de celulosa producido por un microorganismo dado, dicho sistema de celulosa comprendiendo principalmente diferentes componentes enzimáticos de celulosa incluyendo aquellos normalmente identificados como p. ej. celobiohidrolasas, exocelobiohidrolasas, endoglucanasas,  $\beta$ -glucosidasas. 20 De forma alternativa, la celulosa puede ser un único componente, es decir un componente esencialmente libre de otros componentes de celulosa que ocurren normalmente en un sistema de celulosa producido por un microorganismo dado, el único componente siendo un componente recombinante, es decir producido por clonación de una secuencia de ADN que codifica el único componente y subsiguiente célula transformada con la secuencia de ADN y expresada en un huésped. El huésped es preferiblemente un huésped heterólogo, aunque el huésped puede ser también, bajo ciertas 25 condiciones, el huésped homólogo.

La celulosa de la invención es una endoglucanasa como se define en las reivindicaciones.

30 El término “eliminación de suciedad” o “eliminación de partículas de suciedad”, como se utiliza aquí, se refiere a una limpieza mejorada de tejidos o prendas que contienen celulosa, p. ej. algodón, contaminados por partículas de tierra o de otra materia insoluble atrapada por microfibrillas extendidas sobre la superficie de la fibra.

En el presente contexto, el término “homólogo” o “secuencia homóloga” se entiende que indica una secuencia de aminoácidos que difiere de aquella de la figura 3 en uno o más residuos de aminoácidos. La secuencia homóloga puede 35 ser una que resulte de la modificación de una secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 3, p. ej. implicando sustitución de uno o más residuos de aminoácidos en uno o más sitios diferentes en la secuencia de aminoácidos, deleción de uno o más residuos de aminoácidos en cualquiera de los dos extremos de la enzima o en uno o más sitios en la secuencia de aminoácidos, o inserción de uno o más residuos de aminoácidos en uno o más sitios en la secuencia de aminoácidos. La modificación de la secuencia de aminoácidos puede realizarse de manera adecuada 40 modificando la secuencia de ADN que codifica la enzima, p. ej. por mutagénesis dirigida o por mutagénesis aleatoria o una combinación de estas técnicas conforme a procedimientos bien conocidos. De forma alternativa, la secuencia homóloga puede ser una de una enzima derivada de otro origen distinto a las celulasas correspondiente a la secuencia de aminoácidos mostrada en la figura 3. Así, “homólogo” puede p. ej. indicar un polipéptido codificado por ADN que hibridice a la misma sonda que el ADN que codifica la celulosa con la secuencia de aminoácidos en cuestión bajo 45 condiciones específicas determinadas (tal como lavado previo en 5xSSC y prehibridación durante 1 h a ~40°C en una solución al 20% de formamida, solución 5xDenhardt's, 50 mM de fosfato sódico, pH 6.8, y 50  $\mu$ g de ADN de timo de ternero desnaturalizado por ultrasonidos, seguido de hibridación en la misma solución completada con 100  $\mu$ M ATP durante 18 h a ~40°C). La secuencia homóloga normalmente muestra algo de homología (en términos de identidad) de al menos 50%, tal como al menos 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o incluso 95% con la secuencia de 50 aminoácidos mostrada en la figura 3.

Preferiblemente, el grado de homología está basado en la homología de la estructura tridimensional de las celulasas. Por ejemplo, el Solicitante ha preparado el alineamiento de secuencias mostrado en la Figura 5, donde las secuencias de aminoácidos de tres endoglucanasas y una celobiohidrolasa estaban alineadas:

55 EG1-F: endoglucanasa EG1 de *Fusarium oxysporum*

(fus\_eg1\_nat.pdb, a-cadena)

60 EG1-H: endoglucanasa EG1 de *Humicola insolens*

(1egl.pdb, a-cadena)

65 EG1-T: endoglucanasa EG1 de *Trichoderma reesei*

(sin estructura pdb)

## ES 2 360 529 T3

CBH1: celobiohidrolasa de *Trichoderma reesei*

(1cel.pdb, a-cadena).

5

Las referencias entre paréntesis se refieren a la identificación de la Base de Datos de Brookhaven para las entradas.

10 Inicialmente las secuencias fueron alineadas basándose en la homología de la estructura secundaria, pero la superposición y examen visual de las estructuras de rayos X de EG1-F, EG1-H y CBH1 necesitó varias modificaciones del alineamiento de secuencias. El rendimiento final en la Fi. 5 se basa en el alineamiento estructural tridimensional.

15 Los C-terminales son visibles en varias extensiones en las tres estructuras de cristales. Después del motivo común de las secuencias IGST (Res#445-449), tres residuos son visibles en EG1-F, uno en EG1-H, y cinco en CBH1. Para la comparación de secuencias en la Tabla 1 a continuación, residuos de los N-terminales al motivo C-terminal NPSG en CBH1 están incluidos (Res#453 en la Fig. 5), es decir 402 residuos desde EG1-F y EG1-H, 373 residuos desde EG1-T y 434 residuos desde CBH1.

TABLA 1

20

*Identities de secuencias calculadas en relación a las longitudes de cada una de las secuencias (sec1 & sec2)*

25

sec1\sec2	EG1-H	EG1-T	CBH1
EG1-F	58% & 58%	41% & 44%	41% & 38%
EG1-H	*****	41% & 44%	40% & 37%
EG1-T	*****	*****	47% & 40%

30

35 En la Tabla 2 a continuación, se enumeran los puentes disulfuro encontrados en EG1-F, EG1-H y CBH1. Basado en la homología estructural las posiciones equivalentes para EG1-T están indicadas.

TABLA 2

40

*Puentes disulfuro en EG1-F, EG1-H y CBH1. Basado en el alineamiento de secuencias en la Fig. 1, las posiciones equivalentes están indicadas para EG1-T. Los números se refieren a aquellos en la Fig. 5*

45

Res# (Fig. 5)	EG1-F	EG1-H	(EG1-T)	CBH1
4-75	*	*	*	4-72
19-25	18-24	18-24	19-25	19-25
52-74	48-70	51-73	47-68	50-71
64-70	60-66	63-69	58-64	61-67
148-416	138-365	140-365	137-336	138-397
182-220	172-195	172-195	169-192	172-210
186-219	176-194	176-194	173-191	176-209
240-266	215-234	215-234	212-?	230-256
248-253	223-228	223-228	217-222	238-243
271-350	239-315	239-315	?-291	261-331
EG1-H y EG1-F contienen los mismos 9 puentes disulfuro.				

60

65 La delección alrededor de Res#260 en EG1-T previene la formación de dos puentes disulfuro: C215-C234 & C239-C315 (numeración EG1-H). Es posible que la estructura de EG1-T se haya movido en relación a EG1-H y EG1-F para permitir la formación de un puente disulfuro entre C215 y C315 (C212 & C291 en la numeración de EG1-T). Los 7 puentes disulfuro restantes encontrados en EG1-F y EG1-H están también presentes en EG1-T.

## ES 2 360 529 T3

La delección alrededor de Res#260 en EG1-T previene la formación de dos puentes disulfuro: C215-C234 & C239-C315 (numeración de EG1-H). Es posible que la estructura de EG1-T se haya movido en relación a EG1-H y EG1-F para permitir la formación de un puente disulfuro entre C215 y C315 (C212 & C291 en la numeración de EG1-T). Los 7 puentes disulfuro restantes encontrados en EG1-F y EG1-H están también presentes en EG1-T.

CBH1 contiene los mismos 9 puentes disulfuro que EG1-F y EG1-H, y un puente disulfuro adicional en la región N-terminal.

CBH1 contiene la mayoría de inserciones relativas a las otras, y estas inserciones están predominantemente localizadas en los bordes del surco de enlace del sustrato, posiblemente contribuyendo al hecho de que CBH1 es una celobiohidrolasa.

Cuando se intenta explicar la actividad alcalina mejorada de EG1-H y EG1-F en relación a EG1-T, los siguientes bucles pueden ser los más interesantes, ya que contienen cargas en la proximidad del sitio activo. Las cargas pueden alterar los valores de pKa de los residuos catalíticos, e interactúan con la transferencia de electrones durante la catálisis.

a) las inserciones de 11 residuos (en relación a EG1-T) en la Pos. 229 en EG1-H y EG1-F (Res#254) se localizan sobre los residuos del sitio activo (E197; D199 & E202) y contienen 2 o 3 residuos cargados.

b) las inserciones de 5 residuos (en relación a EG1-T) en la Pos. 320 en EG1-H y EG1-F (Res#355) se localizan al final del punto de unión del sustrato y contienen 2 o 3 residuos cargados.

c) las inserciones de 2 residuos (en relación a EG1-T) en la Pos. 259 en EG1-H y EG1-F (Res#291) se localizan cerca de la inserción b) anterior, y contienen un residuo de lisina cargado.

Las composiciones de los aminoácidos de las cuatro enzimas, es decir EG1-F EG1-H, EG1-T y CBH1) incluyendo los residuos usados en la tabla 1 de identidad de secuencias arriba (es decir, incluyendo Res#453), se muestran en la tabla 3.

TABLA 3

*Composiciones de aminoácidos & valores de pKa usados para el cálculo de pI*

	EG1-F	EG1-H	EG1-T	CBH1	pKa
Asp	21	18	19	24	3.5
Asn	28	22	34	30	-
Thr	22	28	34	46	-
Ser	26	17	46	50	-
Glu	20	31	10	19	4.0
Gln	18	12	16	18	-
Pro	17	24	18	19	-
Gli	44	47	43	51	-
Ala	31	20	22	27	-
Val	21	24	19	21	-
Cys	18	18	16	20	9.3
Met	11	11	9	6	-
Ile	22	14	11	10	-
Leu	20	25	23	24	-
Tyr	16	19	19	20	9.9, 11.6 o 12.5
Phe	9	15	8	15	-
Lys	31	23	9	13	10.0
His	8	10	5	4	6.4
Trp	6	7	6	9	-
Arg	13	17	6	7	12.8
pKa asumido para Tyr 50% pH 9.9, 25% pH 11.6 & 25% Ph 12.5.					

Los puntos isoeléctricos (pI) fueron estimados para cada una de las cuatro celulasas (mostradas en la tabla 4 más abajo), utilizando valores de pKa estándares. Se asumió que los N-terminales están bloqueados, que ningún C-terminal libre está presente en las enzimas centrales, y que ninguno de los iones metálicos están enlazados. Los cálculos no consideran los efectos de desaminaciones.

## ES 2 360 529 T3

TABLA 4

*Punto Isoeléctrico*

	PI calculado	PI encontrado
EG1-F	8.9	aproximadamente 9
EG1-H	5.7	Aproximadamente 5
EG1-T	4.0	
CBH1	3.8	

La diferencia entre los valores de pI real y calculado se pueden deber a la desaminación, por ejemplo Asn a Asp, que reduce el pI real.

A partir de las composiciones de aminoácidos y los valores de pKa es posible calcular a valores diferentes de pH las cargas (parciales) en todos los aminoácidos titulables. De esta manera las cargas netas y la suma de cargas negativas y positivas fueron calculadas a pH 4, 6, 8 y 10, como se muestra en tabla 5.

Las dos celulasas alcalinas, EG1-H y EG1-F, comparten la característica común, de que sobre un intervalo amplio de pH (pH 4-10) contienen al menos 70 residuos cargados. El EG1-T ácido en cambio contiene menos de 50 residuos cargados dentro de este intervalo de pH. Las superficies más densamente cargadas de EG1-F y EG1-H pueden ser responsables del rendimiento mejorado en detergentes de lavandería en relación a EG1-T.

TABLA 5

*Cargas como función de pH. El primer número es la carga neta (p. ej. (+13) + (-17) = -4), el segundo es el número total de cargas (p. ej. |+13|+|-17|=+30)*

	EG1-F	EG1-H	EG1-T	CBH1
pH 4	+26 / 78	+21 / 79	+1/39	-4 / 52
pH 6	+9 / 90	-1 / 96	-10 / 47	-20/66
pH 8	+3/85	-9 / 89	-14/44	-23/63
pH 10	-17 / 74	-26 / 83	-24 / 45	-35 / 62

Para examinar la región del sitio activo en más detalle, los aminoácidos localizados dentro de 10 Å de los residuos de sitio activo E197; D199 y E202 fueron identificados para EG1-H y EG1-F. Los siguientes residuos pertenecen a este subconjunto de 10 Å en EG1-H (numeración EG1-H):

108, 124, 129, 131, 133, 135, 138-139, 141-151, 171-177, 193-220, 233-243, 245, 252, 266, 268, 270, 272, 280, 283, 285, 287, 310, 323, 326, 328, 331-336, 338-347, 354, 356-358, 362, 384, 386.

La unidad "Å" como se utiliza en este caso se refiere a Ångstrom, una unidad de longitud. 1 Å es igual al 0.1 nanómetro (nm).

El subconjunto de 10 Å en EG1-F contiene esencialmente los mismos residuos que el subconjunto de 10 Å EG1-H. EG1-T difiere más significativamente, en particular con respecto a los segmentos alrededor de 219-221 y 230-240 en EG1-H y EG1-F, que están ausentes en EG1-T. Aprox. 80% de identidad de secuencia existe entre EG1-F y EG1-H en el subconjunto de 10 Å, mientras que los residuos en el subconjunto equivalente de 10 Å para EG1-T son más diferentes. De interés particular son las diferencias que implican las cargas.

En el subconjunto de 10 Å varias mutaciones en EG1-H & EG1-F, que tienen como objetivo la catálisis de afectación cambiando la electrostática, son contempladas basándose en homología secuencial a EG1-T. Para reducir el pI dentro de esta región M142E, K217A, K218T (en EG1-H sólo) y R245G es contemplado, y para aumentar el pI son contemplados E150Q, I310D, E334K (en EG1-H) y D334K (en EG1-F).

Los siguientes residuos de aminoácidos están en contacto cercano con celobiosa (enlazada al EG1-F); la numeración se refiere a la numeración EG1-F:

*Enlace de hidrógeno entre enzima e inhibidor*

a) R106 conservado en las 4 celulasas

b) Y145 conservado en las 4 celulasas

## ES 2 360 529 T3

c) S345 conservado en las 4 celulasas.

*Dentro de 5 Å de celobiosa (excluyendo los tres residuos del sitio activo, y los tres residuos del enlace de H anterior)*

5 d) D34 conservado en las 4 celulasas

e) W51 también W51 en EG1-H. Este W parece ser importante para el enlace de la segunda fracción de azúcar en celobiosa (relativo al sitio activo).

10 f) S 104 conservado en las EG1s

g) A143 también A143 en EG1-H

15 h) Y171 conservado en las 4 celulasas

i) D173 conservado en las 4 celulasas

j) Q175 conservado en las 4 celulasas

20 k) Y177 no conservado

l) W347 conservado en las 4 celulasas.

25 Este W347 parece ser importante para el enlace de la primera fracción de azúcar en celobiosa (relativo al sitio activo).

La mayor parte de estos residuos son altamente conservados. Esto implica que su mutación puede no ser ventajosa, pero esto ciertamente no significa que el rendimiento de EG1s no se puede mejorar por sustitución de estos residuos. Estos están todos localizados en la región del sitio activo, y de hecho esto los hace muy interesantes, ya que los cambios en las propiedades son propensos a ser más significantes. Por lo tanto, se contempla que las sustituciones en estas posiciones son sustituciones preferidas.

35 La ventaja de EG1-H es su capacidad para inducir la eliminación de suciedad con daño de tejido mínimo. Aquello que es característico con respecto a EG1-H y EG 1-F en comparación con Carezyme (4egv.pdb) y *Thermomonospora fusca* EG 1 es un surco de enlace del sustrato comparativamente profundo, posiblemente que previene el acceso de fibras de algodón intactas en el sitio catalítico.

40 En EG1-F y EG1-H el surco de enlace del sustrato tiene una profundidad de 18-20 Å al medir las distancias entre los átomos C de los residuos del sitio activo (E197; D199 & E202) y los átomos C de los residuos localizados en el borde superior del punto de unión del sustrato (G351 & A229 en EG1-H). El punto es aprox. 19 Å de ancho, al medir entre átomos C de los dos residuos del borde.

45 En contraste, la profundidad del punto de unión del sustrato en Carezyme® (4egv.pdb), cuando se mide de una manera similar, sólo es 8-10 Å, mientras que la anchura en el borde es aprox. 9 Å.

En *T. fusca* EG1 (1tml.pdb) la profundidad del punto es aprox. 10 Å, y la anchura aprox. 18 Å.

50 La presente invención se refiere a una celulasa que es seleccionada del grupo consistente en celulasas clasificadas en la familia 7 como se describe en Henrissat, B. *et al.*: Biochem. J. (1993), 293, p. 781-788, y variantes de celulasa derivada de una celulasa madre clasificada en la familia C, donde la celulasa comprende un núcleo y opcionalmente una conexión C-terminal consistente en 10 aminoácidos como mucho, siempre que la celulasa sea diferente de la endoglucanasa que tiene la secuencia de aminoácidos relacionada en la figura 1.

55 La clasificación de Henrissat es un nuevo sistema de clasificación para glicosil hidrolasas basado en comparaciones de secuencias y análisis de agrupaciones hidrofóbicas que han demostrado que los dominios catalíticos de las glicosil hidrolasas encajan en 45 familias diferentes, de las cuales 11 (originalmente denominadas A-K) contienen enzimas con actividad celulolítica.

60 Hasta ahora han sido publicadas estructuras de los dominios catalíticos de celulasas de cuatro familias:

65 Celobiohidrolasa II (CBH II) de *Trichoderma reesei* (Rouvinen *et al.* 1990) y endocelulasa E2 de *Thermomonospora fusca* (Sapezio *et al.* 1993) de la familia 6(B), Celobiohidrolasa I (CBH I) de *T. reesei* (Divne *et al.* 1994) de la familia 7 (C),

CeIA de *Clostridium thermocellum* (Juy *et al.* 1992) de la familia 9(E); y la endoglucanasa V de *H. insolens* (Davies *et al.* 1993) de la familia 45(K).

## ES 2 360 529 T3

Las celulasas de la invención pueden ser obtenibles por o derivadas de una cepa de *Humicola*, *Trichoderma*, *Myceliophthora*, *Penicillium*, *Irpex*, *Aspergillus*, *Scytalidium* o *Fusarium*, preferiblemente de una cepa de *Humicola*, *Trichoderma*, *Myceliophthora*, *Scytalidium* o *Fusarium*, más preferiblemente de una cepa de *Humicola insolens*, *Fusarium oxysporum*, *Myceliophthora thermophila* o *Trichoderma reesei*.

La celulasa de la invención puede ventajosamente tener una o más inserciones de entre 1 y 25, preferiblemente entre 1 y 20 residuos de aminoácidos; preferiblemente la inserción es relativa a la posición EG1-Tat 230-240 en EG1-H y EG1-F y parte de la cual está localizada dentro de 10 Å de los residuos de sitio activo E197, D199 y E202.

En otro aspecto, la celulasa de la invención tiene un surco de enlace del sustrato con una profundidad de al menos 12 Å, preferiblemente 15 Å, si se mide entre los átomos C $\alpha$  de los residuos de sitio activo localizados en el fondo del surco y los átomos C $\alpha$  de los residuos localizados en el borde del surco de enlace del sustrato inmediatamente arriba de los residuos del sitio activo.

Según la invención las celulasas, que esencialmente consisten en el núcleo y opcionalmente en un enlace C-terminal teniendo 10 aminoácidos como mucho, pueden resultar excelentes para la eliminación de suciedad para la eliminación de partículas de suciedad cuando se usa para el lavado o suavizado del tejido. En la figura 1 se describe la secuencia de aminoácidos de una endoglucanasa genéticamente truncada de *Humicola insolens* de 402 residuos de aminoácidos que está descrita en WO 91/17244 como se ha mencionado anteriormente (denominada EG I'). En la figura 3 se describe la secuencia de aminoácidos de una endoglucanasa genéticamente truncada de *Humicola insolens* de 402 residuos de aminoácidos, esta endoglucanasa particular de ahora en adelante siendo denominada EG I\*. En la figura 4 se describe la secuencia de aminoácidos de una endoglucanasa genéticamente truncada de *Fusarium oxysporum*, esta endoglucanasa particular de ahora en adelante siendo denominada EGI-Fus. En la figura 6 se describe la secuencia de aminoácidos de una endoglucanasa de *Myceliophthora thermophila*. Sin estar limitados a la teoría se cree que puede obtenerse una actividad enzimática mejorada suministrando celulasas, especialmente endoglucanasas, que esencialmente consisten en un núcleo. La celulasa puede además comprender un enlace C-terminal, una "cola", que es relativamente corta, el enlace C-terminal corto no contribuyendo negativamente a la actividad enzimática. Así se cree que las celulasas de la invención pueden ser derivadas de celulasas conocidas p. ej. "truncando" el C-terminal completa o parcialmente de la proteína enzimática en cuestión. La mencionada EG I\* es así derivada de la endoglucanasa conocida EG I (véase WO 91/17244, Fig.14A-E) eliminando los últimos 13 aminoácidos de la región de codificación. Además, los residuos de aminoácidos en las posiciones 162, 203, 211 y 401, respectivamente, son sustituidos (162: Ser a Pro; 203: Val a Ala; 211: Val a Ala; 401: Val a Leu).

Se contempla que las celulasas que tienen una secuencia de aminoácidos que es al menos un 60% homóloga a las secuencias de aminoácidos relacionadas en la figura 1, 3 y 4, respectivamente, también tienen una actividad mejorada produciendo una mejor eliminación de suciedad de los tejidos.

En la figura 2 se relaciona una alineación de la secuencia de aminoácidos de tres endoglucanasas conocidas de *Humicola insolens* (denominada EGIHUM y teniendo 415 aminoácidos), *Fusarium oxysporum* (denominada Cendofus y teniendo 409 aminoácidos) y *Trichoderma reesei* (denominada Egltrite y teniendo 435 aminoácidos), respectivamente.

En consecuencia, la invención se refiere además a una celulasa que es derivable de una cepa de *Humicola insolens* y comprende los residuos de aminoácidos 1-397 relacionados en la figura 3 y opcionalmente un enlace C-terminal consistente en 10 aminoácidos como mucho, o una variante de dicha celulasa con una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95% homóloga a dicha secuencia relacionada en la Figura 3 y donde dicha variante tiene uno o más de los siguientes aminoácidos son sustituidos: N89Q, N89Q+N247Q, H123N, T385N, Q399N, E202A, S37W+P39W, M142E, K217A, K217A+K218T, R245G, I310D, E150Q, E334K, M198L.

Aún otra variante de celulasa útil es aquella en la que uno o más de los residuos de aminoácidos siguientes dentro de 5 Å de celobiosa enlazada son sustituidos: R106x, Y145x, S345x, D34x, W51x, S104x, A143x, Y171x, D173x, Q175x, Y177x, W347x, donde x es elegida para modificar el enlace de H potencial y/o interacción hidrofóbica con el sustrato.

La actividad de las presentes celulasas con respecto a la eliminación de suciedad puede estar correlacionada a métodos analíticos específicos.

En consecuencia, la presente invención además se refiere a una celulasa que tiene alta actividad sobre celotriosa ante una matriz detergente, alta acción de dispersión en negro carbón, y alta actividad alcalina en celulosa hinchada con ácido a pH 8.

Más específicamente, la actividad sobre celotriosa (ver abajo) en presencia de una matriz detergente corresponde a un  $k_{cat}$  aparente a pH 8 de preferiblemente al menos 1 por seg; la acción de dispersión en negro carbón a pH 10 corresponde a un valor delta preferiblemente de al menos 0.20 medido a 582 nm para 5 mg/l de celulasa (ver p. ej. ejemplo 2); y la actividad alcalina en celulosa hinchada con ácido a pH 8 corresponde a un  $k_{cat}$  aparente preferiblemente de al menos 10 por seg (ver abajo).

## ES 2 360 529 T3

EG I\* (de *Humicola insolens*; ver Fig. 3) tiene un peso molecular (PM) aparente de aproximadamente 50 kD debido a la glicosilación de la molécula. Se cree que el PM "real" es aproximadamente 46 kD. El pl de EG I\* es al menos aproximadamente 0.4 inferior a EG I, puesto que el pl de EG I\* es aproximadamente 5.1-5.3 mientras que el pl de EG I es aproximadamente 5.5-6.2.

5

Las celulasas de la invención pueden ser obtenidas del microorganismo en cuestión usando cualquier técnica adecuada. Por ejemplo, una preparación de celulasas puede ser obtenida por fermentación de un microorganismo y aislamiento posterior de una preparación conteniendo la celulasas del caldo o microorganismo fermentado por métodos conocidos en la técnica, pero más preferiblemente usando técnicas de ADN recombinantes como las conocidas en la técnica. Tal método normalmente comprende el cultivo de una célula huésped transformada con un vector de ADN recombinante capaz de expresar y llevar una secuencia de ADN que codifique el componente de celulasas en cuestión, en un medio de cultivo bajo condiciones que permitan la expresión de la enzima y recuperación de la enzima del cultivo.

10

### 15 *Clonación de una secuencia de ADN que codifica una celulasas*

La secuencia de ADN que codifica una celulasas madre puede ser aislada de cualquier célula o microorganismo que produzca la celulasas en cuestión por varios métodos, bien conocidos en la técnica. Primero debería construirse un ADN genómico y/o genoteca de ADNc usando ADN o ARN mensajero cromosómicos del organismo que produce la celulasas que debe ser estudiada. Luego, si la secuencia de aminoácidos de la celulasas es conocida, se pueden sintetizar y utilizar sondas de oligonucleótidos marcadas, homólogas para identificar los clones de codificación de celulasas de una genoteca genómica de ADN bacteriano, o de una genoteca de ADNc fúngica. De forma alternativa, una sonda de oligonucleótidos marcada conteniendo secuencias homólogas a la celulasas de otra cepa de bacteria u hongo podría ser usada como sonda para la identificación de los clones de indentificación de celulasas, usando hibridación y condiciones de lavado de rigor inferior.

25

Aún otro método para la identificación de clones de producción de celulasas implica insertar fragmentos de ADN genómico en un vector de expresión, tal como un plásmido, transformar la bacteria negativa de celulasas con la biblioteca de ADN genómico resultante, y luego depositar sobre placas las bacterias transformadas sobre agar conteniendo un sustrato para celulasas. Estas bacterias que contienen un plásmido de soporte de la celulasas producirán colonias rodeadas por un halo de agar claro, debido a la digestión del sustrato por la celulasas secretada.

30

De forma alternativa, la secuencia de ADN que codifica la enzima puede ser preparada sintéticamente por métodos estándares establecidos, p. ej. el método de la fosfoamidita descrito por S.L. Beaucage y M.H. Caruthers, *Tetrahedron Letters* 22, 1981, pp. 1859-1869, o el método descrito por Matthes *et al.*, *The EMBO J.* 3, 1984, págs. 801-805. Según el método de la fosforamidita, los oligonucleótidos son sintetizados, p. ej. en un sintetizador de ADN automático, purificados, emparejados, ligados y clonados en vectores apropiados.

35

Finalmente, la secuencia de ADN puede ser de origen mixto genómico y sintético, mixto sintético y ADNc o mixto genómico y ADNc preparado ligando fragmentos de origen sintético, genómico o ADNc (según sea apropiado), correspondiendo los fragmentos a varias partes de la secuencia de ADN entera, conforme a técnicas estándares. La secuencia de ADN puede también ser preparada por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando cebadores específicos, por ejemplo como se describe en US 4,683,202 o R.K. Saiki *et al.*, *Science* 239, 1988, págs. 487-491.

40

### 45 *Expresión de variantes de celulasas*

Según la invención, una secuencia de codificación de celulasas mutada producida por los métodos anteriormente descritos, o cualquier método alternativo conocido en la técnica, puede ser expresada, de forma enzimática, usando un vector de expresión que normalmente incluya secuencias de control que codifiquen un promotor, operador, sitio de enlace de ribosoma, señal de iniciación de la traducción, y, opcionalmente, un gen represor o varios genes activadores. Para permitir la secreción de la proteína expresada, pueden insertarse nucleótidos que codifiquen una "secuencia señal" antes de la secuencia de codificación de la celulasas. Para la expresión bajo la dirección de secuencias de control, un gen diana que debe ser tratado según la invención es operativamente enlazado a las secuencias de control en el marco de lectura apropiado. Las secuencias promotoras que pueden ser incorporadas en vectores de plásmidos, y que pueden soportar la transcripción del gen de celulasas mutante, incluyen pero no se limitan al promotor  $\beta$ -lactamasa procarionótica (Villa-Kamaroff, *et al.*, 1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75:3727-3731) y el promotor tac (DeBoer, *et al.*, 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80:21-25). Se pueden encontrar otras referencias en "Useful proteins from recombinant bacteria" en *Scientific American*, 1980, 242:74-94.

55

Según una forma de realización *B. subtilis* es transformada por un vector de expresión que lleva el ADN mutado. Si la expresión debe ser realizada en un microorganismo de secreción tal como *B. subtilis* una secuencia señal puede seguir la señal de iniciación de traducción y preceder la secuencia de ADN de interés. La secuencia señal actúa para transportar el producto de expresión a la pared celular donde es separada del producto tras la secreción. El término "secuencias de control" tal como se ha definido anteriormente se entiende que incluye una secuencia señal, cuando está presente.

60

65

En un método habitualmente preferido para producir variantes de celulasas de la invención, se usa un hongo filamentoso como organismo huésped. El organismo huésped de hongo filamentoso puede convenientemente ser uno

## ES 2 360 529 T3

que haya sido previamente usado como huésped para producir proteínas recombinantes, p. ej. una cepa de una especie de *Aspergillus*, tal como *A. niger*, *A. nidulans* o *A. oryzae*. El uso de *A. oryzae* en la producción de proteínas recombinantes está extensamente descrito en, p. ej. EP 238 023.

5 Para la expresión de variantes de celulasa en *Aspergillus*, la secuencia de ADN de codificación de la variante de celulasa está precedida por un promotor. El promotor puede ser cualquier secuencia de ADN que exhiba una actividad transcripcional fuerte en *Aspergillus* y puede ser derivado de un gen que codifique una proteína extracelular o intracelular tal como una amilasa, una glucoamilasa, una proteasa, una lipasa, una celulasa o una enzima glicolítica.

10 Ejemplos de promotores adecuados son los derivados del gen de codificación de amilasa TAKA de *A. oryzae*, proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*,  $\alpha$ -amilasa neutra de *A. Niger*,  $\alpha$ -amilasa estable al ácido de *A. Niger*, glucoamilasa de *A. Niger*, lipasa de *Rhizomucor miehei*, proteasa alcalina de *A. oryzae* o isomerasa de triosa fosfato de *A. oryzae*.

15 En particular cuando el organismo huésped es *A. oryzae*, un promotor preferido para el uso en el proceso de la presente invención es el promotor de la amilasa TAKA de *A. oryzae* pues exhibe una actividad transcripcional fuerte en *A. oryzae*. La secuencia del promotor de amilasa TAKA aparece en EP 238 023.

20 Las secuencias de terminación y de poliadenilación pueden de manera adecuada derivar de las mismas fuentes que el promotor.

Las técnicas usadas para transformar una célula huésped fúngica puede de manera adecuada ser como las que se describe en EP 238 023.

25 Para asegurar la secreción de la variante de celulasa de la célula huésped, la secuencia de ADN que codifica la variante de celulasa puede ser precedida por una secuencia señal que puede ser una secuencia señal de origen natural o una parte funcional de ésta o una secuencia sintética que proporcione secreción de la proteína de la célula. En particular, la secuencia señal puede ser derivada de un gen que codifique una amilasa o glucoamilasa de esp. *Aspergillus*, un gen que codifique una lipasa o proteasa de *Rhizomucor miehei*, o un gen que codifique una celulasa, xilanaso o lipasa de  
30 *Humicola*. La secuencia señal es preferiblemente derivada del gen que codifica amilasa TAKA de *A. oryzae*,  $\alpha$ -amilasa neutra de *A. Niger*,  $\alpha$ -amilasa estable al ácido de *A. Niger* o glucoamilasa de *A. Niger*.

35 El medio usado para cultivar las células huéspedes transformadas puede ser cualquier medio convencional adecuado para el crecimiento de las células de *Aspergillus*. Los transformantes son normalmente estables y pueden ser cultivados en ausencia de presión de selección. No obstante, si se encuentra que los transformantes son inestables, un marcador de selección introducido en las células puede ser usado para la selección.

40 La proteína de celulasa madura secretada de las células huésped puede convenientemente ser recuperada del medio de cultivo por procedimientos bien conocidos que incluyen la separación de las células del medio por centrifugado o filtración, y la precipitación de los componentes proteínicos del medio mediante una sal tal como sulfato de amonio, seguido de procedimientos cromatográficos tal como cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, o similar.

### 45 *Composiciones detergentes*

Según la invención, la endoglucanasa de la invención puede normalmente ser un componente de una composición detergente. Una celulasa como se describe aquí o una endoglucanasa derivada de una cepa de *Humicola insolens* y teniendo la secuencia enumerada en la Figura 1 y un peso molecular aparente de aproximadamente 50 kD medido en SDS-PAGE puede típicamente ser un componente de una composición detergente. Como tal, ésta puede ser incluida en  
50 la composición detergente en forma de un granulado no pulverulento, un líquido estabilizado, o una enzima protegida. Los granulados no pulverulentos pueden ser producidos, p. ej., como se describe en US 4,106,991 y 4,661,452 (ambos a nombre de Novo Industri A/S) y pueden opcionalmente ser revestidos por métodos conocidos en la técnica. Ejemplos de materiales de revestimiento cerosos son productos de óxido de poli(etileno) (polietilenglicol, PEG) con pesos molares principales de 1000 a 20000, nonilfenoles etoxilados teniendo de 16 a 50 unidades de óxido de etileno; alcoholes grasos etoxilados donde el alcohol contiene de 12 a 20 átomos de carbono y en el cual hay 15 a 80 unidades de óxido de etileno; alcoholes grasos; ácidos grasos; y mono- y di- y triglicéridos de ácidos grasos. Se dan ejemplos de materiales de revestimiento que forman una película adecuados para la aplicación por técnicas de lecho fluidificado en la patente GB 1483591. Las preparaciones enzimáticas líquidas pueden, por ejemplo, ser estabilizadas añadiendo un poliol tal como propilenglicol, un azúcar o alcohol de azúcar, ácido láctico o ácido bórico según métodos establecidos. Otros  
60 estabilizadores enzimáticos son bien conocidos en la técnica. Las enzimas protegidas pueden ser preparadas según el método descrito en EP 238,216. En consecuencia, la presente invención además se refiere a un aditivo detergente que comprende una celulasa de la presente invención o una endoglucanasa derivada de una cepa de *Humicola insolens* y teniendo la secuencia de aminoácidos enumerada en la Figura 3 y un peso molecular aparente de aproximadamente 50 kD medido en SDS-PAGE.

65 La composición detergente de la invención puede estar en cualquier forma conveniente, como p. ej., polvo, gránulos, pasta o líquido. Un detergente líquido puede ser acuoso, normalmente conteniendo hasta el 70% de agua y 0-30% de solvente orgánico, o no acuoso.

## ES 2 360 529 T3

La composición detergente comprende uno o más agentes tensioactivos, cada uno de los cuales puede ser, aniónico, no iónico, catiónico, o zwitteriónico. El detergente normalmente contendrá 0-50% de agente tensioactivo aniónico tal como alquilbencenosulfonato lineal (LAS), alfa-olefinsulfonato (AOS), sulfato de alquilo (sulfato de alcohol graso) (AS), etoxisulfato de alcohol (AEOS o AES), alcanosulfonatos secundarios (SAS), alfa-sulfometilésteres de ácidos grasos, ácido alquil- o alqueniilsuccínico, o jabón. Puede también contener 0-40% de agente tensioactivo no iónico tal como etoxilato de alcohol (AEO o AE), etoxilatos de alcohol carboxilado, nonilfenol etoxilato, alquilpoliglicósido, óxido de alquildimetilamino, monoetanolamida de ácido graso etoxilado, monoetanolamida de ácido graso, o amida de ácido graso de alquilo de polihidroxí (p. ej. como se describe en WO 92/06154).

La composición detergente puede adicionalmente comprender una o más de otras enzimas, tal como amilasa, lipasa, cutinasa, proteasa, otras celulasas, peroxidasa, y oxidasa, p. ej., lacasa).

El detergente puede contener 1-65% de un adyuvante de detergente o agente de complejación tal como zeolita, difosfato, trifosfato, fosfonato, citrato, ácido nitrilotriacético (NTA), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido dietileno-triaminopentaacético (DTMPA), ácido alquil- o alqueniilsuccínico, silicatos solubles o silicatos estratificados (p. ej. SKS-6 de Hoechst). El detergente puede también ser no adyuvado, es decir esencialmente sin adyuvante de detergente.

El detergente puede comprender uno o más polímeros. Unos ejemplos son carboximetilcelulosa (CMC), poli(vinilpirrolidona) (PVP), polietilenglicol (PEG), alcohol polivinílico (PVA), policarboxilatos tal como poliácridatos, copolímeros de ácido maléico/acrílico y copolímeros de laurilmetacrilato/ácido acrílico.

El detergente puede contener un sistema blanqueante que puede comprender una Fuente de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tal como perborato o percarbonato que se puede combinar con un activador del blanqueante formando perácido como tetraacetiltilenodiamina (TAED) o nonanoiloxibencenosulfonato (NOBS). De forma alternativa, el sistema blanqueante puede comprender peroxiácidos de tipo, p. ej., amida, imida, o sulfona.

Las enzimas de la composición detergente de la invención pueden ser estabilizadas usando agentes estabilizantes convencionales, p. ej. un poliol tal como propilenglicol o glicerol, un azúcar o alcohol de azúcar, ácido láctico, ácido bórico, o un ácido bórico derivado tal como, p. ej., un éster de borato aromático, y la composición puede ser formulada como se describe en, p. ej., WO 92/19709 y WO 92/19708.

El detergente puede también contener otros ingredientes de detergente convencional tal como, p. ej., suavizantes de tejido incluyendo arcillas, reforzantes de espuma, supresores de espuma, agentes anticorrosivos, agentes de suspensión de la suciedad, agentes antirredeposición de la suciedad, colorantes, bactericidas, blanqueadores ópticos o perfume.

El pH (medido en solución acuosa en concentración de uso) será generalmente neutro o alcalino, p. ej. en el rango de 7-11.

Formas particulares de composiciones detergentes dentro del campo de la invención incluyen:

1) Composición detergente formulada como un granulado teniendo una densidad en masa de al menos 600 g/l comprendiendo

Alquilbencenosulfonato lineal (calculado como ácido)	7 - 12%
Etoxisulfato de alcohol (p. ej. alcohol C <sub>12-18</sub> , 1-2 EO) o sulfato de alquilo (p.ej. C <sub>16-18</sub> )	1 - 4%
Etoxilato de alcohol (p. ej. alcohol C <sub>14-15</sub> , 7 EO)	5 - 9%
Carbonato sódico (como Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	14 - 20%
Silicato soluble (como Na <sub>2</sub> O,2SiO <sub>2</sub> )	2 - 6%
Zeolita (como NaAlSiO <sub>4</sub> )	15 - 22%
Sulfato sódico (como Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	0 - 6%
Citrato sódico/ácido cítrico (como C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>7</sub> /C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> )	0 - 15%
Perborato sódico (como NaBO <sub>3</sub> .H <sub>2</sub> O)	11 - 18%
TAED	2 - 6%
Carboximetilcelulosa	0 - 2%
Polímeros (p. ej. copolímero de ácido maléico/acrílico, PVP, PEG)	0 - 3%
Enzimas (calculadas como proteína enzimática pura)	0.0001 - 0.1%
Ingredientes menores (p. ej. supresores de espuma, perfume, blanqueador óptico, fotoblanqueador)	0 - 5%

## ES 2 360 529 T3

2) Composición detergente formulada como un granulado teniendo una densidad en masa de al menos 600 g/l comprendiendo

5	Alquilobencenosulfonato lineal (calculado como ácido)	6 - 11%
	Etoxisulfato de alcohol (p. ej. alcohol C <sub>12-18</sub> , 1-2 EO o sulfato de alquilo (p. ej. C <sub>16-18</sub> ))	1 - 3%
	Etoxilato de alcohol (p. ej. alcohol C <sub>14-15</sub> , 7 EO)	5 - 9%
10	Carbonato sódico (como Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	15 - 21%
	Silicato soluble (como Na <sub>2</sub> O, 2SiO <sub>2</sub> )	1 - 4%
	Zeolita (como NaAlSiO <sub>4</sub> )	24 - 34%
	Sulfato sódico (como Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	4 - 10%
15	Citrato sódico/ácido cítrico (como C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>7</sub> /C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> )	0 - 15%
	Carboximetilcelulosa	0 - 2%
	Polímeros (p. ej. copolímero de ácido maléico/acrílico, PVP, PEG)	1 - 6%
20	Enzimas (calculadas como proteína enzimática pura)	0.0001 - 0.1%
	Ingredientes menores (p. ej. supresores de espuma, perfume)	0 - 5%

25 3) Composición detergente formulada como un granulado teniendo una densidad en masa de al menos 600 g/l comprendiendo

	Alquilobencenosulfonato lineal (calculado como ácido)	5 - 9%
	Etoxilato de alcohol (p. ej alcohol C <sub>12-15</sub> , 7 EO)	7 - 14%
30	Jabón como ácido graso (p.ej. ácido graso C <sub>16-22</sub> )	1 - 3%
	Carbonato sódico (como Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	10 - 17%
	Silicato soluble (como Na <sub>2</sub> O, 2SiO <sub>2</sub> )	3 - 9%
35	Zeolita (como NaAlSiO <sub>4</sub> )	23 - 33%
	Sulfato sódico (como Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	0 - 4%
	Perborato sódico (como NaBO <sub>3</sub> •H <sub>2</sub> O)	8 - 16%
	TAED	2 - 8%
40	Fosfonato (p. ej. EDTMPA)	0 - 1%
	Carboximetilcelulosa	0 - 2%
	Polímeros (p. ej. copolímero de ácido maléico/acrílico, PVP, PEG)	0 - 3%
45	Enzimas (calculadas como proteína enzimática pura)	0.0001 - 0.1%
	Ingredientes menores p. ej. supresores de espuma, perfume, blanqueador óptico)	0 - 5%

50 4) Composición detergente formulada como un granulado teniendo una densidad en masa de al menos 600 g/l comprendiendo

	Alquilobencenosulfonato lineal (calculado como ácido)	8 - 12%
55	Etoxilato de alcohol (p. ej. alcohol C <sub>12-15</sub> , 7 EO)	10 - 25%
	Carbonato sódico (como Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	14 - 22%
	Silicato soluble (como Na <sub>2</sub> O, 2SiO <sub>2</sub> )	1 - 5%
	Zeolita (como NaAlSiO <sub>4</sub> )	25 - 35%
60	Sulfato sódico (como Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	0 - 10%
	Carboximetilcelulosa	0 - 2%
	Polímeros (p. ej. copolímero de ácido maléico/ acrílico, PVP, PEG)	1 - 3%
	Enzimas (calculadas como proteína enzimática pura)	0.0001 - 0.1%
65	Ingredientes menores (p. ej. supresores de espuma, perfume)	0 - 5%

## ES 2 360 529 T3

### 5) Composición detergente líquida acuosa comprendiendo

5	Alquilbencenosulfonato lineal (calculado como ácido)	15 - 21%
	Etoxilato de alcohol (p. ej. alcohol C <sub>12-15</sub> , 7 EO o alcohol C <sub>12-15</sub> , 5 EO)	12 - 18%
	Jabón como ácido graso (p. ej. ácido oleico)	3 - 13%
	Ácido alqueni succínico (C <sub>12-14</sub> )	0 - 13%
10	Aminoetanol	8 - 18%
	Ácido cítrico	2 - 8%
	Fosfonato	0 - 3%
	Polímeros (p. ej. PVP, PEG)	0 - 3%
15	Borato (como B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> )	0 - 2%
	Etanol	0 - 3%
	Propilenoglicol	8 - 14%
20	Enzimas (calculadas como proteína enzimática pura)	0.0001 - 0.1%
	Ingredientes menores (p. ej. dispersantes, supresores de espuma, perfume, blanqueador óptico)	0 - 5%

### 6) Composición detergente líquida estructurada acuosa comprendiendo

25	Alquilbencenosulfonato lineal (calculado como ácido)	15 - 21%
	Etoxilato de alcohol (p. ej. alcohol C <sub>12-15</sub> , 7 EO, o alcohol C <sub>12-15</sub> , 5 EO)	3 - 9%
30	Jabón como ácido graso (p. ej. ácido oleico)	3 - 10%
	Zeolita (como NaAlSiO <sub>4</sub> )	14 - 22%
	Citrato potásico	9 - 18%
	Borato (como B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> )	0 - 2%
35	Carboximetilcelulosa	0 - 2%
	Polímeros (p. ej. PEG, PVP)	0 - 3%
	Polímeros de fijación como, p. ej., copolímero de laurilmetacrilato/ácido acrílico; proporción molar 25:1; Peso Mol. 3800	0 - 3%
40	Glicerol	0 - 5%
	Enzimas (calculadas como proteína enzimática pura)	0.0001 - 0.1%
45	Ingredientes menores (p. ej. dispersantes, supresores de espuma, perfume, blanqueadores ópticos)	0 - 5%

### 7) Composición detergente formulada como un granulado teniendo una densidad en masa de al menos 600 g/l comprendiendo

50	Sulfato de alcohol graso	5 - 10%
	Ácido graso etoxilado de monoetanolamida	3 - 9%
	Jabón como ácido graso	0 - 3%
55	Carbonato sódico (como Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	5 - 10%
	Silicato soluble (como Na <sub>2</sub> O, 2SiO <sub>2</sub> )	1 - 4%
	Zeolita (como NaAlSiO <sub>4</sub> )	20 - 40%
	Sulfato sódico (como Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	2 - 8%
60	Perborato sódico (como NaBO <sub>3</sub> •H <sub>2</sub> O)	12 - 18%
	TAED	2 - 7%
	Polímeros (p. ej. copolímero de ácido maléico/acrílico, PEG)	1 - 5%
65	Enzimas (calculadas como proteína enzimática pura)	0.0001 - 0.1%
	Ingredientes menores (p. ej. blanqueador óptico, supresores de espuma, perfume)	0 - 5%

## ES 2 360 529 T3

8) Composición detergente formulada como un granulado comprendiendo

5	Alquilobencenosulfonato lineal (calculado como ácido)	8 - 14%
	Ácido graso etoxilado monoetanolamida	5 - 11%
	Jabón como ácido graso	0 - 3%
	Carbonato sódico (como Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	4 - 10%
10	Silicato soluble (como Na <sub>2</sub> O, 2SiO <sub>2</sub> )	1 - 4%
	Zeolita (como NaAlSiO <sub>4</sub> )	30 - 50%
	Sulfato sódico (como Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	3 - 11%
	Citrato sódico (como C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>7</sub> )	5 - 12%
15	Polímeros (p. ej. PVP, copolímero de ácido maléico/acrílico, PEG)	1 - 5%
	Enzimas (calculadas como proteína enzimática pura)	0.0001 - 0.1%
	Ingredientes menores (p. ej. supresores de espuma, perfume)	0 - 5%

9) Composición detergente formulada como un granulado comprendiendo

25	Alquilobencenosulfonato lineal (calculado como ácido)	6 - 12%
	Agente tensioactivo no iónico	1 - 4%
	Jabón como ácido graso	2 - 6%
	Carbonato sódico (como Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	14 - 22%
30	Zeolita (como NaAlSiO <sub>4</sub> )	18 - 32%
	Sulfato sódico (como Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	5 - 20%
	Citrato sódico (como C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>7</sub> )	3 - 8%
	Perborato sódico (como NaBO <sub>3</sub> ·H <sub>2</sub> O)	4 - 9%
35	Activador blanqueante (p. ej. NOBS o TAED)	1 - 5%
	Carboximetilcelulosa	0 - 2%
	Polímeros (p. ej. policarboxilato o PEG)	1 - 5%
40	Enzimas (calculadas como proteína enzimática pura)	0.0001 - 0.1%
	Ingredientes menores (p. ej. blanqueador óptico, perfume)	0 - 5%

10) Composición detergente líquida acuosa comprendiendo

45	Alquilobencenosulfonato lineal (calculado como ácido)	15 - 23%
	Etoxilsulfato de alcohol (p. ej. alcohol C <sub>12-15</sub> , 2-3 EO)	8 - 15%
50	Etoxilato de alcohol (p. ej. alcohol C <sub>12-15</sub> , 7 EO, o alcohol C <sub>12-15</sub> , 5 EO)	3 - 9%
	Jabón como ácido graso (p. ej. ácido láurico)	0 - 3%
	Aminoetanol	1 - 5%
55	Citrato sódico	5 - 10%
	Hidrotropo (p. ej. toluenosulfonato sódico)	2 - 6%
	Borato (como B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> )	0 - 2%
	Carboximetilcelulosa	0 - 1%
60	Etanol	1 - 3%
	Propilenoglicol	2 - 5%
	Enzimas (calculadas como proteína enzimática pura)	0.0001 - 0.1%
65	Ingredientes menores (p. ej. polímeros, dispersantes, perfume, blanqueadores ópticos)	0 - 5%

## ES 2 360 529 T3

### 11) Composición detergente líquida acuosa comprendiendo

5	Alquilobencenosulfonato lineal (calculado como ácido)	20 - 32%
	Etoxilato de alcohol (p. ej. alcohol C <sub>12-15</sub> , 7 EO, o alcohol C <sub>12-15</sub> , 5 EO)	6 - 12%
	Aminoetanol	2 - 6%
	Ácido cítrico	8 - 14%
10	Borato (como B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> )	1 - 3%
	Polímero (p. ej. copolímero de ácido maléico/acrílico, polímero de fijación como, p. ej., copolímero de laurilmetacrilato/ácido acrílico)	0 - 3%
	Glicerol	3 - 8%
15	Enzimas (calculada como proteína enzimática pura)	0.0001 - 0.1%
	Ingredientes menores (p. ej. hidrotropos, dispersantes, perfume, blanqueadores ópticos)	0 - 5%

### 20 12) Composición detergente formulada como un granulado teniendo una densidad en masa de al menos 600 g/l comprendiendo

25	Agente tensioactivo aniónico (alquilobencenosulfonato lineal, sulfato de alquilo, alfa-olefinsulfonato, alfa-sulfometilésteres de ácidos grasos, alcanosulfonatos, jabón)	25 - 40%
	Agente tensioactivo no iónico (p. ej. etoxilato de alcohol)	1 - 10%
	Carbonato sódico (como Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	8 - 25%
30	Silicatos solubles (como Na <sub>2</sub> O, 2SiO <sub>2</sub> )	5 - 15%
	Sulfato sódico (como Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	0 - 5%
	Zeolita (como NaAlSiO <sub>4</sub> )	15 - 28%
	Perborato sódico (como NaBO <sub>3</sub> •4H <sub>2</sub> O)	0 - 20%
35	Activador blanqueante (TAED o NOBS)	0 - 5%
	Enzimas (calculada como proteína enzimática pura)	0.0001 - 0.1%
	Ingredientes menores (p. ej. perfume, blanqueadores ópticos)	0 - 3%

### 40 13) Formulaciones detergentes como se describe en 1) - 12) donde todo o parte del alquilobencenosulfonato lineal es reemplazado por sulfato de alquilo (C<sub>12</sub>-C<sub>18</sub>).

### 45 14) Composición detergente formulada como un granulado teniendo una densidad en masa de al menos 600 g/l comprendiendo

50	Sulfato de alquilo (C <sub>12</sub> -C <sub>18</sub> )	9 - 15%
	Etoxilato de alcohol	3 - 6%
	Polihidroxialquilo-amida de ácido graso	1 - 5%
	Zeolita (como NaAlSiO <sub>4</sub> )	10 - 20%
55	Disilicato estratificado (p. ej. SK56 de Hoechst)	10 - 20%
	Carbonato sódico (como Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	3 - 12%
	Silicato soluble (como Na <sub>2</sub> O, 2SiO <sub>2</sub> )	0 - 6%
	Citrato sódico	4 - 8%
60	Percarbonato sódico	13 - 22%
	TAED	3 - 8%
	Polímeros (p. ej. policarboxilatos y PVP)	0 - 5%
	Enzimas (calculadas como proteína enzimática pura)	0.0001 - 0.1%
65	Ingredientes menores (p. ej. blanqueador óptico, fotoblanqueador, perfume, supresores de espuma)	0 - 5%

## ES 2 360 529 T3

15) Composición detergente formulada como un granulado teniendo una densidad en masa de al menos 600 g/l comprendiendo

5	Sulfato de alquilo (C <sub>12</sub> -C <sub>18</sub> )	4 - 8%
	Etoxilato de alcohol	11 - 15%
	Jabón	1 - 4 %
	Zeolita MAP o zeolita A	35 - 45%
10	Carbonato sódico (como Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	2 - 8%
	Silicato soluble (como Na <sub>2</sub> O, 2SiO <sub>2</sub> )	0 - 4%
	Percarbonato sódico	13 - 22%
15	TAED	1 - 8%
	Carboximetilcelulosa	0 - 3%
	Polímeros (p. ej. policarboxilatos y PVP)	0 - 3%
	Enzimas (calculadas como proteína enzimática pura)	0.0001 - 0.1%
20	Ingredientes menores (p. ej. blanqueador óptico, fosfonato, perfume)	0 - 3%

16) Formulaciones detergentes como se describe en 1) - 15) conteniendo un perácido estabilizado o encapsulado, bien como un componente adicional o como un sustituto para los sistemas blanqueantes ya especificados.

17) Composiciones detergentes como se describe en 1), 3), 7), 9) y 12) donde el perborato es reemplazado por percarbonato.

18) Composiciones detergentes como se describe en 1), 3), 7), 9), 12), 14) y 15) conteniendo adicionalmente un catalizador de manganeso. El catalizador de manganeso puede, p. ej., ser uno de los compuestos descritos en "Efficient manganese catalysts for low-temperature bleaching", Nature 369, 1994, págs. 637-639.

19) Composición detergente formulada como un detergente líquido no acuoso que comprende un agente tensioactivo no iónico tal como, p. ej., alcohol primario lineal alcoxilado, un sistema adyuvante (p. ej. fosfato), enzima y alcali. El detergente puede también comprender agente tensioactivo aniónico y/o un sistema blanqueante.

La endoglucanasa de la invención puede ser incorporada en concentraciones convencionalmente empleadas en detergentes. Actualmente se ha contemplado que, en la composición detergente de la invención, la endoglucanasa puede ser añadida en una cantidad correspondiente a 0.00001-1 mg (calculado como proteína enzimática pura) de endoglucanasa por litro de solución de lavado.

En aún otro aspecto, las presentes endoglucanasas pueden ser usadas en suavizantes, p. ej. como se describe en Surfactant and Consumer Products, Ed. por J. Falbe, 1987, pp 295-296; Tenside Surfactants Detergents, 30 (1993), 6, pp 394-399; JAOCS, Vol. 61 (1984), 2, pp 367-376; EP 517 762; EP 123 400; WO 92/19714; WO 93/19147; US 5,082,578; EP 494 769; EP 544 493; EP 543 562; US 5,235,082; EP 568 297; EP 570 237.

La presente invención también se refiere a un proceso de lavado donde se trata tejido sucio con una celulasa de la invención o una endoglucanasa derivada de una cepa de *Humicola insolens* y teniendo la secuencia de aminoácidos relacionada en la figura 3 y un peso molecular aparente de aproximadamente 50 kD medido en SDS-PAGE.

Se contempla que, dependiendo de la especificidad de la celulasa modificada, ésta puede ser empleada para una o posiblemente más de las aplicaciones anteriormente mencionadas, es decir en la industria panificadora, en la industria vinícola y del zumo, para alimentos para animales, y en el tratamiento textil y de la pasta de papel. En una forma de realización particular, la preparación enzimática de la invención puede comprender una combinación de una o más celulasas modificadas con enzimas seleccionadas del grupo consistente en amilasas modificadas o inmodificadas, lipasas, proteasas, oxidoreductasas y hemicelulasas.

### *Aplicaciones en el tratamiento de papel y pasta de papel*

En la industria elaboradora de pasta para hacer papel, la celulasa y/o preparación enzimática con respecto a la invención puede ser aplicada ventajosamente p. ej. como sigue:

- Para el descortezado: el tratamiento previo con la celulasa y/o preparación enzimática según la invención puede degradar la capa de cámbium previamente al descortezado en tambores mecánicos dando como resultado ahorros de energía ventajosos.
- Para el desfibrado: el tratamiento de un material conteniendo fibras celulósicas con la celulasa y/o preparación enzimática de la invención antes del refinado o batido puede suponer una reducción del consumo de energía

## ES 2 360 529 T3

debido al efecto hidrolizante de la celulasa en las superficies interfibrilares. El uso de la celulasa y/o preparación enzimática de la invención puede suponer ahorros de energía mejores en comparación con el uso de enzimas inmodificadas, pues se cree que la celulasa modificada puede poseer una mayor capacidad para penetrar en las paredes de la fibra.

- Para la modificación de las fibras, es decir mejora de las propiedades de las fibras cuando se necesita la hidrólisis parcial a través de la pared de la fibra que requiere una penetración más profunda de las enzimas (p. ej. para hacer las fibras gruesas más flexibles). El tratamiento profundo de fibras no había sido posible hasta ahora para pastas de papel de alto rendimiento, p. ej. pastas de papel mecánicas o mezclas de pastas de papel reciclado. Esto ha sido atribuido a la naturaleza de la estructura de la pared de la fibra que impide el paso de moléculas enzimáticas debido a la restricción física de la matriz del poro de la pared de la fibra. Se contempla que las celulastas modificadas (es decir derivatizadas) de la invención son capaces de penetrar en la pared de las fibras.
- Para mejorar el drenaje. La drenabilidad de las pastas de papel para fabricar papel puede ser mejorada tratando la pasta con enzimas de hidrolizado, p. ej. celulastas. El uso de la celulasa modificada y/o preparación enzimática según la invención puede ser más eficaz, p. ej. producir un mayor grado de aflojamiento de haces de microfibrillas muy hidratadas en la fracción de finos (consistente en fragmentos de fibra) que limita el nivel de drenaje bloqueando los espacios vacíos entre las fibras y en la malla metálica de la máquina de papel. El estándar canadiense de refinado (CSF del inglés Canadian Standard Freeness) aumenta y el índice de drenaje Schopper-Riegler se reduce cuando la pasta es sometida a tratamiento con celulasa, ver p. ej. Patente US 4,923,565; TAPPI T227, SCAN C19:65 que se incorporan aquí como referencia.
- Para la adherencia entre las fibras. Las enzimas hidrolíticas son aplicadas en la producción de pastas de papel para la fabricación de papel para mejorar la adherencia entre las fibras. Las enzimas lavan las superficies de fibra de impurezas p. ej. fragmentos celulósicos, aumentando así el área de celulosa expuesta con fijación a la pared de la fibra, mejorando así la capacidad enlazante del hidrógeno fibra a fibra. Este proceso es también denominado desquaterinización. El papel y cartón producido con una celulasa que contiene preparación enzimática según la invención puede tener una resistencia mejorada o un reducido gramaje, una superficie más lisa y una mejorada capacidad de impresión. Se cree que estas mejoras son el resultado de la penetrabilidad mejorada de la(s) enzima(s) derivatizada(s) modificada(s).
- Para el desentintado enzimático. Se sabe que la hidrólisis parcial de papel reciclado durante o tras la reducción a pasta usando enzimas de hidrolización tal como celulastas facilita la eliminación y aglomeración de partículas de tinta. El uso de una celulasa modificada y/o preparación enzimática según la invención puede dar una liberación más eficaz de tinta de la estructura superficial debido a una mejor penetración de las moléculas de enzima en la matriz fibrilar de la pared de la fibra, reblandeciendo así la superficie con lo cual las partículas de tinta son eficazmente liberadas. También se mejora la aglomeración de partículas de tinta liberadas debido a una hidrólisis más eficaz de los fragmentos celulósicos que se encuentran fijados a las partículas de tinta por las fibras.

El tratamiento de pasta lignocelulósica puede, p. ej., ser realizada como se describe en WO 91/14819, WO 91/14822, WO 92/17573 y WO 92/18688.

### *Aplicaciones textiles*

En otra forma de realización, la presente invención se refiere al uso de la endoglucanasa según la invención en el proceso de biopulido. El biopulido es un tratamiento específico de la superficie de los hilos que mejora la calidad del tejido con respecto a su manipulación y apariencia sin pérdida de humectabilidad del tejido. Los efectos más importantes del biopulido pueden estar caracterizados por menos formación de pelusa y de bolitas, mayor brillo/lustre, mejor manipulación del tejido, mayor durabilidad de la suavidad y absorbanza de agua alterada. El biopulido normalmente se desarrolla en el tratamiento húmedo de la producción de géneros tejidos y de punto. El tratamiento húmedo comprende fases tales como p. ej. desencolado, descrudado, blanqueo, lavado, tintado/estampado y acabado. Durante cada una de estas fases, el tejido es sometido en menor o mayor medida a acción mecánica. En general, después de que las telas hayan sido hechas o tejidas, el tejido pasa a una fase de desencolado, seguido de una fase de descrudado, etc. El desencolado es el acto de eliminar el apresto de los tejidos. Antes de tejerlos en telares mecánicos, los hilos de urdimbre suelen ser revestidos con almidón de apresto o derivados de almidón para aumentar su fuerza de tracción. Después del tejido, el revestimiento de apresto debe ser eliminado antes de procesar ulteriormente el tejido para asegurar un resultado homogéneo y a prueba de lavados. Se sabe que para conseguir los efectos del biopulido se requiere una combinación de acción celulolítica y mecánica. También se sabe que se puede conseguir una "supersuavidad" cuando el tratamiento con celulasa es combinado con un tratamiento convencional con agentes suavizantes. Se contempla que el uso de la celulasa modificada y/o preparación enzimática de la invención para el biopulido de tejidos celulósicos es ventajoso, p. ej. se puede conseguir un pulido más a fondo. El biopulido puede ser obtenido aplicando el método descrito p. ej. en WO 93/20278.

### *Degradación de material vegetal*

En aún otra forma de realización, la presente invención se refiere al uso de una endoglucanasa según la invención para degradar material vegetal p. ej. membranas celulares.

## ES 2 360 529 T3

Se contempla que la celulasa modificada y/o preparación enzimática de la invención es útil en la preparación de vino, zumo de verduras o frutas para aumentar el rendimiento. Las celulasas según la invención pueden también ser aplicadas para la hidrólisis enzimática de varios materiales de desecho o materias derivadas de la membrana celular vegetal o, p. ej. residuos agrícolas tal como paja de trigo, zuro de maíz, plantas enteras de maíz, cáscaras de frutos secos, césped, vainas vegetales, vainas de leguminosas, desechos de granos, pulpa de remolacha azucarera, y similares. El material vegetal puede ser degradado para mejorar diferentes tipos de tratamiento, facilitar la purificación o extracción de otros componentes tales como purificación de beta-glucano u oligómeros de beta-glucano de cereales, mejorar el valor alimenticio, reducir la capacidad enlazadora de agua, mejorar la degradabilidad en plantas de aguas residuales, mejorar la conversión de p. ej. césped y maíz en ensilaje, etc.

Según la invención, la celulasa es una endoglucanasa. La actividad celulolítica de la endoglucanasa es determinada según un estándar analítico y puede ser expresada en unidades ECU.

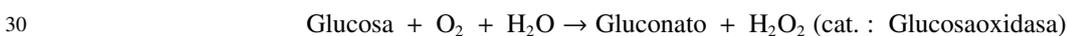
Las enzimas celulolíticas hidrolizan CMC, disminuyendo así la viscosidad de la mezcla de incubación. La reducción resultante en viscosidad puede ser determinada por un viscosímetro por vibración (p. ej. MIVI 3000 de Sofraser, Francia).

La determinación de la actividad celulolítica, medida en ECU, puede ser determinada según el método de análisis AF 301.1 que se puede conseguir del Solicitante bajo pedido.

El Ensayo de ECU cuantifica la cantidad de actividad catalítica presente en la muestra midiendo la capacidad de la muestra para reducir la viscosidad de una solución de carboximetilcelulosa (CMC). El ensayo se realiza a 40°C, pH 7.5 usando un estándar de enzima relativa para reducir la viscosidad del sustrato de CMC.

### Actividad celulasa sobre celotriosa

La actividad celulasa sobre celotriosa, en términos de  $k_{\text{cat}} \cdot \text{s}^{-1}$ , fue determinado por un ensayo acoplado:



que es seguido espectrofotométricamente a 418 nm (máxima absorbencia de  $\text{ABTS}^{\text{Ox}}$  a 418 nm).

### Método

Se usó el kit de ensayo GOD-Perid (accesible de Boehringer Mannheim, art. 124 036). El tampón-solución enzimática en el kit de ensayo fue disuelto en 500 ml de agua milli Q. El pH de la solución fue ajustado a 8.5 (NaOH).

Se disolvió 80 mg de  $\text{ABTS}^{\text{R}}$  (disponible de Boehringer Mannheim, art. 756 407) en 10 ml de GOD-Perid correspondiente a una concentración total de  $\text{ABTS}^{\text{R}}$  de 10 mg/ml.

Se preparó una solución sustrato de 5 mmol (2.52 mg/ml) de celotriosa (accesible de Merck art. 24741) en agua. Se prepararon soluciones diluidas en agua correspondientes a 1000  $\mu\text{mol}$ , 500  $\mu\text{mol}$ , 376  $\mu\text{mol}$ , 250  $\mu\text{mol}$ , 100  $\mu\text{mol}$  y 60  $\mu\text{mol}$ .

La mezcla reactiva fue preparada mediante la mezcla de 1 parte de solución patrón concentrada de sustrato con 1 parte de GOD-Perid.

Se preparó una solución de la enzima celulasa para ser determinada en una concentración de 1.0 - 3.0  $\mu\text{mol}$ .

Se mezcló 50  $\mu\text{l}$  de solución enzimática y 450  $\mu\text{l}$  de mezcla reactiva.

Las mediciones fueron realizadas en un Espectrofotómetro Diode-Array HP 8452A termostatizado a 40°C, cubeta de 1 cm, a una longitud de onda de 418 nm. La reacción fue seguida midiendo la oxidación a  $\text{ABTS}^{\text{Ox}}$  cada 20 seg durante 600 seg en total.

### Cálculos

La actividad celulasa sobre celotriosa, en términos de  $k_{\text{cat}} \cdot \text{s}^{-1}$ , fue calculada a partir de un gráfico de Lineweaver-Burk (un gráfico de  $1/V$  contra  $1/[S]$ ): la inclinación y la intersección fueron determinadas por análisis de regresión lineal.

Se usaron las siguientes constantes para los cálculos:

$$\text{Celulasa: } \varepsilon = 66,310 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$

$$\text{ABTS}^{\text{Ox}}: \varepsilon = 0.0323 \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}.$$

## ES 2 360 529 T3

Para EG I' de *Fusarium oxysporum* (Figura 4), la actividad catalítica sobre celotriosa a pH 8.5 y 40°C fue calculada a 5.5  $K_{cat}$  pr. seg.  $K_m$  fue 0.5 mM.

Determinación de actividad de celulasa alcalina en celulosa amorfa.

### Método

Preparación de sustrato: se centrifugó 20 gramos de AVICEL® hinchada con ácido, solución madre concentrada (ver abajo para una preparación que puede ser almacenada durante un mes) durante 20 min. a 5000 rpm., el sobrenadante fue apartado, y el sedimento fue resuspendido en 30 ml de tampón. Tras el centrifugado durante 20 min. a 5000 rpm, el sobrenadante fue retirado, y el sedimento fue resuspendido en tampón hasta un total de 30 g. Esto corresponde a una concentración de sustrato de 10 g AVICEL/Litro.

Tampón: 0.1M Barbital a pH 8.5 o 0.1M Glicina a pH 10.0.

### Solución enzimática

Las enzimas fueron diluidas hasta una actividad de 0.5 S-CEVU/ml a pH 8.5 o 0.75 S-CEVU/ml a pH 10.0.

### Reactivos

NaOH al 2%, reactivo PHBAH: Se disolvió 1.5 g de hidracidad de ácido benzoico de p-hidroxi y 5.0 g de tartrato sódico en 100 ml de NaOH al 2%.

El sustrato, el tampón y la solución enzimática fueron mezclados como sigue:

Sustrato $\mu$ l	Tampón $\mu$ l	Sol. enzimática $\mu$ l	Subst. conc. (final) g/l
50	1950	500	0.20
125	1875	500	0.50
250	1750	500	1.00
500	1500	500	2.00
750	1250	500	3.00
1000	1000	500	4.00

La solución sustrato/tampón fue precalentada durante 5 min a 40°C. Luego se añadió la solución enzimática y la solución fue mezclada haciéndola girar durante 5 seg., seguida de incubación durante 20 min. a 40°C. La reacción fue detenida añadiendo 500  $\mu$ l de solución NaOH al 2%, mezclándola después haciéndola girar durante 5 seg. Las muestras fueron centrifugadas durante 20 min. a 5000 rpm.

Se transfirió 1000  $\mu$ l de sobrenadante de los tubos de ensayo a tubos de ensayo nuevos, y se añadió 500  $\mu$ l de reactivo PHBAH, seguido de ebullición durante 10 min.

Los tubos de ensayo fueron enfriados en agua helada.

La absorbencia de las muestras fueron medidas en un espectrofotómetro a 410 nm.

### Curva de glucosa estándar

Una solución madre concentrada conteniendo 300 mg/l fue diluida a 5, 10, 15 y 25 mg/l.

1000  $\mu$ l de los estándares diluidos fueron mezclados con 500  $\mu$ l de reactivo PHBAH, y fueron tratados como las otras muestras, véase arriba.

### Determinación de actividad

La liberación de glucosa de reducción equivalente fue calculada usando la curva estándar.

La concentración enzimática fue calculada usando la absorbencia molar de 66310 ( $\epsilon$ ) para la endoglucanasa EG I. El  $K_m$ ,  $V_{max}$  y  $K_{cat}$  fue calculado a partir de un gráfico de Lineweaver-Burk usando concentraciones de sustrato diferentes.

La absorbencia molar de las variantes de celulasa teniendo tirosinas sustituidas y triptofanos fue ajustada en consecuencia usando un valor de absorbencia para triptófano de 5690 ( $\epsilon$ ) y para tirosina de 1280 ( $\epsilon$ ) y cisteína 120 ( $\epsilon$ ).

## ES 2 360 529 T3

Los coeficientes de extinción ( $\epsilon$ ) están descritos en Gill, S.C. and Hippel, P.H.: Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data; Analytical Biochemistry vol 182, (319-326), (1989).

Cada una de las celulasas evaluadas fue purificada hasta obtener alta homogeneidad dando una única banda en  
5 Análisis de SDS-PAGE (la proporción  $A_{280}/A_{260}$  fue controlada como aquella superior a 1.5).

### Preparación de celulosa hinchada con ácido

#### Materiales

- 10 5 g Avicel®. (Art. 2331 Merck)
- 150 ml Ácido orto-fosfórico al 85%. (Art. 573 Merck)
- 15 400 ml Acetona. (Art. 14 Merck)
- 1.3 l Agua desionizada (Milli Q)
- Vaso de precipitados de cristal de 1 l
- 20 Embudo de cristal con filtro de 1 l
- Matraz de succión de 2 l
- 25 Homogeneizador Ultra Turrax.

#### Procedimiento

Se enfrió sobre hielo la acetona y el ácido fosfórico.

30 Los 5 g. de Avicel®, fueron humedecidos con agua, luego se añadió 150 ml de ácido orto-fosfórico enfriado con hielo al 85%, y la mezcla fue colocada sobre un baño de hielo con agitación débil durante 1 h. Se añadió 100 ml de acetona enfriada con hielo con agitación, seguido de transferencia de la mezcla a un embudo de cristal con filtro, seguido de lavado con 3 x 100 ml de acetona enfriada con hielo y succión en seco después de cada lavado.

35 La torta de la filtración fue lavada con 2 x 500 ml agua y aspirada hasta quedar lo más seca posible después de cada lavado.

40 La torta de la filtración fue resuspendida hasta un volumen total de 300 ml y mezclada hasta la homogeneidad (usando el Homogeneizador Ultra Turrax).

El producto resultante fue almacenado en un refrigerador.

Se obtuvo el resultado siguiente

45 EG I\* de *Humicola insolens* (Figura 3):

$k_{cat}$  a 8.5: 16 por seg

50  $k_{cat}$  a 10: 12 por seg.

El coeficiente de extinción fue 66310.

EGI-Fus de *Fusarium oxysporum* (Figura 4):

55  $k_{cat}$  a 8.5, 40°C: 16 por seg (km 8 g/l)

$k_{cat}$  a 10, 40°C: 4 por seg (km 8 g/l).

60 El coeficiente de extinción molar fue 58180, calculado en base a la composición de aminoácido.

#### Ejemplo 1

##### Prueba con Tergotometer (medidor del grado de limpieza) de múltiples ciclos de EG I\* contra EG I

65 El ejemplo ilustra los efectos de la eliminación de suciedad superior de EG I\* (EG I truncada, 402 aminoácidos, ver Figura 3) contra EG I (415 aminoácidos, WO 91/17244 Fig. 14A-E). En el ejemplo EMPA se han usado 101 pañuelos como trazadores de la eliminación de suciedad (negro carbón/aceite de oliva).

## ES 2 360 529 T3

Se usó la siguiente composición detergente:

		% en peso
5	LAS, (Nansa 1169/p)	10.3
	AES, (Berol 452)	3.5
	JABON (C18)	0.5
	JABON (C14)	0.5
10	AEO (Dobanol 25-7)	6.4
	Sodioxilenosulfonato	5.1
	Etanol	0.7
15	MPG	2.7
	Glicerol	0.5
	Sulfato sódico	0.40
	Carbonato sódico	2.7
20	Citrato sódico	4.4
	Ácido cítrico	1.5
	Agua	Resto

### 25 *Procedimiento de prueba*

La prueba se basó en una prueba de lavado de 2 ciclos en un Tergometer usando la composición detergente anteriormente descrita en una solución al 0.3% con 1 mM Ca<sup>++</sup>.

30	Agitación	150 m/min
	Temperatura	40°C
	pH	8.2
35	Pañuelos	EMPA 101 (2 pañuelos de 5X6 cm pr 100 ml)
	Tiempo de lavado	20 minutos
	Enjuague	10 minutos en agua corriente
40	Secado	Secado en línea a temperatura ambiente
	Repeticiones	2.

### *Resultado*

45 El resultado de eliminación de suciedad es dado como remisión R Delta (tratado con enzimas contra ciego) medido a 420 nm con un aparato Elrepho (DataColor).

Enzima	R (8.D.) Delta R
50 Sin enzimas	41.99 (0.41) 0
EG I, 4 ECU/I	42.00 (0.28) 0.01
55 EG I, 8 ECU/I	41.24 (0.45)-0.75
EG I, 12 ECU/I	42.69 (0.32) 0.71
EG I, 20 ECU/I	43.05 (0.32) 1.06
60 EG I*, 4 ECU/I	41.61 (0.37)-0.38
EG I*, 8 ECU/I	43.41 (0.39) 1.42
65 EG I*, 12 ECU/I	44.29 (0.35) 2.30
EG I*, 20 ECU/I	44.34 (0.47) 2.35.

## ES 2 360 529 T3

### Ejemplo 2

#### Efecto de dispersión de carbón de EG I\*

5 Se supone que el efecto de eliminación de partículas de suciedad de las endoglucanasas se debe en parte a la separación de enlaces glicosídicos en la matriz de celulosa, pero hasta cierto punto la enzima puede también proporcionar un mayor efecto de limpieza no específico, por ejemplo, mejorando la dispersabilidad de las partículas de suciedad. En esta prueba se muestra que la EG I\* (EG I truncada, 402 aminoácidos, ver Figura 3) difiere de EG I (415 aminoácidos, WO 91/17244 Fig. 14A-E) respecto a su capacidad para dispersar carbón activo.

10 Cantidades diferentes de EG I y EG I\* purificadas fueron añadidas en 10 ml de un 1 g/l suspensión de carbono activo (Norit) en 10 mM de Tampón de fosfato, pH 10.

15 Las mezclas fueron incubadas durante 30 minutos a 55°C y 150 rpm.

Tras la incubación las muestras fueron dejadas enfriar a temperatura ambiente y se dejó que el carbono no dispersado se asentara (sin centrifugación) durante 15 minutos. Se valoró la cantidad de carbono que fue dispersado midiendo la OD<sub>582 nm</sub> del sobrenadante (a 582 nm se encontró un valor máximo muy probablemente como resultado de la dispersión). Debido a la naturaleza del experimento (soluciones no homogéneas, dependencia del tiempo etc), los niveles absolutos de OD<sub>582 nm</sub> pueden variar entre las pruebas realizadas, mientras que pueden mantenerse normalmente los niveles relativos.

La tabla abajo muestra los resultados obtenidos en la prueba:

Enzima	conc. (mg/l)	ΔOD (582nm)
EG I	5	0.09
	10	0.30
EG I*	5	0.40
	10	0.49

ΔOD (582nm) = OD<sub>582nm</sub> (con enzima) - OD<sub>582nm</sub> (sin enzima) / OD<sub>582nm</sub> (sin enzima) = 0.716

35 Los resultados muestran que EG I\* difiere significativamente de EG I en cuanto a su capacidad de dispersión de carbón - a 5 mg/l nivel de ΔOD (582 nm) obtenido con EG I\* es cuatro veces superior al obtenido con EG I. También debe observarse que el efecto de EG I\* es realmente muy amplio - el nivel aparente de detergencia es aumentado en aproximadamente 70% ante 10 mg/l de EG I\*.

### Ejemplo 3

#### Pérdida de fuerza de tracción inducida por celulasa

45 Las celulasas usadas para la eliminación de suciedad en detergentes suelen producir un mayor desgaste del tejido. Esto puede observarse por la menor fuerza de tracción del tejido.

En el presente ejemplo se comparan tres celulasas: Celluzyme® (una preparación con celulasa comercial conocida), EG I\* de *H. insolens* (Figura 3) y EG I-Fus de *Fusarium* (Figura 4) (ambas celulasas de la presente invención).

50 Celluzyme® es un producto multicomplejo de celulasa de *Humicola insolens* usado en detergentes para la eliminación de suciedad y clarificación del color.

#### Experimento:

Tampón:	0.05 M Tris-HCl, pH 7.0, 1 mM CaCl <sub>2</sub>
Tejido/cubeta:	4 pcs. de 5 x 25 cm; género de punto (ap. 18 g)
Dosificación:	10000 ECU/l of Celluzymes®, <i>Humicola insolens</i> EGI PPC 4192, <i>Fusarium</i> EGI-161294/MChr.
Volumen:	100 ml
Tiempo:	7 días almacenamiento en ambiente oscuro, 25 °C.
Enjuague:	10 min en agua desionizada.
Evaluación:	Se mide la fuerza de tracción por tracción en húmedo sobre Instron.

## ES 2 360 529 T3

Se obtuvieron los siguientes resultados:

	% pérdida de fuerza de tracción	
5	Ciego (sin celulasa)	0% ± 8% **)
	Celluzyme	41%
	EG I* de <i>H. insolens</i>	8%
10	EGI-Fus de <i>Fusarium</i>	-4%

\*\* ) 0% pr. definición; 8% es desviación típica relativa.

De los resultados se puede concluir que EG I\* de *H. insolens* y EGI Fus de *Fusarium oxysporum* son eficaces para la eliminación de la suciedad sin que su uso suponga una pérdida significativa de la fuerza de tracción en el tejido.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Endoglucanasa que es derivable de una cepa de *Humicola insolens*, donde dicha endoglucanasa comprende 402  
residuos de aminoácidos como se relaciona en la Figura 3 y opcionalmente un enlace C-terminal que consiste en 10  
aminoácidos como mucho, o una variante de dicha endoglucanasa teniendo una secuencia de aminoácidos que es al  
menos un 95% idéntica a dicha secuencia relacionada en la Figura 3 y donde dicha variante tiene uno o más de los si-  
guientes residuos de aminoácidos sustituidos: N89Q; N89Q+N247Q; H123N; T385N; Q399N; E202A; S37W+P39W;  
M142E; K217A; K218T; K217A+K218T, R245G; I310D; E150Q; E334K; M198L.
- 10 2. Endoglucanasa según la reivindicación 1, donde uno o más de los siguientes residuos de aminoácidos dentro  
de 5 Å de la celobiosa enlazada son sustituidos; R106x; Y145x, S345x, D34x, W51x, S104x, A143x, Y171x, D173x,  
Q175x, Y177x, W347x, donde x es elegido para modificar la interacción hidrofóbica y/o potencial del enlace de H  
con el sustrato, y la numeración se refiere a la numeración de la endoglucanasa EG1 de *Fusarium oxysporum*.
- 15 3. Composición detergente que comprende una endoglucanasa según la reivindicación 1 ó 2 y un tensioactivo.
4. Composición detergente según la reivindicación 3, donde la endoglucanasa se deriva de una cepa de *Humi-  
cola insolens* y que tiene la secuencia de aminoácidos relacionada en la Figura 3 y un peso molecular aparente de  
aproximadamente 50 kD medido en SDS-PAGE.
- 20 5. Composición detergente según la reivindicación 3 ó 4, que además comprende una o más de otras enzimas, en  
particular amilasas, lipasas, proteasas, componentes de celulasa, peroxidasas, y/u oxidasas.
- 25 6. Proceso de lavado donde el tejido sucio es tratado con una endoglucanasa según la reivindicación 1 ó 2.
7. Uso de una endoglucanasa según la reivindicación 1 ó 2 en composiciones detergentes o en composiciones de  
suavizante en una cantidad que es eficaz para la eliminación de suciedad.
- 30 8. Uso de una endoglucanasa según la reivindicación 1 ó 2 para la clarificación del color de tejidos textiles (elimi-  
nación de pelusas y bolitas).
9. Uso de una endoglucanasa según la reivindicación 1 ó 2 para evitar la redeposición en el lavado de tejido.
- 35 10. Uso de una endoglucanasa según la reivindicación 1 ó 2 para la eliminación de la suciedad en tejidos.
11. Uso de una endoglucanasa según la reivindicación 1 ó 2 para el biopulido de tejidos.
12. Uso de una endoglucanasa según la reivindicación 1 ó 2 para el desentintado de papel usado.
- 40 13. Uso de una endoglucanasa según la reivindicación 1 ó 2 para mejorar el drenaje de la pasta de papel.
14. Uso de una endoglucanasa según la reivindicación 1 ó 2 para el desfibrado de pasta de papel.
- 45 15. Uso de una endoglucanasa según la reivindicación 1 ó 2 para el descortezado para pasta de papel.
- 50
- 55
- 60
- 65

Proteína: Humicola insolens

Secuencia de aminoácidos

-----  
 QKPGETKEVH PQLTTFRCYK RGGCKPATNF IVLDSLSPHI HRAEGLGPGG CGDWGNPPPK DVCFDVESCA 70  
 KNKIMEGIPD YSQYGVTTNG TSLRLQHILP DGRVPSRVY LLDKTKRRYE MLHLTGFEFT FDDVATKLLPC 140  
 GMSALYLSE MHPICAKSKY NSGGAYYCTG YCDRAQCFTVP FINGLGNIEG KGSCCNEMDI WEVNSRASHV 210  
 VPHTCNKKGL YLCEGECAF EGVCDKNGCG WNNYRVNVTD YYGRGEEFKV NTLKPFYVVT QFLANRRGKL 280  
 EKIHRFYVQD GKVIESFYTN KEGVPYTNMI DDEFCEATGS RKMELGATQ GMGEALTRGM VLAMSIIMWDQ 350  
 GGNMEMLDHG EAGPCAKGEG APSNIVQVER FPEVYTNLR WGEIGSTYQE LQ 402  
 -----

Fi.  
 19.  
 1

Composición :

aa	#	%	aa	#	%	aa	#	%
Xxx [X]:	0	0.00	Pro [P]:	23	5.72	Leu [L]:	26	6.47
Asp [D]:	18	4.48	Gly [G]:	47	11.69	Tyr [Y]:	19	4.73
Asn [N]:	22	5.47	Ala [A]:	18	4.48	Phe [F]:	15	3.73
Thr [T]:	28	6.97	Val [V]:	25	6.22	Lys [K]:	23	5.72
Ser [S]:	18	4.48	Cys [C]:	18	4.48	His [H]:	10	2.49
Glu [E]:	31	7.71	Met [M]:	11	2.74	Trp [W]:	7	1.74
Gln [Q]:	12	2.99	Ile [I]:	14	3.48	Arg [R]:	17	4.23

Aljneamiento	
Egltrire	54
Cendofus	54
EGIHUM	59
<p>qQPGTSTPEVHPKLTIVYKCTKSGGCVAAQQTSSVLDwny rwm-----HNYNSCTVNGGVN                      -OTPDKAKEQHPKLETYRCTKASGCKKQTNYYIVADagihgir-----RSAGCGDWGQKPN                      -QKPGETKEVHPQLTTFRC TKRGCKPATNFIVLDSlshpihraeglgPGGCGDWGNPPP</p>	
Egltrire	111
Cendofus	109
EGIHUM	113
<p>TTLCPDEATCGKNCFIEGV---DYAASGVTTSSSLLTMNQYMPSSsggyssVSPRLYLLD                      ATACPDEASCAKNCILSGMdsnaYKNAGITTSGNKRLQLINNQL-----VSPRVYLLE                      KDVCDPDVESCAKNCINEGIP---DYSQYGVTTNGTSLRLQHILPDgrv-----PSPRVYLLD</p>	
Egltrire	168
Cendofus	169
EGIHUM	171
<p>SD-GEYVMLKLNQELSFVDLSALPCGENGLYLSQMDENGGAN--QYNTAGANYGSGY                      ENKKYEMLHLTGTEFSFDVEMEKLPCCMNGALYLSEMPQDGGKStSRNSKAGAYYGAGY                      KTKRRYEMLHLTGFEFTFDVDATKLPCCMNSALYLSEMHPTGAKS--KYNPGGAYYGTYG</p>	
Egltrire	214
Cendofus	229
EGIHUM	231
<p>CDAQCPVQWRNGTLNTSHQFCCEMNDILEGNSRANALTPHSC-----TA                      CDAQCVTPFINGVGNIKQGVCCELDIWEANSRATHIAPHCSKpglygctgdecgSS                      CDAQCFVTPFINGLGNIEGKSCCCEMNDIWEVNSRASHVVPHTCNKkglylcegeecaFE</p>	
Egltrire	274
Cendofus	289
EGIHUM	291
<p>TACDSAACGFNPGSGYKSYGPGDtvdt sktftitqfntdngspsgnlvsitrkyqqm                      GICDKAGCGWNNRINVTDFYGRGKqykvdstrkftvtsgfvankqgdlielhrhyiqdn                      GVC DKNGCGWNNYRVNVVTDYYGRGEefkvntlkpftvvtqflanrrrgklekhrfyvqdg</p>	
Egltrire	322
Cendofus	349
EGIHUM	351
<p>gvdipsaqpggdtisscpsasay-----GGLATMGKALSSGMVLVFSIWN DNS                      kviesavvnisgppkinfindkycaatganeymrLGGTKQMGDAMSRGMVLAMSVWVWSEG                      kviesfytakegvpvpytnmiddefceatgsrkymelGATQCGMGEALTRGMVLAMSIWWDQG</p>	
Egltrire	382
Cendofus	409
EGIHUM	411
<p>QYMNWLDSGNAGPCSSTEGNPSNILANNPNTHVVFSNIRWGDIGSTTNSTAPPPPPasst                      DFNWLDQGVAGPCDATEGDPKNIVKVPNPEVTFNSIRIGEIGSTSSVKAPAYPpghr1                      GNMEWLDHGEAGPCAKGEGAPSNIVQVEPFPEVITYTNL.RWGEIGSTYQEVQKPKpkpghg</p>	
Egltrire	435
Cendofus	409
EGIHUM	415
<p>tftctrrssttsspsctqthwgqcggygysgckctctsgtccqyndyysqcl                      -----                      prsd-----</p>	

Fig. 2

Proteína: Humicola insolens

Secuencia de aminoácidos

QKPGETKEVH PQLTTFRCCTK RGGCKPATNF IVLDSLHPI HRAEGLGPGG CGDWGNPPPK 60  
 DVCPDVESCA KNCIMEGIPD YSQYGVYTTNG TSLRLQHLIP DGRVPSRVY LLDKTKRRYE 120  
 MLHLTGFEFT FDVDATKLLPC GMNSALYLSE MHPTGAKSKY NPGGAYYGTG YCDAQCFVTP 180  
 FINGLGNIEG KGSCCNEMDI WEANSRASHV APHTCNKKGL YLCEGECAF EGVCDKNGCG 240  
 WNNYRVNVTD YYGRGEEFKV NTLKPFVTVT QFLANRRGKL EKIHRYVVDQ GKVIESFYTN 300  
 KEGVPYTNMI DDEFCEATGS RKYMELGATQ GMGEALTRGM VLAMSIWWDQ GGNMELDHDG 360  
 EAGPCAKGEG APSNIVQVEP FPEVYTNLR WGEIGSTYQE LQ 402

Composición :

aa	#	%	aa	#	%	aa	#	%
Xxx [X]:	0	0.00	Pro [P]:	2	45.97	Leu [L]:	2	66.47
Asp [D]:	18	4.48	Gly [G]:	47	11.69	Tyr [Y]:	19	4.73
Asn [N]:	22	5.47	Ala [A]:	20	4.98	Phe [F]:	15	3.73
Thr [T]:	28	6.97	Val [V]:	23	5.72	Lys [K]:	23	5.72
Ser [S]:	17	4.23	Cys [C]:	18	4.48	His [H]:	10	2.49
Glu [E]:	31	7.71	Met [M]:	11	2.74	Trp [W]:	7	1.74
Gln [Q]:	12	2.99	Ile [I]:	14	3.48	Arg [R]:	17	4.23

Fig. 3

**Fusarium ENDO a EG i fam-C MADURO**

Secuencia de proteínas maduras con aminoácidos de código de una letra

QTPDKAKEQH PKLETYRCTK ASGCKKQFNY IVADAGIHGI RQKNGAGCGD  
 WGQKPNATAC PDEASCAKNC ILSGMDSNAY KNAGITTSNG KLRLQQLINN  
 QLVSPRVYLL EENKKYEML HLTGTEFSFD VEMEKLPCCM NGALYLSEMP  
 QDGGKSTSRN SKAGAYYGAG YCDAQCYVTP FINGVGNKQ QGVCCNELDI  
 WEANSRATHI APHPCSKPGL YGCTGDECCS SGICDKAGCG WNHNRINVTD  
 FYGRGKQYKV DSTRKFTVTS QFVANKQGD L IELHRHYIQD NKVIESAVVN  
 ISGPPKINFI NDKYCAATGA NEYMRILGGTK QMGDAMSRGM VLAMSVWVWE  
 GDFMAWLDQG VAGPCDATEG DPKNIVKVQP NPEVTFSNIR IGEIGSTSSV  
 KAPAYPGPHR L

**Fig. 4**

**Fusarium ENDO a EG i fam-C MADURO**

Composición :		aa		#		%	
aa	#	aa	#	aa	#	aa	%
Xxx [X] :	0	Pro [P] :	20	Leu [L] :	21	Leu [L]	5.11
Asp [D] :	21	Gly [G] :	45	Tyr [Y] :	17	Tyr [Y]	4.14
Asn [N] :	28	Ala [A] :	32	Phe [F] :	9	Phe [F]	2.19
Thr [T] :	22	Val [V] :	21	Lys [K] :	31	Lys [K]	7.54
Ser [S] :	26	Cys [C] :	18	His [H] :	9	His [H]	2.19
Glu [E] :	20	Met [M] :	11	Trp [W] :	6	Trp [W]	1.46
Gln [Q] :	18	Ile [I] :	22	Arg [R] :	14	Arg [R]	3.41

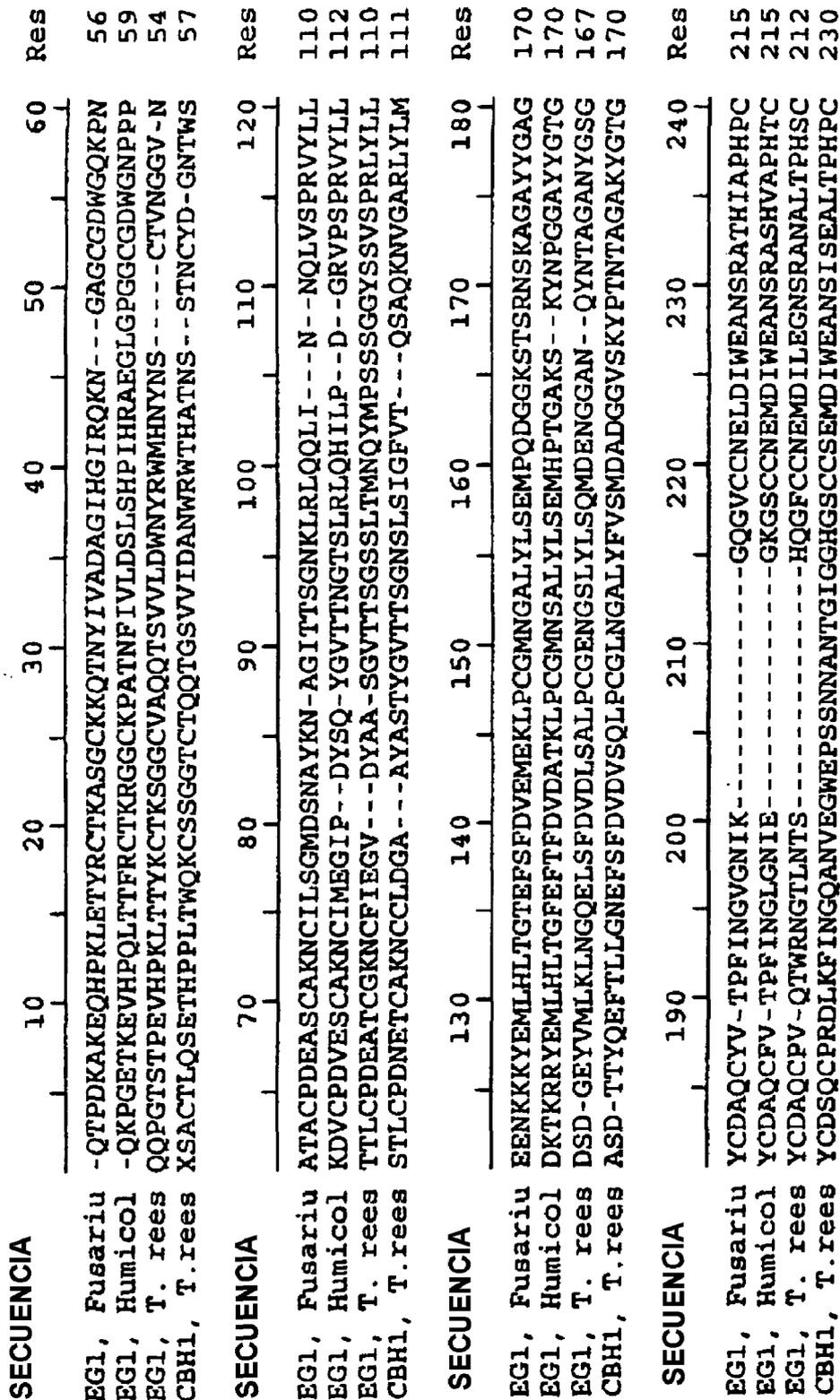


Fig. 5 (parte I)

SECUENCIA	250	260	270	280	290	300	Res
EG1, Fusariu	SKPGLYGCTGDECG-----SSGICDKAGCGWNHNRINVTDFYGRGKQYKVDSTRKFTV						268
EG1, Humicol	NKKGLYLCEGECA-----FEGVCDKNGCGWNNYRVNVTDYGRGEEFKVNTLKPFTV						268
EG1, T. rees	TAT---ACDSAGCG-----FNPYGSYKSYGPGDVT--DTSKTFTI						249
CBH1, T.rees	TTVGQEICEGDGCGGTYSNRYGGTCDPDGCDWNPYRLGNTSFYGPSSFTLDTTKKLTV						290
SECUENCIA	310	320	330	340	350	360	Res
EG1, Fusariu	TSQFVANKQ---GDLIELHRHYIQDNKVIESAVERNISGPPKINFINDKYCAATGA---N						321
EG1, Humicol	VTQFLANRR---GKLEKIHRFYVDGKVIESFYTNKEGVPYTNMIDDEFCEATGS---R						321
EG1, T. rees	ITQFNTDNGSPSGNLVSITRKYQQNGVDIPSA-----QPGGDTISSCPSASA-----						296
CBH1, T.rees	VTQFETS-----GAINRYVYVQNGVTFQQPNAEL-GSYSGNELNDDYCTAEAEFFGGS						341
SECUENCIA	370	380	390	400	410	420	Res
EG1, Fusariu	EYMRLLGGTKQMGDAMSRGMVLA MSVWVWSEGD FMAWLDQG-----VAGPCDATE						369
EG1, Humicol	KYMEIGATQGMGEALTRGMVLA MSIWWDQGGNMEWLDHG-----EAGPCAKGE						369
EG1, T. rees	----YGGLATMGKALSSGMVLVFSIWNDNSQYMNWLD SG-----NAGPCSSSTE						340
CBH1, T.rees	SFSDKGGGLTQFKKATSGGMVLA MSWLDWDDYYANMLWLDSTYPTNETSSTPGAVRGS CSTSS						401
SECUENCIA	430	440	450	460	470	480	Res
EG1, Fusariu	GDPKNIVKVPQNPPEVTFNSNIRIGEIGSTSSVKAPAYPGPHRL						411
EG1, Humicol	GAPSNIVQVEPFPPEVTYNLRWGEIGSTYQEVQKPKPKPHGPRSD						415
EG1, T. rees	GNPSNILANNPNTHVVFSNIRWGDIGSTINSTAPP PPPASSTTFST						386
CBH1, T.rees	GVPAQVESQSPNAKVTFFSNIKFGPIGSTGNPSG						434

Fig. 5 (parte II)

**Secuencia de aminoácidos de endoglucanasa de *Myceliophthora thermophila*:**

1  
MGRGAAFLGL ASLLVGAAGA QTPGEGEEVH PQITTYRCK 40  
ADGCEEKTNV IVLDALSHPV HQVDNPYNGC DWGQKPNETA 80  
CPDLESCARN CIMDPVSDYG RHGVSTDGTS LRLKQLVGGN 120  
VVSPRVYLLD ETKERYEMLK LTGNEFTFDV DATKLPCGMN 160  
SALYLSEMDA TGARSELNPG GATFGTGYCD AQCYVTPFIN 200  
GLGNIEGKGA CCNEMDIWEA NARAQHIAPH PCSKAGPYLC 240  
EGAECEFDGV CDKNGCAWNP YRVNVTDYG EGAEFRVDTT 280  
RPFSVVTQFR AGGDAGGGKL ESIYRLFVQD GRVIESYVVD 320  
KPGLPPTDRM TDEFCAATGA ARFTELGAME AMGDALTRGM 360  
VLALSIWWE GDNMNWLDSE EAGPCDPDEG NPSNIIRVQP 400  
DPEVVFSNLR WGEIGSTYES AVDGPVGK GKGGKAPAG 440  
DGNGKEKSNG KRFRRF 456

La secuencia de proteínas comienza en la posición 21.

Los últimos 36 residuos de aminoácidos de una cola que se eliminará por las proteasas.

**Fig. 6**