

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 384 276**

51 Int. Cl.:

C12N 9/42 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

C12N 15/56 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

D06M 16/00 (2006.01)

C11D 3/386 (2006.01)

A23K 1/165 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07730683 .5**

96 Fecha de presentación: **12.04.2007**

97 Número de publicación de la solicitud: **2007884**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **31.12.2008**

54 Título: **Proteínas de fusión de celulasas y uso de las mismas**

30 Prioridad:
13.04.2006 FI 20065234
13.04.2006 US 404065

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
03.07.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
03.07.2012

73 Titular/es:
AB ENZYMES OY
TYKKIMÄENTIE 15
05200 RAJAMÄKI, FI

72 Inventor/es:
ALAPURANEN, Marika;
VALTAKARI, Leena;
KALLIO, Jarno;
OJAPALO, Pentti y
VEHMAANPERÄ, Jari

74 Agente/Representante:
de Elzaburu Márquez, Alberto

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).

ES 2 384 276 T3

DESCRIPCIÓN

Proteínas de fusión de celulasas y uso de las mismas.

Campo de la invención

La presente invención se refiere a la tecnología enzimática, y más exactamente, a proteínas de fusión de celulasa que comprenden un dominio catalítico y un dominio de fijación a la celulosa. Las proteínas de fusión se pueden producir con técnicas recombinantes mediante el uso de los polinucleótidos, vectores de expresión y células hospedadoras apropiados, que también están englobados por la invención. Las proteínas de fusión y las preparaciones enzimáticas de las mismas son útiles para tratar el material celulósico, tal como el material textil. Además, las proteínas de fusión se pueden utilizar en la industria papelera, en extracción de aceite desde las plantas, en composiciones de detergentes o para mejorar la calidad de los alimentos para consumo animal. Por lo tanto, la invención se refiere además a un procedimiento para tratar material celulósico con la proteína de fusión y, en especial, a los procedimientos para biodesgaste (del inglés *biostonning*) o bioacabado de tejidos o prendas, especialmente el dril (denim). La invención también se refiere además a composiciones de detergente y alimento para consumo animal que contienen las proteínas de fusión.

15 Antecedentes de la invención

La celulosa es el componente estructural más importante de las plantas superiores y se genera en la naturaleza en forma casi pura únicamente en la fibra de algodón. Proporciona una gran resistencia tensora a células vegetales que les ayuda a resistir las agresiones mecánicas y la presión osmótica. La celulosa es un polisacárido lineal de restos de glucosa conectados mediante enlaces β -1,4. En la naturaleza, la celulosa suele estar asociada a la lignina y a las hemicelulosas. El material celulósico se degrada en la naturaleza mediante una serie de organismos deferentes, entre ellos las bacterias y los hongos. La conversión biológica de la celulosa en glucosa generalmente requiere tres grupos importantes de enzimas: celobiohidrolasas (CBH), endoglucanasas (EG) y β -glucosidasas (BG).

Las celulasas tienen un amplio espectro de aplicaciones industriales. En la industria textil, las celulasas se utilizan en el acabado del dril para crear una apariencia de lavado a la piedra a la moda en las prendas de dril en un proceso de biodesgaste. Las celulasas también se utilizan, por ejemplo, para limpiar de pelusa e impedir la formación de pelotillas en la superficie de las prendas de algodón. En la industria del detergente, las celulasas se utilizan para abrillantar los colores y para impedir el agrisado y la formación de pelotillas en las prendas. Las celulasas se utilizan además en la industria de la alimentación y en la fabricación de alimentos para consumo animal, y tienen un gran potencial en la industria papelera, por ejemplo, en el destintado que libera la tinta de la superficie de las fibras y para mejorar el drenaje de la pasta de papel.

Las celulasas utilizadas industrialmente son a menudo mezclas de enzimas que tienen muy diversas actividades y especificidades de sustrato. Las preparaciones de enzimas comerciales a menudo comprenden tres actividades celulásicas, a saber, CBH, EG y BG. Además, las propiedades únicas de cada celulasa hacen que algunas sean más adecuadas para determinados propósitos que otras y, por lo tanto, también se han hecho esfuerzos para obtener y utilizar celulasas que tienen sólo las actividades deseadas. Las celulasas utilizadas más ampliamente de origen fúngico proceden de *Trichoderma reesei*. Sin embargo, también se han sugerido otras fuentes fúngicas, p. ej., en la patente de los EE.UU. n.º 5 457 046.

Las celulasas que se aplican al tratamiento del dril se suelen dividir en dos grupos principales: celulasas ácidas y celulasas neutras. Las celulasas ácidas normalmente funcionan a pH de 4,0 a 5,5, y las celulasas neutras en el intervalo de pH de 6 a 8. Las celulasas que tienen características tanto del grupo de las ácidas como de las neutras se denominan celulasas híbridas. Las celulasas ácidas utilizadas para el biodesgaste proceden principalmente de *Trichoderma reesei* (anamorfo de *Hypocrea jecorina*) y las celulasas neutras proceden de una variedad de hongos, que incluye los géneros *Melanocarpus*, *Hemicella*, *Myceliophthora*, *Fusarium*, *Acremonium* y *Chrysosporium* (Haakana et al., 2004). Las enzimas de *T. reesei* incluyen, p. ej., celulasas de la familia 5 (endoglucanasa II, EGII), de la familia 7 (celobiohidrolasa I, CBHI) y de la familia 12 (endoglucanasa III, EGIII; Ward et al, 1993) de las glucosilhidrolasas, y las celulasas neutras, más a menudo endoglucanasas, de la familia 45 y de la familia 7 (Henrissat, 1991; Henrissat y Bairoch, 1993, 1996).

La patente de los EE.UU. n.º 5 874 293 describe una composición mejorada de celulasas que comprende cantidades elevadas de la endoglucanasa EGII de *T. reesei* para tratar textiles que contienen celulosa. La composición mejoró las propiedades del color, incrementó la luminosidad y la apariencia visual y redujo la tendencia a formar pelotillas. La patente internacional WO 97/14804 describe unas celulasas de 20 kDa y una de 50 kDa con actividad endoglucanasa procedentes de *Melanocarpus* sp. que son especialmente útiles en la industria textil y de detergentes. Las proteínas de fusión que contienen las proteínas de 20 kDa o de 50 kDa unidas a un dominio de fijación a la celulosa, preferentemente de *Trichoderma reesei*, es lo que se sugiere que crea las nuevas propiedades enzimáticas. No se ofrecen ejemplos específicos, ni se describen las propiedades deseadas.

Sin embargo, sigue existiendo todavía la necesidad de mejorar las celulasas, entre ellas las endoglucanasas, para que sean más eficaces en el tratamiento de tejidos y en otros ámbitos, en donde tradicionalmente se utilizan las celulasas. En particular, hay una constante necesidad de celulasas más eficaces para mejorar los aspectos económicos del proceso. La presente invención persigue satisfacer estas necesidades.

- 5 En la industria textil, el interés de los productores de dril en los últimos años ha sido dar una apariencia de «lavado a la piedra» o una apariencia desgastada. El lavado a la piedra tradicional con piedra pómez reduce la resistencia del tejido y carga las máquinas donde se lava la ropa. Hay una tendencia hacia los procesos de acabado enzimático del dril, y las celulasas han reemplazado a la piedra pómez, o se están utilizado junto a ellas, para dar al tejido el aspecto «ajado» que se desea. Los tratamientos enzimáticos controlados dañan menos las prendas y las máquinas,
10 y eliminan la necesidad de deshacerse de las piedras.

- Un problema general asociado al lavado enzimático a la piedra es la retrotinción ocasionada por la redeposición del colorante índigo retirado durante o después del desgaste. La redeposición del colorante índigo reduce el contraste deseado entre los hilos coloreados de índigo y los blancos, y se puede observar más fácilmente por el revés del dril y en los bolsillos interiores (como un incremento del azul). En el lado del derecho, esto se puede observar como una
15 reducción del contraste entre las áreas coloreadas y las áreas de las cuales se ha retirado el colorante durante el biodesgaste. La retrotinción se puede reducir con el uso durante el tratamiento de agentes de antirretrotinción, tales como alcoholes etoxilados no iónicos, o con la adición de blanqueantes durante las etapas de enjuague. La naturaleza de la enzima afecta a la retrotinción. Las celulasas neutras generalmente retrotiñen menos que las celulasas ácidas.

- 20 La patente internacional WO 97/09410 describe la adición de un determinado tipo de celulasa a otra celulasa que tiene actividad de desgaste para reducir la retrotinción. La celulasa adicional pertenece a la familia 5 o a la 7, pero no tiene un efecto de desgaste significativo por sí misma. Preferentemente, dicha celulasa adicional procede de *Bacillus* o *Clostridium*.

- La patente de los Estados Unidos US 5 916 799 describe composiciones de celulasa que contienen tanto
25 celobiohidrolasas como endoglucanasas que se han sometido a proteólisis limitada para separar el núcleo y los dominios de fijación de las enzimas. Se encontró que las composiciones enzimáticas obtenidas reducían la retrotinción. La patente internacional WO 94/07983 se refiere al hallazgo de que la redeposición del colorante sobre el tejido durante el proceso de lavado a la piedra se puede reducir empleando una composición de celulasas fúngicas, que está sustancialmente libre de componentes de tipo celobiohidrolasa. La patente internacional WO
30 96/23928 describe el tratamiento de tejidos que contienen celulosa con enzimas celulásicas truncadas. Se encontró que las enzimas truncadas que carecían del dominio de fijación a la celulosa (CBD) reducían la redeposición del colorante e incrementaban el desgaste.

- La conclusión general de las tres referencias citadas más arriba podría ser que el dominio de fijación a la celulosa tiene un efecto negativo sobre la retrotinción. Sin embargo, la presente invención da a conocer ahora una
35 construcción de celulasa con una baja propiedad de retrotinción, a pesar de la presencia de un dominio de fijación a la celulosa.

Compendio de la invención

- La presente invención se basa en el hallazgo sorprendente de que el efecto de las endoglucanasas podría reforzarse significativamente conjugándoles un determinado dominio de fijación a la celulosa sin alterar las
40 propiedades de retrotinción.

- Un objeto de la presente invención es dar a conocer nuevas proteínas de fusión a endoglucanasa que tienen mejores propiedades hidrolíticas para utilizarlas en la industria textil, especialmente en el dril lavado a la piedra. Las proteínas de fusión de la invención presentan la ventaja de ser activas a valores ácidos y neutros del pH, y tienen un comportamiento muy mejorado en las aplicaciones de biodesgaste. Cuando se utilizan para tratar el dril, las
45 proteínas de fusión proporcionan poco efecto de retrotinción. Con la mejoría de la eficacia de las endoglucanasas de la invención, el uso de las enzimas es significativamente más económico. Se consiguen también otras ventajas en términos de logística y del almacenamiento de los productos enzimáticos, porque se necesita menos cantidad del producto enzimático. Las proteínas de fusión también son útiles en composiciones de detergente, así como en otros ámbitos, tales como la industria alimentaria, la extracción de aceite de las plantas, o la industria papelera.

- 50 Un objeto más de la presente invención es dar a conocer polinucleótidos que codifican las nuevas proteínas de fusión de endoglucanasa.

Otro objeto más de la presente invención es dar a conocer un método para producir las proteínas de fusión.

Otro objeto más de la presente invención es dar a conocer nuevos vectores de expresión que contienen tales

polinucleótidos, útiles para la producción de las proteínas de fusión de endoglucanasa, así como nuevos hospedadores transformados con dichos vectores de expresión.

Otro objeto más de la presente invención es dar a conocer preparaciones enzimáticas que contienen una o más proteínas de fusión de endoglucanasa nuevas.

- 5 Otro objeto más de la presente invención es dar a conocer métodos para tratar material celulósico con la proteína de fusión, p. ej., para uso en la industria textil, de detergentes, de alimentos para consumo animal, de extracción de aceite a partir de plantas, o en la industria papelera, y particularmente para el acabado de los tejidos, especialmente para el biodesgaste y el bioacabado del dril.

- 10 Otro objeto más de la presente invención es dar a conocer composiciones de detergente o de alimentos para consumo animal que contienen las proteínas de fusión.

- La presente invención se refiere a una proteína de fusión de celulasa que comprende una primera secuencia de aminoácidos de un núcleo de endoglucanasa que tiene al menos una identidad del 75% con la SEQ ID n.º 2, o un fragmento de la misma que tiene actividad celulasa, y una segunda secuencia de aminoácidos que comprende un conector y un dominio de fijación a la celulasa (CBD) que tiene al menos una identidad del 75% con la SEQ ID n.º 15, o un fragmento de la misma que tiene actividad fijadora de la celulosa.

La invención se refiere además a un polinucleótido aislado que se selecciona entre el grupo que consiste en:

a) una secuencia de nucleótidos de SEQ ID n.º 3, o una secuencia que codifica una proteína de fusión de celulasa según la reivindicación 1,

b) una hebra complementaria de a).

- 20 La invención se refiere adicionalmente a un vector de expresión que comprende dicha secuencia de nucleótidos, y a una célula hospedadora que comprende el vector de expresión, así como a una preparación enzimática que comprende la proteína de fusión.

- La invención también abarca un método para producir la proteína de fusión, que comprende las etapas de transformar una célula hospedadora con un vector de expresión que codifica dicha proteína de fusión y cultivar dicha célula hospedadora en condiciones que permiten la expresión de dicha proteína de fusión y, opcionalmente, recuperar y purificar la proteína de fusión producida.

La invención abarca adicionalmente un procedimiento para tratar material celulósico, en donde dicho procedimiento comprende poner en contacto el material celulósico con la proteína de fusión.

- 30 La invención también se refiere a un procedimiento para biodesgaste, que comprende la etapa de poner en contacto la proteína de fusión de celulasa o la preparación enzimática con tejido o prendas de dril, y a un procedimiento para el bioacabado, que comprende la etapa de poner en contacto la proteína de fusión de celulasa o la preparación enzimática con materiales textiles como tejidos o prendas o hilos.

- Finalmente, la invención se refiere a una composición de detergente que comprende la proteína de fusión y auxiliares de detergencia, a los alimentos para consumo animal que comprenden la proteína de fusión, y a una cepa de *Escherichia coli* que tiene el número de acceso *E. coli* DSM 18159.

Las realizaciones específicas de la invención se presentan en las reivindicaciones adjuntas.

Otros objetos, detalles y ventajas de la presente invención resultarán evidentes a partir de los dibujos, de la descripción detallada y de los ejemplos que vienen a continuación.

Breve descripción de los dibujos

- 40 En la figura 1 se ilustra un dibujo esquemático del casete de expresión utilizado en la transformación de los protoplastos de *T. reesei* para la producción de la celulasa EG28 o EG28+CtCBD de *T. aurantiacus*. El gen *cel5A* o *cel5A_Ct cel7A* conectorCBD está bajo el control del promotor *cbhl* de *T. reesei* (prom *cbhl*) y la terminación de la transcripción se asegura con la adición del terminador *cbhl* (term *cbhl*). El gen *amdS* (*amdS*) está incluido para la selección de los transformantes. El casete de expresión para la producción de EG28 y de EG28+CtCBD se aisló como un fragmento *NotI* de 8,6 kb a partir de pALK1930 o como un fragmento *NotI* de 8,9 kb a partir de pALK1948, respectivamente.

En la figura 2 se ilustra la dependencia del pH que tiene la celulasa EG28 de *T. aurantiacus* producida de forma heteróloga mediante la determinación del sobrenadante del cultivo con el CMC como sustrato en una reacción de 10

min a 50 °C (A). La temperatura óptima de la celulasa EG28 se determinó al pH óptimo (6,0). La reacción que contiene el CMC como sustrato se realizó durante 10 min (B). El pH y la temperatura óptima de la proteína de fusión EG28+CtCBD se determinó que eran los mismos que los de la celulasa EG28 de tipo silvestre.

En la figura 3 se muestra el efecto de biodesgaste de la celulasa EG28, mediante la medición del color, a temperaturas diferentes y pH 6.

En la figura 4 se muestra el efecto de biodesgaste de la celulasa EG28+CtCBD, mediante la medición del color, a diferentes valores de pH a 50 °C.

En la figura 5 se muestra el efecto de biodesgaste de la celulasa EG28+CtCBD, mediante la medición del color, a diferentes valores de pH a 60 °C.

En la figura 6 se muestra el efecto de biodesgaste de la celulasa EG28+CtCBD, mediante la medición del color, a temperaturas diferentes (pH 6).

En la figura 7 se muestra la influencia de la temperatura de granulación sobre la recuperación de la actividad β -glucanasa de los alimentos complementados con la celulasa EG28.

En la figura 8 se muestra la influencia de la temperatura de granulación sobre la recuperación de la actividad celulasa de los alimentos complementados con la celulasa EG28+CtCBD.

Descripción detallada de la invención

Las celulasas comprenden un dominio/núcleo catalítico (CD) que expresa actividad celulásica. Además del dominio catalítico, la molécula de celulasa puede comprender uno o más «dominios de fijación a la celulosa» («CBD»), también denominados módulos/dominios de fijación a glúcidos (CBD/CBM), que se pueden localizar o bien en el extremo amino o bien en el extremo carboxilo del dominio catalítico. Los CBD tienen actividad de fijación a glúcidos e intervienen en la fijación de la celulasa a la celulosa cristalina, pero tienen poco o ningún efecto sobre la actividad hidrolítica de la enzima en los sustratos solubles. Estos dos dominios están típicamente conectados mediante una región conectora muy glucosilada y flexible, llamada en la presente memoria «conector». Tales construcciones se describen, p. ej., en Srisodsuk et al., 1993. Algunas de las endoglucanasas y celobiohidrolasas que se producen de forma natural tienen un dominio de fijación a la celulosa (CBD), mientras que otras no.

Las endoglucanasas (EG) son uno de los tres tipos de celulasas que se necesitan generalmente para la conversión biológica de la celulosa en glucosa. Las endoglucanasas cortan los enlaces β -1,4-glucosídicos internos, mientras que las celobiohidrolasas cortan el disacárido celobiosa desde el extremo de la cadena polimérica de celulosa, y las β -1,4-glucosidasas hidrolizan la celobiosa y otros celooligosacáridos pequeños en glucosa. «Endoglucanasa» («EG») en conexión con la presente invención se refiere a las enzimas clasificadas como EC 3.2.1.4. Son 4-glucanohidrolasas de 1,4- β -D-glucano y catalizan la endohidrólisis de los enlaces 1,4- β -D-glucosídicos en los polímeros de glucosa tales como la celulosa. Algunas endoglucanasas pueden también hidrolizar, p. ej., los enlaces 1,4 en los β -D-glucanos que también contienen enlaces 1,3. Por consiguiente, también se pueden clasificar como endo-1,3(4)- β -glucanasas (EC 3.2.1.6). Así pues, una enzima puede catalizar reacciones sobre varios sustratos y puede pertenecer a varias clases.

Las celulasas, entre ellas las endoglucanasas, también se pueden clasificar en varias familias de hidrolasas de glucosilos de acuerdo con su secuencia primaria, apoyado por el análisis de la estructura tridimensional de algunos miembros de la familia (Henrissat 1991, Henrissat y Bairoch 1993, 1996). Por ejemplo, la familia 45 (con anterioridad celK) contiene endoglucanasas (EC 3.2.1.4) y la familia 5 (antes conocida como celA) consiste principalmente en endoglucanasas (EC 3.2.1.4). La familia 7 (antes familia de la celulasa celC) contiene tanto endoglucanasas como celobiohidrolasas. Algunas hidrolasas de glucosilos son enzimas multifuncionales que contienen dominios catalíticos que pertenecen a diferentes familias de hidrolasas de glucosilos. Para los propósitos de la presente invención, la parte endoglucanasa de la proteína de fusión pertenece preferentemente a la familia 45 o a la familia 5 de las hidrolasas de glucósidos, y más preferentemente a la familia 5.

De acuerdo con una realización preferente de la invención, la parte endoglucanasa de la proteína de fusión procede de un hongo, preferentemente del género *Thermoascus*, y más preferentemente de *Thermoascus aurantiacus*. Tal endoglucanasa la han descrito, p. ej., Hong et al., 2003. La patente internacional WO 03/062409 sugiere la utilización de esta enzima para aplicaciones en alimentos, porque además de la actividad endoglucanasa, también tiene actividad β -glucanasa. Más preferentemente, la endoglucanasa procede de la cepa de *T. aurantiacus* ALKO4242 depositada como CBS 116239. El gen de la endoglucanasa de dicha cepa se ha insertado en el plásmido pALK1926 y se ha depositado como DSM 17326. La proteína codificada por este gen se denomina en la presente memoria «Ta EG28» o simplemente «EG28».

Como referencia, la parte endoglucanasa de la proteína de fusión se puede obtener de *Acremonium sp.*, preferentemente de *A. thermophilum*, y más preferentemente de una cepa que tiene las características de la cepa ALKO4245 depositada como CBS 116240. La endoglucanasa que se obtiene de esta cepa y que está codificada por el gen *cel45A* se denomina en la presente memoria «At EG40» o simplemente «EG40».

- 5 El «núcleo» de la endoglucanasa, tal y como se utiliza en la presente memoria, se refiere al dominio/núcleo catalítico (CD) de una enzima que expresa al menos actividad endoglucanásica. Tal dominio catalítico puede estar en la forma en que se produce en la naturaleza (p, ej, intacto), o puede estar modificado.

- De acuerdo a una realización de la invención, el núcleo de la endoglucanasa tiene una identidad de al menos el 75, 80, 85, 90, 95, 98 o 99% con la SEQ ID n.º 2 (Ta EG28). Preferentemente, el núcleo comprende al menos la proteína madura, que corresponde a los aminoácidos 19 a 334 de la SEQ ID n.º 2. La predicción de la secuencia señal se realizó con el programa SignalP V3.0 (Nielsen et al., 1997; Bendtsen et al., 2004); el valor de NN se obtuvo con redes neuronales y el valor de HMM con modelos ocultos de Markov.

- «Celobiohidrolasa» o «CBH», tal y como se utiliza en la presente memoria, se refiere a las enzimas que escinden la celulosa desde el extremo de la cadena de glucosas y que producen principalmente celobiosa. También se denominan celobiohidrolasas de 1,4-β-D-glucano o 1,4-β-celobiosidasas de celulosa. Hidrolizan los enlaces 1,4-β-D-glucosídicos desde los extremos reductor y no reductor de un polímero que contiene dichos enlaces, tal como la celulosa, mediante lo cual se libera la celobiosa.

- El CBD que incluye el conector procede preferentemente de *Chaetomium thermophilum*, y especialmente del gen que codifica la celobiohidrolasa (CBHI/Cel7A) de la cepa ALKO4265, depositada como CBS 730.95. Este CBD que incluye el conector se denomina «CtCBD». De acuerdo a una realización preferente de la invención, el conector más el dominio de fijación a la celulosa tiene una secuencia que tiene una identidad de al menos el 80, 85, 90, 95, 98 o 99% con la SEQ ID n.º 15, (que corresponde a los aminoácidos 335 a 415 de la SEQ ID n.º 4). De acuerdo con otra realización preferente, la segunda secuencia de aminoácidos comprende los aminoácidos 335 a 379 de la SEQ ID n.º 4.

- 25 La terminología «procedente de» en conexión con una fuente de microorganismo significa que el polipéptido puede producirse de forma natural en dicha fuente de microorganismo específico, o el polinucleótido que codifica el polipéptido puede aislarse de dicha fuente de microorganismo, o la terminología se refiere a una célula hospedadora en la que se ha introducido el polinucleótido de dicha fuente de microorganismo que codifica el polipéptido. Sin embargo, esto no descarta modificaciones menores de la secuencia, p. ej., por sustitución, delección, inversión y/o inserción de uno o unos pocos aminoácidos/codones siempre y cuando se conserve la actividad biológica de la proteína codificada.

- El núcleo, y el conector+CBD, respectivamente, también pueden ser un fragmento de dichas secuencias, en donde dicho fragmento tiene actividad celulasa y/o actividad de fijación a la celulosa. Por ejemplo, la primera secuencia de aminoácidos puede comprender un fragmento de una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos el 75% con la SEQ ID n.º 2 u 8, y la segunda secuencia de aminoácidos puede comprender un fragmento de una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos el 75% con la SEQ ID n.º 15.

En el presente contexto, la «actividad celulasa» significa la capacidad catalítica para hidrolizar la celulosa o los derivados de la misma, tal como actividad endoglucanasa o β-glucanasa. Además de la actividad endoglucanasa y/o β-glucanasa, algunas de las celulasas pueden además tener actividad hemicelulasa y/o xilanasa.

- 40 Tal y como se utiliza en el presente contexto, la terminología «identidad» se refiere a la identidad global entre dos secuencias de aminoácidos comparadas entre sí desde el primer aminoácido codificado por el correspondiente gen hasta el último aminoácido. La identidad de las secuencias completas se mide con el programa de alineamiento global de Needleman-Wunsch del paquete de programas EMBOSS (European Molecular Biology Open Software Suite; Rice et al., 2000), versión 3.0.0, con los parámetros siguientes: EMBL62, penalización por hueco 10,0, penalización por extensión 0,5. El algoritmo se describe en Needleman y Wunsch (1970). El experto en la técnica es consciente del hecho de que los resultados con el algoritmo de Needleman-Wunsch son comparables sólo cuando se alinean los correspondientes dominios de la secuencia. Por consiguiente, se descartan por no ser significativas las comparaciones de, p. ej., secuencias de celulasa que incluyen el CBD o las secuencias señal con secuencias que carecen de esos elementos.

- 50 De acuerdo con una realización de la invención, la proteína fusión contiene un núcleo de endoglucanasa codificado por un gen similar al incluido en *E. coli* DSM 17326. Preferentemente, la proteína de fusión está codificada por una gen de fusión similar al incluido en *E. coli* DSM 18159. De acuerdo con una realización específica de la invención, la proteína de fusión contiene un núcleo de endoglucanasa que comprende la secuencia de SEQ ID n.º 2 y un conector y un CBD que comprende la secuencia de SEQ ID n.º 15. Especialmente, comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID n.º 4, o un fragmento de la misma que tiene actividad celulasa y actividad de fijación a la celulosa.

Se entiende que un «fragmento» es parte de una secuencia de aminoácidos específica que es suficientemente larga para tener la actividad biológica deseada. En otras palabras, el fragmento puede ser, p. ej., sólo la parte madura de la secuencia de aminoácidos o incluso una subsecuencia de la parte madura. Así pues, la actividad biológica en este contexto se refiere a la actividad celulasa, a la actividad de fijación a la celulasa, o a ambas.

- 5 La proteína de fusión de la invención se puede preparar con la unión de la parte del núcleo de la endoglucanasa a la parte de conector y CBD en el ADN codificante adecuado mediante las técnicas de ADN recombinante conocidas de forma general para producir la proteína recombinante deseada. Brevemente, se amplifican y se clonan los polinucleótidos que codifican los compañeros de fusión, pudiéndose también sintetizar los nucleótidos. El polinucleótido fusionado se inserta en un vector de expresión, se introduce por transformación en una célula
- 10 hospedadora y se expresa. Preferentemente, el conector y el CBD están unidos al extremo carboxilo del núcleo de la endoglucanasa.

- Un «vector de expresión» es un plásmido o vector de clonación capaz de expresar el ADN que codifica las proteínas de fusión de endoglucanasa después de introducirlo por transformación en un hospedador deseado. Cuando se utiliza un hospedador fúngico, el gen de interés se suministra preferentemente a un hospedador fúngico como parte
- 15 de un vehículo de expresión o de clonación que se integra en el cromosoma fúngico, o que permite que el gen de interés se integre en el cromosoma del hospedador. Otras secuencias que son parte del vehículo de clonación o del vehículo de expresión también se pueden integrar con dicho ADN durante el proceso de integración. Además, en los hongos, el vector de expresión o partes del mismo se pueden dirigir a locus predeterminados. Alternativamente, el gen de fusión deseado se suministra como un plásmido de replicación autónoma.

- 20 El ADN que codifica las proteínas de fusión de endoglucanasa se coloca preferentemente bajo el control de (p. ej., unido operativamente a) determinadas secuencias de control, tales como las secuencias promotoras proporcionadas por el vector. Tras la transformación, estas secuencias de control se integran en el genoma del hospedador con el gen de interés. Alternativamente, las secuencias de control pueden ser las del sitio de integración.

- Las secuencias de control de expresión de un vector de expresión variarán según si el vector está diseñado para expresar un determinado gen en un huésped procariótico o en un huésped eucariótico (por ejemplo, un vector
- 25 lanzadera puede proporcionar un gen para la selección en los hospedadores bacterianos). Las secuencias control de la expresión pueden contener elementos reguladores de la transcripción, tales como promotores, elementos potenciadores y secuencias de terminación de la transcripción, y/o elementos reguladores de la traducción, tales como sitios de iniciación y de terminación de la traducción.

- 30 Se dice que una molécula polinucleotídica, tal como el ADN, es capaz de expresar un polipéptido si contiene las secuencias de control de la expresión, las cuales contienen información reguladora de la transcripción, y tales secuencias están unidas operativamente a la secuencia nucleotídica que codifica el polipéptido.

- Una unión operativa es una unión en la que una secuencia está conectada con una secuencia o secuencias reguladoras de tal modo que se coloca la expresión de la secuencia bajo la influencia o bajo el control de la
- 35 secuencia reguladora. Se dice que dos secuencias de ADN (tal como una secuencia de la región promotora unida al extremo de 5' de la secuencia que codifica la proteína) están unidas operativamente si el funcionamiento del promotor da lugar a la transcripción.

Los vectores de la invención pueden además comprender otros elementos reguladores unidos operativamente, tales como secuencias potenciadoras.

- 40 En una realización preferente se construyen transformantes genéticamente estables, mediante los cuales el ADN que codifica las proteínas de fusión está integrado en el cromosoma del hospedador al haber sido transformado con un vector, el cual puede albergar secuencias que favorecen la integración de dicho vector en el cromosoma.

- Las células que tienen integrado de forma estable el ADN que codifica las proteínas de fusión de endoglucanasa en el cromosoma se pueden seleccionar, p. ej., mediante el o los marcadores introducidos, homólogos o heterólogos,
- 45 que permiten la selección de las células hospedadoras que contienen el vector de expresión en el cromosoma, por ejemplo, el marcador puede proporcionar resistencia a biocidas, p. ej., resistencia a antibióticos, o a metales pesados, tales como el cobre, o el marcador complementa una mutación auxótrofa en el cromosoma del hospedador, y similares. El marcador de selección puede, por ejemplo, ser un gen de selección unido directamente a la secuencia del ADN del gen a expresar, o introducirse en la misma célula mediante cotransformación. También se
- 50 pueden utilizar otros sistemas de selección.

Una vez que se prepara el vector de expresión que contiene el ADN que codifica la proteína de fusión, se introduce en una célula hospedadora adecuada mediante uno cualquiera de los muchos medios adecuados, entre ellos la transformación como se conoce en la técnica. Después de la transformación, las células receptoras se hacen crecer en un medio de selección apropiado, que sólo dejará crecer a las células transformadas.

Los sistemas hospedadores adecuados de producción y de expresión son, por ejemplo, el sistema de producción desarrollado para los hospedadores fúngicos *Trichoderma* (patente europea EP 244 234), o *Aspergillus*, tal como *A. oryzae* o *A. niger* (patentes internacionales n.º WO 97/08325 y WO 95/33386, patente de los EE.UU. n.º 5 843 745, patente de los EE.UU. n.º 5 770 418), o el sistema de producción desarrollado por *Fusarium*, tal como *F. oxysporum* (Malardier et al., 1989). Los sistemas de producción adecuados desarrollados para las bacterias incluyen un sistema de producción desarrollado para *Bacillus*, por ejemplo, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens* o para *E. coli*, o para un actinomiceto como *Streptomyces*. Los sistemas de producción adecuados desarrollados para las levaduras son sistemas desarrollados para *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* o *Pichia pastoris*. También se pueden utilizar los sistemas de producción en otros microbios o en las células de mamíferos o en las plantas.

La expresión de la secuencia o secuencias génicas clonadas da lugar a la producción de la proteína deseada, o a la producción de un fragmento de esta proteína. Esta expresión puede llevarse a cabo de forma continua en las células transformadas, o de una manera controlada.

Para obtener las preparaciones enzimáticas de la invención, los hospedadores que tienen las propiedades deseadas (esto es, hospedadores capaces de expresar cantidades económicamente asequibles de proteínas de fusión de endoglucanasa) se cultivan en las condiciones adecuadas, y las enzimas deseadas se secretan preferentemente desde los hospedadores hacia el medio de cultivo, y opcionalmente se recuperan de dicho medio de cultivo mediante los métodos conocidos en la técnica. Preferentemente, el hospedador para tal producción es un hongo filamentoso, tal como *Trichoderma* o *Aspergillus*, y en especial *T. reesei*.

Tal y como se utiliza en el presente contexto, la «preparación enzimática» se refiere a cualquier producto enzimático que contiene al menos una proteína de fusión de endoglucanasa de la invención. Así pues, tal preparación enzimática puede ser un medio de cultivo agotado o filtrado. El medio de cultivo agotado se refiere al medio de cultivo del hospedador que comprende las enzimas producidas. Preferentemente, las células hospedadoras se separaron de dicho medio después de la producción. Si se desea, tales preparaciones se pueden liofilizar o si no, la actividad enzimática se puede concentrar y/o estabilizar para la conservación. Si se desea, una enzima deseada se puede purificar adicionalmente de acuerdo con los métodos convencionales, tales como extracción, precipitación, cromatografía, cromatografía de afinidad, electroforesis y similares.

Sin embargo, una ventaja de la invención es que el medio de cultivo con o sin células hospedadoras se puede utilizar como una preparación enzimática como tal, sin más purificación, porque las proteínas de fusión de endoglucanasa se pueden secretar al medio de cultivo, y presentan actividad en las condiciones del ambiente del medio de cultivo agotado. Las preparaciones enzimáticas se suministran y usan de forma rentable porque no es necesario aislar una enzima específica del medio de cultivo.

Además de la proteína de fusión de la endoglucanasa, las preparaciones enzimáticas pueden comprender una o más enzimas diferentes, que pueden ser, por ejemplo, otras celulasas, amilasas, lipasas, proteasas, hemicelulasas, xilanasas, pectinasas y/u oxidasas, tales como lacasas y peroxidasas. Alternativamente, antes, durante o después del tratamiento con la proteína de fusión de la endoglucanasa, se puede llevar a cabo otro tratamiento enzimático. El tratamiento enzimático puede comprender, por ejemplo, uno o más tratamientos con amilasa (por ejemplo, para desaprestar el dril), uno o más tratamientos con celulasa y/o uno o más tratamientos con peroxidasa y/o lacasa. Las otras enzimas a incluir en la preparación enzimática o en el tratamiento enzimático dependen de la aplicación.

Además de la proteína de fusión, la preparación enzimática puede contener aditivos, tales como estabilizadores, tampones, conservantes, tensioactivos y/o componentes de medios de cultivo. Los aditivos preferentes son tales, que se utilizan habitualmente en las preparaciones enzimáticas diseñadas para la aplicación, donde se usa la preparación enzimática.

Las preparaciones enzimáticas se pueden suministrar como un líquido o como un sólido, por ejemplo, como un polvo seco o un granulado, especialmente gránulos sin pulverizar, o un líquido estabilizado. Se ha concebido que las preparaciones enzimáticas se pueden enriquecer más, o se puede hacer total o parcialmente deficientes en actividades enzimáticas específicas, de manera que satisfagan los requisitos de una utilidad específica en diferentes aplicaciones, por ejemplo, en la industria textil. Puede resultar ventajosa una mezcla de actividades enzimáticas secretadas por un hospedador en una aplicación industrial determinada, por ejemplo en bioacabado o biodesgaste.

Las proteínas de fusión de la endoglucanasa y las preparaciones de las mismas son útiles, por ejemplo, en la industria textil, alimentaria, de aceites vegetales, de detergentes y de pasta de papel. Se pueden usar para tratar cualquier material celulósico, tal como material textil, plantas usadas para alimentos consumidos por los animales, material vegetal para extracción de aceite, o fibras secundarias o pasta química o mecánica obtenida de madera. También se pueden añadir en detergentes, que normalmente contienen auxiliares, tales como tensioactivos, surfactantes, blanqueadores o reforzantes de la detergencia. En el presente contexto, «material celulósico» se refiere a cualquier material que comprende como componente significativo celulosa o derivados de la misma. El material celulósico se pone en contacto con una cantidad eficaz de proteína de fusión en las condiciones adecuadas,

tal como pH y temperatura adecuados, y se deja que transcurra la reacción durante un tiempo suficiente para que se produzca la reacción enzimática.

Las enzimas de fusión son especialmente útiles para el tratamiento de los materiales textiles, tales como tejidos y prendas. El material textil puede estar fabricado con celulosa natural que contiene fibras o celulosa hecha por el hombre que contiene fibras, o mezclas de ambas, o una mezcla de fibras sintéticas y fibras que contienen celulosa. Preferentemente, el material que contiene celulosa es algodón, especialmente dril. Mediante «dril» se hace referencia, en conexión con esta invención, al tejido de dril, normalmente prendas de dril, en particular vaqueros. Ventajosamente, el dril es dril teñido de índigo. El dril también se puede tratar con derivados del índigo o con índigo junto a otros colorantes, por ejemplo, dril teñido con índigo con rorcual azul.

- 10 Las endoglucanasas de fusión son especialmente útiles para el biodesgaste y el bioacabado de los tejidos.

El lavado a la piedra tiene tres etapas: desapresto, desgaste y postratamiento. La primera etapa, el proceso de desapresto, suele ser el primer tratamiento húmedo de los vaqueros y se refiere a la retirada del almidón y de otros aprestos que se suelen aplicar a los hilos tejidos para impedir que se dañen durante la confección del tejido. Se utilizan las α -amilasas para retirar los agentes de apresto a base de almidón para mejorar el procesamiento húmedo, y que sea uniforme. Después de retirar el apresto, los vaqueros se suelen enjuagar con agua o pasan directamente a la etapa de desgaste.

- 20 La segunda etapa, el desgaste, se puede realizar con enzimas o con piedra pómez, o con ambos. En todos los casos de acción mecánica se necesita retirar el colorante, y el tratamiento se suele llevar a cabo en lavadoras, como lavadoras de tambor. El término «desgaste» se refiere a la apariencia del tejido dril, cuando se ha tratado con enzimas celulásicas o piedras, o con ambos. Expresiones sinónimas son «aspecto lavado a la piedra» o «aspecto ajado». Como resultado de la retirada desigual del colorante, existe contraste entre las zonas teñidas y las zonas en las que se ha eliminado el colorante.

- 25 El desgaste suele ir seguido de la tercera etapa, el postratamiento, que incluye etapas de lavado y enjuagado durante las cuales se pueden usar detergentes, abrillantadores ópticos, blanqueantes o suavizantes. Después del tratamiento enzimático hay que detener la reacción para evitar el deterioro de los materiales tratados, por ejemplo por inactivación por temperatura o por pH, comprendiendo el último un enjuagado exhaustivo y/o eliminación del detergente por lavado. Esto garantiza que la resistencia mecánica de la fibra no se ve comprometida más por la presencia continua de la enzima.

- 30 Tal y como se utiliza en el presente contexto, la expresión «biodesgaste» de tejidos o de prendas se refiere al uso de enzimas en lugar, o además de, piedra pómez para el tratamiento de los tejidos o prendas, en especial del dril.

- 35 Tal y como se expuso más arriba, el tratamiento con celulasas puede reemplazar completamente el tratamiento con piedra pómez (por ejemplo, 1 kg de enzima comercial frente a 100 kg de piedras). Sin embargo, el tratamiento con celulasas se puede combinar también con el tratamiento con piedra pómez cuando se desea producir un acabado muy desgastado. Mediante un lavado que combina una celulasa neutra con piedra pómez también se puede conseguir un efecto de piel de melocotón, en el que se crea un recubrimiento fino de parecido a la pelusa. Las proteínas de fusión descritas son especialmente útiles para proporcionar con eficacia un aspecto desgastado y para disminuir al mínimo la retrotinción en el biodesgaste.

- 40 El biodesgaste se realiza típicamente a un pH de 3,0 a 8,0, y preferentemente a pH de 5,0 a 7,0. La temperatura de la reacción oscila de 30 °C a 80 °C y está preferentemente entre 50 y 60 °C. La proporción de agua madre (la proporción del volumen de líquido por masa de tejido) puede oscilar de unos 3:1 a 20:1, preferentemente de 5:1 a 10:1. El tiempo de tratamiento puede oscilar entre 15 min y 90 min, y preferentemente de 30 min a 60 min. Hay que recalcar que la dosis de enzima depende en gran parte del tipo de tejidos, la maquinaria, las condiciones del procedimiento (pH, temperatura, proporción de agua madre, tiempo de tratamiento, carga de dril, escala del procedimiento) y el tipo de preparación enzimática y similares. Si se desea, la piedra pómez se puede usar en combinación con las proteínas de fusión de endoglucanasa. La dosis de enzima requerida será pues significativamente menor. Un experto en la técnica es capaz de definir la dosis y condiciones adecuadas.

- 45 Las proteínas de fusión de endoglucanasa de la presente invención proporcionan ventajas inesperadas en el sentido de que la actividad enzimática es alta y la retrotinción es baja, lo que produce un contraste muy bueno. Además, las proteínas de fusión se pueden fabricar fácilmente y se pueden usar en un margen relativamente amplio de temperaturas y pH.

Además, las proteínas de fusión de endoglucanasa son útiles para el bioacabado de tejidos y prendas. «Bioacabado» hace referencia al uso de enzimas en una hidrólisis controlada de las fibras celulósicas para modificar la superficie del tejido o del hilo de manera que se impida permanentemente la formación de pelotillas, se mejore el tacto del tejido como suavidad y tersura, se aclare la estructura superficial al reducir las pelusas, lo que da lugar a

que los colores sean más nítidos, se mejore la capacidad de drapeado del tejido, se mejore la absorción de la humedad, lo que podría mejorar también la capacidad de tinción.

La eliminación enzimática de la formación de pelotillas se puede llevar a cabo en cualquier momento durante el procesamiento húmedo del tejido, preferentemente después del desapeste y/o blanqueado opcionales, y se pueden utilizar condiciones similares a las del biodesgaste.

Las proteínas de fusión de endoglucanasa que poseen también actividad β -glucanasa, hemicelulasa o xilanasas son útiles adicionalmente para mejorar la calidad de los alimentos para consumo animal, gracias a las cuales el material vegetal se trata con las enzimas.

El almidón, las proteínas y los lípidos se pueden degradar fácilmente en el aparato digestivo de los animales monogástricos, tales como las aves de corral y los cerdos, mientras que la mayor parte de los polisacáridos que no son almidón (NSP por su nombre en inglés), que incluyen β -glucanos con varios tipos de enlaces de, por ejemplo, cebada y avena, permanecen intactos debido a que no hay tales actividades enzimáticas en los animales. Aún más, la capacidad de digestión de otros componentes, en particular de las grasas animales, se reduce en presencia de los NSP.

Las β -glucanasas se han utilizado comercialmente para aliviar los problemas ocasionados por los β -glucanos con varios tipos de enlaces de la cebada y de la avena. Las β -glucanasas se sabe que reducen la viscosidad intestinal ocasionada por los β -glucanos solubles, así como la liberación de los nutrientes encapsulados en las paredes celulares ricas en β -glucanos. El uso de las β -glucanasas mejora el funcionamiento animal, que se puede observar como una mayor proporción de conversión entre la ganancia de peso y la alimentación. De igual forma, la incidencia de los excrementos pegajosos en las aves de corral se reduce típicamente.

La granulación al vapor es la principal tecnología de procesamiento de los alimentos en todo el mundo. Sus ventajas sobre la producción de harinas alimenticias incluyen el manejo más fácil, la disminución de sustancias tóxicas y microorganismos, y la mejor eficacia alimentaria de todos. La termotolerancia y la elevada actividad de las proteínas de fusión descritas en la presente invención las hacen adecuadas para aplicaciones en alimentación.

La invención se ilustra mediante los ejemplos no limitantes siguientes. Sin embargo, se debe entender que las realizaciones dadas en la descripción más arriba y en los ejemplos tienen únicamente un propósito ilustrativo, y que se pueden realizar diferentes cambios y modificaciones dentro del alcance de la invención.

Ejemplo 1. Producción de la celulasa EG28 de *Thermoascus aurantiacus* ALKO4242 en *Trichoderma reesei*.

Los métodos estándares de biología molecular se utilizaron para el aislamiento y para los tratamientos enzimáticos del ADN (plásmidos, fragmentos del ADN), en las transformaciones de *E. coli*, etc. Los métodos básicos utilizados se describen en los manuales estándares de biología molecular, p. ej., Sambrook et al., (1989) y Sambrook y Russell (2001).

El gen *cel5A* de *Thermoascus aurantiacus* (SEQ ID n.º 1) que codifica la celulasa EG28 (SEQ ID n.º 2) se amplificó por PCR directamente del ADN genómico de *T. aurantiacus* ALKO4242 aislado por el método de Raeder y Broda (1985). Los cebadores directo (SEQ ID n.º 9) e inverso (SEQ ID n.º 10) se diseñaron sobre la base de la secuencia publicada de la endoglucanasa de *T. aurantiacus* (AF487830). El producto amplificado de 1,3 kb que contiene el gen exacto (desde el codón de INICIO al codón de PARADA) se clonó como un fragmento *SacII-PstI* en el vector pBluescript II KS+. Se secuenciaron dos clones independientes y se seleccionó un clon que denominó pALK1926. El número de depósito de la cepa de *E. coli* que contiene el pALK1926 en la colección de cultivos Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH es DSM 17326.

Se construyó un plásmido de expresión (pALK1930, figura 1) para la producción de la celulasa recombinante EG28/Cel5A de *T. aurantiacus* (SEQ ID n.º 2). El gen *cel5A*, que incluye su propia secuencia señal, se fusionó por PCR exactamente al promotor *cbh1* (*cel7A*) de *T. reesei*. El promotor *cbh1*, el terminador *cbh1* y el gen marcador *amdS* se incluyeron como se describe en Paloheimo et al. (2003). El casete de expresión linealizado (figura 1) se aisló del esqueleto del vector mediante la digestión con enzimas de restricción, se introdujo por transformación en *T. reesei* A96, y se seleccionaron los transformantes con acetamida como única fuente de nitrógeno. La cepa hospedadora carece de las cuatro celulasas endógenas principales: CBHI/Cel7A, CBHII/Cel6A, EGI/Cel7B y EGII/Cel5A. Se realizaron las transformaciones de acuerdo con Penttilä et al., (1987) con las modificaciones descritas en Karhunen et al., (1993). Los transformantes se purificaron en placas de selección mediante conidios únicos antes de esporularlos en PD.

La producción de la celulasa en los transformantes se analizó a partir de sobrenadantes de cultivo de cultivos en matraces (50 ml) en agitación. Los transformantes se hicieron crecer durante 7 días en un medio complejo inductor de celulosa (Joutsjoki et al., 1993) tamponado con KH_2PO_4 al 5% a pH 5,5. La actividad enzimática de la proteína

recombinante se midió a partir del sobrenadante de cultivo como la liberación de azúcares reductores desde la carboximetilcelulosa (CMC al 2%) a 50 °C en tampón de citrato a 50 mM, pH 4,8, esencialmente como describieron Bailey y Nevalainen, 1981; Haakana et al., 2004. La actividad frente al β -glucano de cebada (1%) también se determinó midiendo la liberación de azúcares reductores a 50 °C en tampón de acetato a 50 mM, pH 4,8, como se describe en Ståhlbrand et al. 1993. La producción de la proteína recombinante también se detectó en el sobrenadante de cultivo mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS. Los genotipos de los transformantes elegidos se analizaron mediante transferencia Southern con el casete de expresión como sonda.

El pH óptimo de la celulasa Ta EG28/Cel5A producida heterológicamente se determinó en el tampón universal de MacIlvaine dentro de un intervalo de pH de 4,0 a 8,0 con carboximetilcelulosa como sustrato. Tal y como se muestra en la figura 2A, el pH óptimo para la actividad de la celulasa EG28/Cel5A es de 6,0. La temperatura óptima para la actividad enzimática de la celulasa EG28/Cel5A se determinó que era de 75 °C (figura 2B).

El transformante elegido (RF6188) se cultivó en un biorreactor para obtener material para la aplicación de pruebas (véase el ejemplo 4).

Ejemplo 2. Producción de la proteína recombinante de fusión EG28+CtCBD de *Thermoascus aurantiacus* ALKO4242.

Para producir una proteína recombinante de fusión EG28+CtCBD de *Thermoascus aurantiacus* (SEQ ID n.º 4), el dominio de fijación a la celulosa (CBD) de la celulasa CBHI/Cel7A de *Chaetomium thermophilum* ALKO4265 se unió a la celulasa EG28/Cel5A. La construcción contiene el dominio catalítico de EG28 (aminoácidos 1 a 334 del polipéptido completo) unido a la región conectora y al CBD de CBHI/Cel7A CtCBD de *C. thermophilum* (SEQ ID n.º 15).

Se utilizaron métodos estándares de biología molecular como se describe en el ejemplo 1. Primero, se introdujo por PCR un sitio de restricción único *SnaBI* cerca del extremo carboxilo de la secuencia de EG28/Cel5A. Esto permite la fusión directa de cualquier ADN con extremos romos tras el aminoácido Y334 del polipéptido EG28/Cel5A. El conector y la región CBD del gen que codifica la CBHI/Cel7A de *C. thermophilum* (cel7A, SEQ ID n.º 7) se amplificó por PCR con los cebadores directo (SEQ ID n.º 11) e inverso (SEQ ID n.º 12) y el ADN genómico de *C. thermophilum* ALKO4265 como plantilla. El producto amplificado de 1,6 kb se ligó con el gen cel5A (detrás de Y334) para crear Ta cel5A_Ct cel7AconectorCBD (SEQ ID n.º 3). El plásmido resultante se denominó pALK1946. El número de depósito de la cepa de *E. coli* que contiene el pALK1946 en la colección de cultivos Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH es DSM 18159.

Se construyó un plásmido de expresión (pALK1948, figura 1) para la producción de la celulasa EG28+CtCBD tal y como se describe en el ejemplo 1. El casete de expresión linealizado de 8,9 kb (figura 1) se aisló del esqueleto del vector mediante la digestión con la enzima de restricción *NotI*, se introdujo por transformación en *T. reesei* A33 (a la cepa se le han eliminado los genes que codifican las cuatro celulasas principales CBHI/Cel7A, CBHI/Cel6A, EGI/Cel7B y EGII/Cel5A) y se seleccionaron los transformantes como se describe en el ejemplo 1. El pH y la temperatura óptimos de la proteína de fusión se determinó que eran los mismos que los de la proteína EG28 de tipo silvestre.

El transformante elegido (RF6377) se cultivó en un biorreactor para obtener material para los ensayos de aplicación (véanse los ejemplos 5 a 10).

Ejemplo 3. (Referencia) Producción de la proteína de fusión EG40+CtCBD de *Acremonium thermophilum* ALKO4245

Para la producción de la proteína recombinante de fusión EG40+CtCBD (SEQ ID n.º 6) de *Acremonium thermophilum* ALKO4245, el dominio de fijación a la celulosa de la celulasa EG40 se reemplaza con el de la CBHI/Cel7A de *Chaetomium thermophilum* ALKO4265. La construcción contiene el dominio catalítico de la celulasa EG40 (aminoácidos 1 a 234 del polipéptido completo) unido a la región del conector y al CBD de la CBHI/Cel7A de *C. thermophilum* (CtCBD, SEQ ID n.º 15).

Los métodos estándares de biología molecular se utilizan como se describe en el ejemplo 1. El gen cel45A de *Acremonium thermophilum* (SEQ ID n.º 8) se amplifica por PCR a partir del ADN genómico de *A. thermophilum* ALKO4245 con los cebadores (SEQ ID n.º 13) y (SEQ ID n.º 14). El fragmento de PCR de 1,1 kb se clona como un fragmento SacII-PstI en el vector pBluescript II KS+. Después de esto, se introduce por PCR un sitio de restricción único *NruI* cerca del extremo carboxilo de la secuencia de EG40. Esto permite la fusión directa de cualquier ADN con extremos romos tras el aminoácido S234 del polipéptido de EG40. El conector más la región CBD de la celulasa CBHI/Cel7A de *Chaetomium thermophilum* (cel7A) se amplifica por PCR como se describe en el ejemplo 2 y un fragmento de restricción de la misma se ligó con el gen cel45A (después de S234) para crear At cel45A_Ct cel7AconectorCBD (SEQ ID n.º 5). Se construye un plásmido de expresión para la producción de la celulasa

EG40+CtCBD y la proteína recombinante (SEQ ID n.º 6) se produce en *Trichoderma* como se describe en el ejemplo 1.

Ejemplo 4. Comportamiento de la celulasa EG28 en el acabado del dril a diferentes temperaturas

5 A la celulasa EG28 de *Thermoascus aurantiacus* producida en *Trichoderma* (cepa RF6188) como se describe en el ejemplo 1 se le analizó su capacidad para crear un aspecto desgastado similar al proporcionado por la piedra pómez en el biodesgaste del dril a diferentes temperaturas. Se utilizó como referencia una enzima eficaz de acabado del dril, una preparación comercial de celulasa ácida enriquecida en EGII producida en *Trichoderma* (patente de los EE.UU. n.º 5 874 293).

10 Como material de prueba se utilizaron tejanos fabricados con sarga de dril teñida con índigo después de desaprestar con la α -amilasa ECOSTONE® A200. Los tratamientos con celulasa se realizaron con un extractor de lavado FOM 71 CLS Wascator de Electrolux en las condiciones descritas en la tabla 1.

15 La actividad de la endoglucanasa (ECU) de las preparaciones enzimáticas utilizadas se midió como la liberación de azúcares reductores desde la hidroxietilcelulosa como se describió anteriormente (Bailey y Nevalainen, 1981). El concentrado enzimático enriquecido en EGII y la preparación de EG28 se dosificaron a 220 y unas 380 ECU/g de tejido, respectivamente. Las enzimas se ensayaron en su intervalo óptimo de pH, la preparación de EGII a pH 5 y la preparación de EG28 a pH 6. Después de escurrir, se inactivó la enzima (durante 10 minutos a 40 °C) al subir el pH por encima de 11 con hidróxido de sodio. Los tejanos se enjuagaron entonces tres veces con agua y se secaron en un tambor.

20 El nivel del efecto de biodesgaste/abrazión se evaluó midiendo el color como valores de reflectancia con un espectrofotómetro Minolta CM 2500 utilizando las coordenadas espaciales de color L*a*b* (iluminante D65/2°). El color del derecho y del revés del dril, y de los bolsillos, se midió después de desaprestar (a saber, antes del tratamiento con la celulasa) y después del tratamiento con la celulasa. Cada medición del derecho, del revés o de los bolsillos era la media de aproximadamente 40, 20 o 12 mediciones, respectivamente. Se utilizaron dos pares de tejanos en cada prueba y el resultado final era la media de los mismos. Los resultados se muestran en la tabla 2 y en la figura 3.

Tabla 1. Condiciones del ensayo/parámetros del procedimiento utilizados en los tratamientos con las celulasas

Parámetro del procedimiento	
Carga de dril	1,3 kg
Agua	19 litros
Control de pH (pH 5-5,3)	35 g de Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O + 22 g de ácido cítrico
Control de pH (pH 6,1-6,3)	35,5 g de Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O + 15 g de ácido cítrico
Tiempo	45 min
Temperatura	40, 50, 60 o 70 °C
Dosis de la celulasa	220 o unas 380 ECU/g de tejido

Tabla 2. Mediciones del color del dril tratado con celulasa EG28 a diferentes temperaturas

El tratamiento con la preparación enriquecida en EGII se utilizó como referencia. L* indica la luminosidad, -b* es la dirección del azul, +b* es la dirección del amarillo.

Preparación enzimática	ECU/g de tejido	Condiciones	Antes del tratamiento con la celulasa		Después del tratamiento con la celulasa		ΔL^*	Δb^*
			L*	b*	L*	b*		
Derecho:								
EG28	380	70 °C, pH 6,1-6,3	23,67	-16,07	32,63	-16,94	8,96	-0,87
EG28	370	60 °C, pH 6,1-6,3	23,67	-16,38	31,94	-17,09	8,27	-0,71
EG28	360	50 °C, pH 6,1-6,3	23,62	-16,24	31,91	-16,86	8,30	-0,63
EG28	380	40 °C, pH 6,1-6,3	23,75	-16,07	30,57	-17,32	6,82	-1,25
Enriquecida en EGII	220	60 °C, pH 5,2-5,3	23,45	-16,10	32,90	-17,29	9,46	-1,19
Revés:								
EG28	380	70 °C, pH 6,1-6,3	49,76	-6,95	49,60	-10,43	-0,16	-3,48
EG28	370	60 °C, pH 6,1-6,3	49,55	-6,87	50,78	-9,57	1,24	-2,71
EG28	380	50 °C, pH 6,1-6,3	49,92	-7,05	50,49	-9,83	0,57	-2,78
EG28	380	40 °C, pH 6,1-6,3	49,89	-6,93	49,73	-9,73	-0,16	-2,80
Enriquecida en EGII	220	60 °C, pH 5,2-5,3	49,75	-6,82	48,28	-12,26	-1,47	-5,45
Bolsillos:								
EG28	380	70 °C, pH 6,1-6,3	77,40	-8,14	68,53	-12,60	-8,86	-4,47
EG28	374	60 °C, pH 6,1-6,3	77,91	-7,71	70,29	-12,34	-7,62	-4,63
EG28	380	50 °C, pH 6,1-6,3	78,11	-7,62	70,63	-12,02	-7,49	-4,40
EG28	380	40 °C, pH 6,1-6,3	77,51	-7,60	70,47	-11,91	-7,04	-4,32
Enriquecida en EGII	220	60 °C, pH 5,2-5,3	77,46	-7,68	66,18	-14,17	-11,29	-6,49

5

Los resultados de la tabla 2 y de la figura 3 muestran que el mejor efecto de desgaste con la preparación de EG28 (cepa RF6188) se obtuvo en el intervalo de 50 a 70 °C. Con una dosis de 380 ECU/g de tejido de la preparación de

EG28 a 70° C, se obtuvo un nivel de desgaste similar (luminosidad L*) que con la dosis de 220 ECU/g de tejido de una preparación enriquecida en EGII a 60 °C. Sin embargo, el efecto de retrotinción (redeposición del colorante índigo) en el revés del dril y en los bolsillos era menor con la preparación de EG28 (luminosidad más elevada, menos azul) que con la preparación enriquecida en EGII. De igual forma, el contraste del derecho del dril parecía mejor.

Ejemplo 5. Comportamiento de la proteína de fusión EG28+CtCBD en comparación con la celulasa EG28 en el acabado del dril

La proteína recombinante de fusión EG28+CtCBD de *Thermoascus aurantiacus* producida en *Trichoderma* (cepa RF6377) como se describe en el ejemplo 2 se comparó con la preparación de EG28 de la cepa RF6188 en el biodesgaste del dril a pH 6, a 60 °C. El dril y el sistema de ensayo para biodesgaste fueron como en el ejemplo 4, salvo que la cantidad de dril se niveló a 1430 g con una pieza extra de dril diferente que no se incluyó en las mediciones. El efecto del tratamiento con la celulasa se evaluó como en el ejemplo 4.

Los resultados de la tabla 3 muestran que el efecto de biodesgaste que proporciona la preparación de EG28+CtCBD fue muy bueno a una dosis baja. Con la cepa RF6377 se obtuvo un nivel de desgaste similar (luminosidad L*) con una dosis 6,5 veces más baja que con RF6188. Que la celulasa EG28 lleve unida el dominio de fijación a la celulosa (CBD) no incrementó el efecto indeseable de retrotinción, pero incrementó enormemente el resultado deseado del lavado.

Tabla 3. Mediciones del color del dril tratado con las celulasas EG28 y EG28+CtCBD a 60 °C, pH 6.

L* indica la luminosidad, -b* es la dirección del azul, +b* es la dirección del amarillo.

Preparación de la enzima	ECU/g de tejido	Antes del tratamiento con la celulasa		Después del tratamiento con la celulasa		ΔL^*	Δb^*
		L*	b*	L*	b*		
Derecho:							
EG28	325	23,40	-16,02	31,01	-17,12	7,62	-1,10
EG28+CtCBD	50	23,81	-16,21	31,60	-16,92	7,80	-0,71
Revés:							
EG28	325	49,46	-6,83	50,03	-9,62	0,57	-2,79
EG28+CtCBD	50	49,36	-7,03	50,62	-9,61	1,27	-2,58
Bolsillos:							
EG28	325	76,11	-8,36	68,53	-12,46	-7,58	-4,10
EG28+CtCBD	50	76,02	-8,45	68,81	-12,39	-7,21	-3,94

Ejemplo 6. Comportamiento de la celulasa EG28+CtCBD en comparación con la celulasa EGII en relación con el acabado del dril

La proteína recombinante de fusión EG28+CtCBD de *Thermoascus aurantiacus* producida en *Trichoderma* (cepa RF6377) se comparó con la preparación comercial de la celulasa ácida enriquecida en EGII (patente de los EE.UU. n.º 5 874 293) con respecto al biodesgaste del dril.

El sistema de ensayo para el biodesgaste fue como en el ejemplo 4, excepto que se utilizaron piezas (perneras) de varios tipos de dril diferentes de Ukos Sport (Bélgica) y Vicunha (Brasil) (en total, 1,2 kg). Las condiciones de

tratamiento con EG28+CtCBD y EGII fueron como en la tabla 4. El efecto del tratamiento con la celulasa se evaluó como en el ejemplo 4.

Los resultados de los experimentos realizados con cuatro diferentes tejidos de dril se muestran en las tablas 4 y 5. Cuando se usaba una dosis enzimática por tejido de 500 ECU/g de la preparación de EG28+CtCBD se obtuvo un nivel de luminosidad similar al obtenido con una dosis de 1000 ECU/g de la preparación enriquecida en EGII. El comportamiento de la preparación de EG28+CtCBD requirió más o menos la mitad de la actividad en ECU de la de la celulasa enriquecida en EGII. De igual forma, el medio de cultivo de EG28+CtCBD producido por el hospedador recombinante es volumétricamente unas dos veces más eficaz para el biodesgaste que la EGII que produce el hospedador recombinante. Se observó una retrotinción considerablemente menor en el revés del dril cuando se utilizó la preparación de EG28+CtCBD. El comportamiento de la preparación de EG28+CtCBD a 50 °C fue mejor a pH 6 que a pH 5.

Tabla 4. Mediciones de color en el derecho del dril tratado con la celulasa EG28+CtCBD a pH 5 y 6. El tratamiento con la preparación enriquecida en EGII se utilizó para la comparación. L+ indica la luminosidad, -b* es la dirección del azul, +b* es la dirección del amarillo.

Preparación enzimática	Dril	ECU/g de tejido	Condiciones	Antes del tratamiento con la celulasa		Después del tratamiento con la celulasa		ΔL^*	Δb^*
				L*	b*	L*	b*		
Enriquecida en EGII	Atlanta, Ukos sport	1000	pH ajustado con ácido acético, 55 min, 50 °C, pH 5	19,96	-15,91	27,44	-18,49	7,48	-2,58
	Mathew, Ukos sport			18,28	-7,97	21,87	-11,71	3,59	-3,74
	Nostalgia, Ukos sport			19,12	-8,78	23,90	-13,50	4,78	-4,72
	Vicunha, Savana			17,24	-10,49	21,51	-14,93	4,27	-4,44
	Promedio			18,65	-10,79	23,68	-14,66	5,03	-3,87
EG28+CtCBD	Atlanta, Ukos sport	500	pH ajustado con ácido acético, 55 min, 50 °C, pH 5	19,79	-16,02	25,88	-18,44	6,09	-2,42
	Mathew, Ukos sport			18,07	-8,58	21,45	-11,80	3,38	-3,22
	Nostalgia, Ukos sport			19,05	-8,73	22,65	-12,69	3,60	-3,96
	Vicunha, Savana			17,38	-10,11	20,75	-14,18	3,37	-4,07
	Promedio			18,57	-10,86	22,68	-14,28	4,11	-3,42

Preparación enzimática	Dril	ECU/g de tejido	Condiciones	Antes del tratamiento con la celulasa		Después del tratamiento con la celulasa		ΔL^*	Δb^*
				L*	b*	L*	b*		
EG28+CtCBD	Atlanta, Ukos sport	500	pH ajustado con ácido acético, 55 min, 50 °C, pH 6	19,98	-16,18	27,35	-18,20	7,37	-2,02
	Mathew, Ukos sport			17,51	-8,84	21,40	-11,62	3,89	-2,78
	Nostalg, Ukos sport			18,58	-8,65	22,96	-12,75	4,38	-4,10
	Vicunha, Savana			17,50	-10,16	21,49	-14,06	3,99	-3,90
	Promedio			18,39	-10,96	23,30	-14,16	4,91	-3,20

Tabla 5. Mediciones de color en el revés del dril tratado con la celulasa EG28+CtCBD a pH 5 y 6. El tratamiento con la preparación enriquecida en EGII se utilizó para la comparación. L* indica la luminosidad, -b* es la dirección del azul.

Preparación enzimática	Dril	ECU/g de tejido	Condiciones	Antes del tratamiento con la celulasa		Después del tratamiento con la celulasa		ΔL^*	Δb^*
				L*	b*	L*	b*		
Enriquecida en EGII	Atlanta, Ukos sport	1000	pH ajustado con ácido acético, 55 min, 50 °C, pH 5	47,98	-7,25	40,18	-14,63	-7,80	-7,38
	Mathew, Ukos sport			38,41	-7,17	36,11	-10,93	-2,30	-3,76
	Nostalg, Ukos sport			46,70	-6,06	41,87	-11,73	-4,83	-5,67
	Vicunha, Savana			35,65	-9,24	33,48	-12,44	-2,17	-3,20
	Promedio			42,19	-7,43	37,91	-12,43	-4,28	-5,00
EG28+CtCBD	Atlanta, Ukos sport	500	pH ajustado con ácido acético, 55 min, 50 °C, pH 5	48,01	-7,29	41,82	-13,25	-6,19	-5,96
	Mathew, Ukos sport			37,60	-7,27	35,59	-10,50	-2,01	-3,23

Preparación enzimática	Dril	ECU/g de tejido	Condiciones	Antes del tratamiento con la celulasa		Después del tratamiento con la celulasa		ΔL^*	Δb^*
				L*	b*	L*	b*		
	Nostalg, Ukos sport			46,79	-5,99	44,75	-9,37	-2,04	-3,38
	Vicunha, Savana			35,08	-9,48	33,72	-11,80	-1,36	-2,32
	Promedio			41,87	-7,51	38,97	-11,23	-2,90	-3,72
EG28+CtCBD	Atlanta, Ukos sport	500	pH ajustado con ácido acético, 55 min, 50 °C, pH 6	47,55	-7,43	42,41	-13,30	-5,14	-5,87
	Mathew, Ukos sport			37,27	-7,87	36,01	-10,27	-1,26	-2,69
	Nostalg, Ukos sport			47,02	-6,01	44,61	-10,63	-2,41	-4,12
	Vicunha, Savana			38,84	-9,39	33,53	-11,20	-1,31	-1,81
	Promedio			41,67	-7,60	39,14	-11,23	-2,53	-3,62

Ejemplo 7. Efecto del pH sobre la actividad de la preparación de la celulasa EG28+CtCBD a 50 °C y 60 °C.

A la proteína recombinante de fusión EG28+CBD de *Thermoascus aurantiacus* producida en *Trichoderma* (cepa RF6377) se le evaluó su comportamiento en el biodesgaste del dril a diferentes valores de pH a 50 °C y 60 °C.

- 5 Como material de ensayo se utilizó la sarga del dril teñida con índigo (diferente a la de los ejemplos anteriores) que se desaprestó y se cortó en trozos. Los tratamientos con la celulasa se realizaron en un Launder Ometer LP-2 del modo siguiente. Unos 7,2 g de tejido de dril (tiras de unos 12 cm x 12 cm), 200 ml de tampón de fosfato y citrato de McIlvaine, y 90 bolas de acero (diámetro de 0,6 cm) se cargaron en contenedores de 1,2 litros. El Launder Ometer se hizo funcionar durante 120 min a diferentes valores de pH de 4 a 8 con temperaturas de 50 °C y 60 °C. Después de retirar las tiras de los contenedores, se enjuagaron con agua y se empaparon en agua con NaOH (pH > 11) durante 10 minutos con mezcla continua. Después de eso, las tiras se empaparon en agua con detergente líquido (OMO Color) y se mezclaron durante 10 minutos, y después se enjuagó cuidadosamente varias veces con agua caliente. Las tiras se secaron a temperatura ambiente. Se evaluó el efecto de biodesgaste midiendo el color como unidades de reflectancia como se describe en el ejemplo 4. Cada valor de medida del derecho de la tira de dril era el promedio de al menos 20 mediciones.

Los resultados mostrados en las tablas 6 y 7 y en las figuras 4 y 5 muestran que el intervalo más óptimo de pH para la celulasa EG28+CtCBD a 50 °C es de 5,5 a 6,5, y a 60 °C es 5 a 7.

Tabla 6. Mediciones de color sobre el derecho del dril tratado con la celulasa EG28+CtCBD a valores de pH diferentes en el lavado y blanqueo a 50 °C.

- 20 L* indica la luminosidad, -b* es la dirección del azul.

Preparación enzimática	ECU/g de tejido	Condiciones	Antes del tratamiento con la celulasa		Después del tratamiento con la celulasa		ΔL^*
			L*	b*	L*	b*	
Tampón de control	0	pH 6	17,28	-13,07	18,77	-14,13	1,49
Control del tampón	0	pH8	17,01	-13,4	18,18	-14,45	1,17
EG28+CtCBD	1000	pH 4	16,79	-13,59	20,86	-16,40	4,07
EG28+CtCBD	1000	pH 5	17,34	-13,18	21,59	-16,44	4,25
EG28+CtCBD	1000	pH 5,5	17,30	-13,25	22,06	-16,39	4,76
EG28+CtCBD	1000	pH 6	17,35	-13,42	22,29	-16,47	4,94
EG28+CtCBD	1000	pH 6,5	17,31	-13,41	22,48	-16,65	5,17
EG28+CtCBD	1000	pH 7	17,34	-13,25	21,55	-16,23	4,21
EG28+CtCBD	1000	pH 8	16,91	-13,25	19,92	-15,72	2,71

Tabla 7. Mediciones de color en el derecho del dril tratado con la celulasa EG28+CtCBD a diferentes valores de pH en el Launder a 60 °C.

La L* indica la luminosidad, -b* es la dirección del azul.

Preparación enzimática	ECU/g de tejido	Condiciones	Antes del tratamiento con la celulasa		Después del tratamiento con la celulasa		ΔL^*
			L*	b*	L*	b*	
EG28+CtCBD	1000	pH 4	17,19	-13,58	20,48	-15,77	3,29
EG28+CtCBD	1000	pH 5	17,10	-13,24	22,74	-16,59	5,64
EG28+CtCBD	1000	pH 5,5	17,10	-13,54	22,66	-16,61	5,56
EG28+CtCBD	1000	pH 6	17,10	-13,65	22,83	-16,74	5,73
EG28 + CtCBD	1000	pH 6,5	17,19	-13,47	22,65	-11,72	5,46
EG28+CtCBD	1000	pH 7	16,99	-13,72	22,10	-16,66	5,11
EG28+CtCBD	1000	pH 8	17,13	-13,68	19,35	-15,15	2,22
Control del tampón	0	pH 6	17,36	-13,6	18,95	-14,28	1,59

5

Ejemplo 8. Comportamiento de la preparación de la celulasa EG28+CtCBD sobre el acabado del dril a

diferentes temperaturas.

A la proteína recombinante de fusión EG28+CtCBD de *Thermoascus aurantiacus* producida en *Trichoderma* (cepa RF6377) como se describe en el ejemplo 1 se le analizó a temperaturas diferentes su capacidad para crear un aspecto desgastado similar al proporcionado por la piedra pómez en el biodesgaste del dril. Se utilizaron como

- 5 referencia las enzimas eficientes de acabado de dril, la preparación comercial de celulasa ácida enriquecida en EGII (patente de los EE.UU. n.º 5 874 293) y la preparación de celulasa neutra ECOSTONE® C1.

El sistema de ensayo para el biodesgaste fue como en el ejemplo 4, salvo que se utilizó sarga de dril diferente y un tiempo de lavado de 55 minutos. Se midió la actividad enzimática (unidad de endoglucanasa, ECU) de las preparaciones enzimáticas de EG28+CtCBD y enriquecidas en EGII como en el ejemplo 4. La actividad (unidad de

- 10 celulasa neutra, NCU) de la preparación de celulasa neutra ECOSTONE® C1 se midió como la liberación de azúcares reductores desde la carboximetilcelulosa de como se describió anteriormente (Bailey y Nevalainen, 1981; Haakana et al., 2004). Las preparaciones enriquecidas en EGII, de EG28+CtCBD o de ECOSTONE® C1 se dosificaron a 250 NCU/g, 500 ECU/g o 1000 ECU/g de tejido, respectivamente. El efecto del tratamiento con la celulasa se evaluó como en el ejemplo 4.

- 15 El comportamiento de EG28+CtCBD a temperaturas de 40 a 70 °C y pH 6 se muestra en la tabla 8 y en la figura 6. El intervalo de temperatura preferente para la enzima es de 50 a 70 °C. Se pueden utilizar temperaturas más bajas, como 40 °C, para obtener un efecto de desgaste con menos decoloración si se desea un aspecto más oscuro.

Los resultados también están en concordancia con los obtenidos en el ejemplo 6, en donde el comportamiento de EG28+CtCBD en el biodesgaste se observó que era unas dos veces más eficaz que la preparación comercial de celulasa ácida enriquecida en EGII. Las celulasas ácidas generalmente tienen una tendencia a la retrotinción. Las

- 20 celulasas neutras, como ECOSTONE® C1, normalmente ocasionan una baja retrotinción que, por lo tanto, da lugar a un buen contraste. Los resultados obtenidos aquí muestran que se obtuvo un efecto similar con la celulasa EG28+CtCBD como con las celulasas neutras (tabla 8).

Tabla 8. Mediciones de color del dril tratado con la celulasa EG28+CtCBD a diferentes temperaturas.

- 25 Se utilizaron como referencia el tratamiento con la preparación de celulasa ácida enriquecida en EGII y la preparación de celulasa neutra ECOSTONE® C1. L* indica la luminosidad, -b* es la dirección del azul, +b* es la dirección del amarillo.

Preparación enzimática	Actividad/g de tejido	Condiciones	Antes del tratamiento con la celulasa		Después del tratamiento con la celulasa		ΔL^*	Δb^*
			L*	b*	L*	b*		
Derecho:								
EG28+CBD	500 ECU/g	70 °C, pH 6,2	17,38	-13,49	27,42	-17,27	10,05	-3,78
EG28+CBD	500 ECU/g	60 °C, pH 6,2	16,76	-13,31	26,01	-17,49	9,25	-4,18
EG28+CBD	500 ECU/g	50 °C, pH 6,2	16,78	-13,40	25,00	-17,44	8,22	-4,04
EG28+CBD	500 ECU/g	40 °C, pH 6,2	16,76	-13,21	22,86	-17,25	6,11	- 4,04
Enriquecida en EGII	1000 ECU/g	60 °C, pH 5,1	17,24	-13,38	26,59	-17,64	9,35	-4,26
ECOSTONE C1	250 NCU/g	60 °C, pH 6,5	17,38	-13,53	26,91	-16,98	9,53	-3,45
Revés:								
EG28+CBD	500 ECU/g	70 °C, pH 6,2	45,67	-6,33	41,78	-13,83	-3,90	-7,51

Preparación enzimática	Actividad/g de tejido	Condiciones	Antes del tratamiento con la celulasa		Después del tratamiento con la celulasa		ΔL^*	Δb^*
			L*	b*	L*	b*		
EG28+CBD	500 ECU/g	60 °C, pH 6,2	45,60	-5,95	42,72	-13,05	-2,88	-7,10
EG28+CBD	500 ECU/g	50 °C, pH 6,2	45,67	-5,92	41,81	-13,35	-3,86	-7,44
EG28+CBD	500 ECU/g	40 °C, pH 6,2	45,80	-5,72	41,66	-12,52	-4,14	-6,81
Enriquecida en EGII	1000 ECU/g	60 °C, pH 5,1	46,10	-6,19	39,89	-15,24	-6,21	-9,06
ECOSTONE C1	250 NCU/g	60 °C, pH 6,5	45,63	-6,46	42,49	-12,76	-3,14	-6,31

Ejemplo 9. Comportamiento de las celulasas EG28 y EG28+CtCBD en el bioacabado (para evitar la formación de pelotillas)

Se evaluó el comportamiento de la celulasa EG28 de la cepa RF6188 y la preparación de EG28+CtCBD de la cepa RF6377 a la hora de evitar la formación de pelotillas en los géneros de punto de algodón. Los tratamientos con la celulasa se realizaron con un extractor de lavado Wascator FOM 71 CLS de Electrolux en las condiciones descritas en la tabla 9.

Como material de prueba con material de relleno se utilizaron piezas de dos clases de suéteres de cuello de tipo polo de baja calidad con una superficie con pelusa, hecha de tejido para jersey de algodón al 100% o acanalado de algodón al 95% y 5% de Lycra (elastano). Las muestras se prelavaron primero durante 10 minutos a 60 °C con 1 ml/l de tensioactivos/humectantes (Sandoclean PCJ de Sandos e Imacol CN de Clariant) y se enjuagaron tres veces con agua. Después de esto, las prendas de algodón se trataron con celulasa a 60 °C durante 60 minutos en presencia de los mismos auxiliares textiles que se utilizaron en el prelavado. La enzima se inactivó como se describe en el ejemplo 4, salvo que la temperatura era de 60 °C durante el enjuague alcalino. Las piezas del género de punto se enjuagaron tres veces y después se secaron en un tambor.

Tabla 9. Parámetros del procedimiento/condiciones del ensayo utilizados en los tratamientos de bioacabado.

Parámetro del procedimiento	
Carga del tejido	1,0 kg
Agua	15 litros
Sandoclean PCJ e Imacol CN	1 ml/l
Tampón/control del pH (pH 5-5,3)	unos 3 ml de ácido acético (80%)
Tiempo	60 min
Temperatura	60 °C
Dosis de la celulasa	1200 ECU/g de tejido

El efecto del tratamiento con la celulasa se evaluó visualmente a simple vista y con una lupa. Se utilizó como control una muestra del prelavado sin enzima.

Los resultados mostraron que la preparación de EG28+CtCBD mejoró la renuencia a la formación de pelotillas. La pelusa en la superficie del género de punto se redujo considerablemente después del tratamiento con la preparación de EG28+CtCBD en comparación con el control (tratamiento sin enzima). De igual forma, la preparación de EG28 sirvió para impedir la formación de pelotillas.

5 Ejemplo 10. Prueba de estabilidad durante la granulación de alimentos

Dos preparaciones de celulosa, EG28 (cepa RF6188) y EG28+CtCBD (cepa RF6377) se evaluaron por separado en un experimento que simula un procedimiento de producción industrial de alimentos. Antes de ensayar las preparaciones de EG28 y de EG28+CtCBD secadas por pulverización, se molieron con harina de trigo para mejorar la homogeneidad a nivel del alimento. Las enzimas EG28 o EG28+CtCBD mezcladas previamente con la harina se añadieron a una dosis de 200 g/t y a 500 g/t de alimento, respectivamente. Se utilizó la sobredosificación de la enzima para facilitar el análisis de las muestras granuladas a altas temperaturas, en donde la actividad podría haberse reducido sustancialmente.

El molino y el mezclador se utilizan para producir mezclas de harinas como parte de una planta de alimentos semiindustrial con una capacidad de granulación nominal de 5 t/h. El molino es un molino de martillo Champion equipado con una matriz de Ø 3,0 mm. El material bruto molido se mezcla en un mezclador horizontal de 2500 l a 27 rpm antes de transferirlo a la miniplanta moledora de alimentos. La planta comprende un mezclador horizontal (volumen de 700 l, velocidad de 48 rpm, lotes de mezcla de 300 kg), tornillo de dosificación Skjold TR y un mezclador en cascada Kahl (longitud de 130 cm, diámetro de 30 cm, velocidad de 155 rpm, equipado con 37 palas ajustables). El tiempo de permanencia para 300 kg/h es aproximadamente 30 s. En el costado del mezclador en cascada se halla montado un colector con un descargador de agua y 3 válvulas de vapor desde las que se lleva el vapor hacia la harina. El vapor lo proporciona un hervidor a alta presión con una capacidad máxima de 400 kg de vapor por hora. Las pruebas de realiza a una sobrepresión de 2 atmósferas y el vapor se conduce mediante una válvula de reducción de presión, que controla la adición de vapor al mezclador en cascada. Las tres válvulas del colector se utilizan para el ajuste fino de la temperatura deseada de la harina. La temperatura de la harina se mide con un termómetro digital colocado en la salida del mezclador en cascada, justo antes de que la harina entre en la matriz de granulación. La prensa de granulación es un Simon Heesen, de tipo labor (monorrodillo) con una matriz de Ø 3 mm * 35 mm y un motor de 7,5 kW. Diámetro interior de la matriz: 173 mm, altura del rodillo de la prensa: 50 mm, diámetro del rodillo de la prensa: 140 mm, velocidad de funcionamiento: 500 rpm, y capacidad nominal: 300 kg/h. Las muestras se toman después de la prensa de granulación y se enfriaron en una caja de enfriamiento compartimentada con el fondo perforado, ventilador: 1500 m³ aire/h.

Se fabricó un lote de 300 kg de alimentos molidos con base de trigo. Se fabricó una mezcla previa de 10 kg de esta harina y 200 g (o 500 g) de la enzima de prueba en un mezclador reglamentario de 70 litros. Velocidad del mezclador: 45 rpm. Tiempo de mezcla: 10 min. Esta mezcla previa se añadió con 290 kg del alimento en el mezclador horizontal en la miniplanta de molido de alimentos y se mezcló durante 10 minutos. Después de la toma de muestras del molido, se granuló el alimento a través de una prensa de granulación (matriz de Ø 3 mm). La harina se calentó a la temperatura deseada (65 a 90 °C) mediante el ajuste de la adición de vapor al mezclador en cascada. Para cada temperatura se tomó la primera muestra 10 minutos después de alcanzar la temperatura de granulación deseada (que se midió en la harina antes de la granulación). Se tomaron muestras durante 1,0 min que correspondían a 5,0 kg de alimento sedimentado. Se tomó la muestra como submuestras de aproximadamente 500 g y se colocaron en una caja de enfriamiento durante 10-15 s después de que los gránulos hubieran salido de la prensa de granulación. Todas las muestras se airearon y se enfriaron a temperatura ambiente durante 15 minutos. Las muestras se submuestrearon homogéneamente en un divisor de muestras desarenador y se llenaron en bolsas de plástico.

Las muestras se analizaron del siguiente modo: 2,5 g de muestra bien molida y 20 ml de tampón de acetato (0,05 M, pH 5,0) se agitaron durante 30 min a temperatura ambiente, se centrifugaron (10 min, 4000 rpm) y se diluyeron. Se equilibró 1,0 ml de muestra límpida por triplicado durante 5 minutos en un baño María a 40 °C. La reacción se inició añadiendo un comprimido de β-Glucayme (Megazyme, Irlanda) sin agitación. Después de exactamente 30 minutos, se detuvo la reacción con la adición de 5,0 ml de Trizma base al 1% (p/v) (Sigma-Aldrich) con una agitación vigorosa en un mezclador vorticial. El tubo se dejó a temperatura ambiente durante unos 5 minutos; la suspensión viscosa se agitó de nuevo y se filtró a través de papel de filtro Whatman 1. Se midió la absorbancia del filtrado a 590 nm. Los resultados se analizaron con una curva estándar.

La recuperación de la actividad enzimática antes y después de la granulación se presenta en la tabla 10. La influencia de temperatura de granulación sobre la recuperación de la actividad de la β-glucanasa también se ha presentado también en las figuras 7 y 8. Las celulasas EG28 y EG28+CtCBD eran estables incluso a 80 °C. La celulasa EG28+CtCBD tendía a ser más estable que EG28 a la temperatura de granulación de 90 °C.

Tabla 10. Recuperación de la actividad enzimática antes (harina del mezclador horizontal) y después de la

granulación a temperaturas que oscilan de 65 a 90 °C.

Temperatura de granulación	Actividad β -glucanasa (FBU/kg de alimento)	
	(EG28)	(EG28+CtCBD)
Harina del mezclador horizontal	239 000 $\pm$ 9 000 (100%)	1 148 000 $\pm$ 48 000 (100%)
Gránulo (65 °C)	227 000 $\pm$ 16 000 (95%)	1 007 000 $\pm$ 67 000 (88%)
Gránulo (70 °C)	217 000 $\pm$ 5 000 (91%)	1 012 000 $\pm$ 54 000 (88%)
Gránulo (75 °C)	227 000 $\pm$ 14 000 (95%)	993 000 $\pm$ 49 000 (86%)
Gránulo (80°C)	215 000 $\pm$ 6 000 (90%)	1 030 000 $\pm$ 87 000 (90%)
Gránulo (85°C)	188 000 $\pm$ 7000 (79%)	904 000 $\pm$ 56 000 (79%)
Gránulo (90°C)	149 000 $\pm$ 8 200 (62%)	861 000 $\pm$ 32 000 (75%)

Lista de organismos depositados

Cepa	Plásmido contenido	Autoridad del depósito	Fecha del depósito	Número de depósito
<i>Acremonium thermophilum</i> ALKO4245	-	CBS ⁽¹⁾	20 de septiembre de 2004	CBS 116240
<i>Thermoascus aurantiacus</i> ALKO4242	-	CBS ⁽¹⁾	20 de septiembre de 2004	CBS 116239
<i>Chaetomium thermophilum</i> ALKO4265	—	CBS ⁽²⁾	8 de noviembre de 1995	CBS 730.95
<i>Escherichia coli</i>	pALK1946	DSMZ ⁽³⁾	7 de abril de 2006	DSM 18159
<i>Escherichia coli</i>	pALK1926	DSMZ	13 de mayo de 2005	DSM 17326

- 5 (1) Centralbureau Voor Schimmelcultures en Uppsalalaan, 8, 3584 CT, Utrech, Países Bajos.
- (2) Centralbureau Voor Schimmelcultures en Oosterstraat 1, 3742 SK BAARN, Países Bajos.
- (3) Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Mascheroder Weg 1 b, D-38124 Braunschweig, Alemania.

Referencias

- 10 Altschul SF, W Gish, W Miller, EW Myers y DJ Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403-410.
- Bailey MJ y KMH Nevalainen 1981. Induction, isolation and testing of stable *Trichoderma reesei* mutants with improved production of solubilizing cellulase. *Enz Microbiol Technol.* 3: 153-157.
- 15 Bendtsen J. D., Nielsen H., von Heijne G. y Brunak S. (2004) Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J. Mol. Biol.* 340: 783-795.

- Gasteiger, E, A Gattiker, C Hoogland, I Ivanyi, RD Appel y A Bairoch. 2003. ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res.* 31: 3784-3788.
- Haakana H, A Miettinen-Oinonen, V Joutsjoki, A Mäntylä, P Suominen, y J Vehmaanperä. 2004. Cloning of cellulase genes from *Melanocarpus albomyces* and their efficient expression in *Trichoderma reesei*. *Enz Microbiol Technol.* 34: 159-167.
- Henrissat B. (1991) A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* 280: 309-316.
- Henrissat B. y Bairoch A. (1993) New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* 293: 781-788.
- 10 Henrissat B. y Bairoch A. (1996).Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. *Biochem. J.* 316: 695-696.
- Hong J., H. Tamaki, K. Yamamoto, y H. Kumagai. 2003. Cloning of a gene encoding a thermo-stabile endo- β -1,4-glucanase from *Thermoascus aurantiacus* and its expression in yeast. *Biotech. Letters* 25:657-661.
- IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) (1987). Measurement of cellulase activities. *Pure and Appl. Chem.* 59:257-268.
- 15 Joutsjoki, VV, TK Torkkeli y KMH Nevalainen. 1993. Transformation of *Trichoderma reesei* with the *Hormoconis resiniae* glucoamylase P (*gamP*) gene: production of a heterologous glucoamylase by *Trichoderma reesei*. *Curr. Genet.* 24:223-228.
- Karhunen T, A Mäntylä, KMH Nevalainen y PL Suominen. 1993. High frequency one-step gene replacement in *Trichoderma reesei*. I. Endoglucanase I overproduction. *Mol. Gen. Genet.* 241:515-522.
- 20 Malardier L, Daboussi MJ , Julien J, Roussel F, Scazzocchio C y Brygoo Y. 1989. Cloning of the nitrate reductase gene (*niaD*) of *Aspergillus nidulans* and its use for transformation of *Fusarium oxysporum*. *Gene* 15:147-156.
- Needleman S. y Wunsch C. (1970) A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. *Journal of Molecular Biology* 48, 443-453.
- 25 Nielsen H., Engelbrecht J., Brunak S. y von Heijne G. (1997) Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Engineering* 10: 1-6.
- Paloheimo M, A Mäntylä, J Kallio, y P Suominen. 2003. High-yield production of a bacterial xylanase in the filamentous fungus *Trichoderma reesei* requires a carrier polypeptide with an intact domain structure. *Appl. Env. Microbiol.* 69:7073-7082.
- 30 Penttilä M, H Nevalainen, M Rättö, E Salminen y J Knowles. 1987. A versatile transformation system for the cellulolytic filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Gene* 61:155-164.
- Raeder U y P Broda. 1985. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Lett. Appl. Microbiol.* 1:17-20.
- Rice P, Longden I y Bleasby A. (2000). EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite. *Trends in Genetics* 16:276-277.
- 35 Sambrook J, EF Fritsch y T Maniatis. 1989. Molecular cloning, a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, Estados Unidos.
- Sambrook J y DW Russell. 2001. Molecular cloning, a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, Estados Unidos.
- Srisodsuk M, Reinikainen T, Penttiä M y Teeri T. (1993) Role of the interdomain linker peptide of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase I in its interaction with crystalline cellulose. *J. Biol. Chem.* Oct 5;268(28): 20756-61.
- 40 Stålbrand H, Siika-aho M, Tenkanen M y L Viikari. 1993. *J. Biotechnol.* 29: 229-242.
- Ward M, Shan W, Dauberman J, Weiss G, Larenas E, Bower B, Rey M, Clarkson K y Bott R. (1993) Cloning, sequence and preliminary structural analysis of a small, high pl endoglucanase (EGIII) from *Trichoderma reesei*. Proceedings of the second TRICEL symposium on *TRICHODERMA REESEI* CELLULASES AND OTHER HYDROLASES, Espoo, Finland, 1993, ed. por P. Suominen y T. Reinikainen. *Foundation for Biotechnical and Industrial Fermentation Research* 8 (1993): 153-158.
- 45

LISTA DE SECUENCIAS

<110> AB Enzymes Oy

<120> Proteínas de fusión de enzimas y uso de las mismas

<130> 2060570

5

<160> 15

<170> PatentIn versión 3.2

<210> 1

10 <211> 1317

<212> DNA

<213> Thermoascus aurantiacus

<220>

15 <221> gen

<222> (1)..(1317)

<220>

<221> Intrón

20 <222> (107)..(161)

<220>

<221> Intrón

<222> (221)..(280)

25

<220>

<221> Intrón

<222> (434)..(492)

30 <220>

<221> Intrón

<222> (558)..(631)

<220>

35 <221> Intrón

<222> (730)..(790)

<400> 1

atgaagctcg	gctctctcgt	gctcgtcttc	agcgcagcta	ggcttacact	gtcggcccct	60
ctcgcagaca	ggaagcagga	gaccaagcgt	gcgaaagtat	tccaatgttc	gtaacatcca	120
cgtctggctt	gctggcttac	tggcaactga	caatggcgaa	gggttcgggt	caaacgagtc	180
cgggtgctgaa	ttcgggaagcc	agaaccttcc	aggagtcgag	gtcagcatgc	ctgtactctc	240
tgcattatat	taatatctca	agaggcttac	tctttcgcag	ggaaaggatt	atatatggcc	300
tgatcccaac	accattgaca	cattgatcag	caaggggatg	aacatctttc	gtgtcccctt	360
tatgatggag	agattgggtc	ccaactcaat	gaccggctct	ccggatccga	actacctggc	420
agatctcata	gcggtacatt	tcaattccac	catgtttgga	gctgtcttcg	ttgtgctgac	480
atttaatggt	agactgtaaa	tgcaatcacc	cagaaagggt	cctacgccgt	cgtcgatcct	540
cataactacg	gcagatagtg	aggtccccgg	ttctgggtatt	gctgctgtat	atctaagtag	600
atatgtgttt	ctaacatttc	cacgatttca	gctacaattc	tataatctcg	agcccttccg	660
atttccagac	cttctggaaa	acggctgcct	cacagtttgc	ttcgaatcca	ctgggtcatct	720
tcgacactag	taagctgaac	acccgaaatt	aactgagtct	gagcatgtct	gacaagacga	780
tccatgaaag	ataacgaata	ccacgatatg	gaccagacct	tagtcctcaa	tctcaaccag	840
gccgctatcg	acggcatccg	ttccgccgga	gccacttccc	agtacatctt	tgctcgagggc	900
aattcgtgga	ccggggcatg	gacctggacg	aacgtgaacg	ataacatgaa	aagcctgacc	960
gacctatctg	acaagatcat	atacgagatg	caccagtacc	tggactctga	cggatccggg	1020
acatcagcga	cctgcgtatc	ttcgaccatc	ggtcaagagc	gaatcaccag	cgcaacgcaa	1080
tggctcaggg	ccaacgggaa	gaagggcatc	atcggcgagt	ttgcgggagg	agccaacgac	1140
gtctgcgaga	cggccatcac	gggcatgctg	gactacatgg	cccagaacac	ggacgtctgg	1200
actggcgcca	tctggtgggc	ggccggggccg	tggtggggag	actacatatt	ctccatggag	1260
ccggacaatg	gcctcgcgta	tcagcagata	cttcctatct	tgactccgta	tctttga	1317

5

<210> 2

<211> 335

<212> PRT

10 <213> *Thermoascus aurantiacus*

<400> 2

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

Gln Ala Ala Ile Asp Gly Ile Arg Ser Ala Gly Ala Thr Ser Gln Tyr
180 185 190

Ile Phe Val Glu Gly Asn Ser Trp Thr Gly Ala Trp Thr Trp Thr Asn
195 200 205

Val Asn Asp Asn Met Lys Ser Leu Thr Asp Pro Ser Asp Lys Ile Ile
210 215 220

Tyr Glu Met His Gln Tyr Leu Asp Ser Asp Gly Ser Gly Thr Ser Ala
225 230 235 240

Thr Cys Val Ser Ser Thr Ile Gly Gln Glu Arg Ile Thr Ser Ala Thr
245 250 255

Gln Trp Leu Arg Ala Asn Gly Lys Lys Gly Ile Ile Gly Glu Phe Ala
260 265 270

Gly Gly Ala Asn Asp Val Cys Glu Thr Ala Ile Thr Gly Met Leu Asp
275 280 285

Tyr Met Ala Gln Asn Thr Asp Val Trp Thr Gly Ala Ile Trp Trp Ala
290 295 300

Ala Gly Pro Trp Trp Gly Asp Tyr Ile Phe Ser Met Glu Pro Asp Asn
305 310 315 320

Gly Ile Ala Tyr Gln Gln Ile Leu Pro Ile Leu Thr Pro Tyr Leu
325 330 335

<210> 3

<211> 1621

<212> DNA

5 <213> Thermoascus aurantiacus

<220>

<221> gen

<222> (1)..(1621)

10

<220>

<221> Intrón

<222> (107)..(161)

<220>

<221> Intrón

<222> (221)..(280)

5

<220>

<221> Intrón

<222> (434)..(492)

10 <220>

<221> Intrón

<222> (558)..(631)

<220>

15 <221> Intrón

<222> (730)..(790)

<220>

<221> Intrón

20 <222> (1549)..(1612)

<400> 3

```

atgaagctcg gctctctcgt gctcgcctctc agcgcagcta ggcttacact gtcggccctt    60
ctcgcagaca ggaagcagga gaccaagcgt gcgaaagtat tccaatgttc gtaacatcca    120
cgtctggcctt gctggcttac tggcaactga caatggcgaa gggttcggtt caaacgagtc    180
cgggtgctgaa ttcggaagcc agaacccttc aggagtcgag gtcagcatgc ctgtactctc    240
tgattatat taatatctca agaggcttac tctttcgcag ggaaaggatt atatatggcc    300
tgatcccaac accattgaca cattgatcag caaggggatg aacatctttc gtgtccctt    360
tatgatggag agattgggtc ccaactcaat gaccggctct ccggatccga actacctggc    420
agatctcata gcggtacatt tcaattccac catgtttgga gctgtcttcg ttgtgctgac    480
atttaatggt agactgtaaa tgcaatcacc cagaaagggt cctacgccgt cgctgatcct    540
cataactacg gcagatagtg aggtccccgg ttctgggtatt gctgctgtat atctaagtag    600
atatgtgttt ctaacatttc cacgatttca gctacaattc tataatctcg agcccttccg    660
atttccagac cttctggaaa acggtcgcct cacagtttgc ttcgaatcca ctggctcatct    720
tcgacactag taagctgaac acccgaaatt aactgagtct gagcatgtct gacaagacga    780
tccatgaaag ataacgaata ccacgatatg gaccagacct tagtcctcaa tctcaaccag    840
gccgctatcg acggcatccg ttccgccgga gccacttccc agtacatctt tgtcgagggc    900
aattcgtgga ccggggcatg gacctggacg aacgtgaacg ataacatgaa aagcctgacc    960
gaccatctg acaagatcat atacgagatg caccagtacc tggactctga cggatccggg    1020
acatcagcga cctgcgtatc ttcgaccatc ggtcaagagc gaatcaccag cgcaacgcaa    1080
tggctcaggg ccaacgggaa gaagggcata atcggcgagt ttgcgggcgg agccaacgac    1140
gtctgcgaga cggccatcac gggcatgctg gactacatgg ccagaacac ggacgtctgg    1200
actggcgcca tctggtgggc ggccgggccc tgggtggggag actacatatt ctccatggag    1260
ccggacaatg gcatcgcgta tcagcagata cttcctatct tgactccgta cgtacctggc    1320
cttgacggca gcaaccccg caaccgacc accaccgtcg ttcctcccgc ttctacctcc    1380
acctcccgtc cgaccagcag cactagctct cccgtttcga ccccgactgg ccagcccggc    1440
ggctgcacca ccagaagtg gggccagtgc ggcgggtatcg gctacaccgg ctgcactaac    1500
tgcgttgctg gcaccacct cactcagctc aaccctgggt acagccaggt atgtttctct    1560
tcccccttct agactcgctt ggatttgaca gttgctaaca tctgctcaac agtgcctgta    1620
a                                                                    1621

```

<210> 4

<211> 415

5 <212> PRT

<213> Thermoascus aurantiacus

<400> 4

Met Lys Leu Gly Ser Leu Val Leu Ala Leu Ser Ala Ala Arg Leu Thr
1 5 10 15

Leu Ser Ala Pro Leu Ala Asp Arg Lys Gln Glu Thr Lys Arg Ala Lys
20 25 30

Val Phe Gln Trp Phe Gly Ser Asn Glu Ser Gly Ala Glu Phe Gly Ser
35 40 45

Gln Asn Leu Pro Gly Val Glu Gly Lys Asp Tyr Ile Trp Pro Asp Pro
50 55 60

Asn Thr Ile Asp Thr Leu Ile Ser Lys Gly Met Asn Ile Phe Arg Val
65 70 75 80

Pro Phe Met Met Glu Arg Leu Val Pro Asn Ser Met Thr Gly Ser Pro
85 90 95

Asp Pro Asn Tyr Leu Ala Asp Leu Ile Ala Thr Val Asn Ala Ile Thr
100 105 110

Gln Lys Gly Ala Tyr Ala Val Val Asp Pro His Asn Tyr Gly Arg Tyr
115 120 125

Tyr Asn Ser Ile Ile Ser Ser Pro Ser Asp Phe Gln Thr Phe Trp Lys
130 135 140

Thr Val Ala Ser Gln Phe Ala Ser Asn Pro Leu Val Ile Phe Asp Thr
145 150 155 160

Asn Asn Glu Tyr His Asp Met Asp Gln Thr Leu Val Leu Asn Leu Asn
165 170 175

Gln Ala Ala Ile Asp Gly Ile Arg Ser Ala Gly Ala Thr Ser Gln Tyr
180 185 190

Ile Phe Val Glu Gly Asn Ser Trp Thr Gly Ala Trp Thr Trp Thr Asn
195 200 205

Val Asn Asp Asn Met Lys Ser Leu Thr Asp Pro Ser Asp Lys Ile Ile
210 215 220

Tyr Glu Met His Gln Tyr Leu Asp Ser Asp Gly Ser Gly Thr Ser Ala
225 230 235 240

Thr Cys Val Ser Ser Thr Ile Gly Gln Glu Arg Ile Thr Ser Ala Thr
245 250 255

Gln Trp Leu Arg Ala Asn Gly Lys Lys Gly Ile Ile Gly Glu Phe Ala
260 265 270

Gly Gly Ala Asn Asp Val Cys Glu Thr Ala Ile Thr Gly Met Leu Asp
275 280 285

Tyr Met Ala Gln Asn Thr Asp Val Trp Thr Gly Ala Ile Trp Trp Ala
290 295 300

Ala Gly Pro Trp Trp Gly Asp Tyr Ile Phe Ser Met Glu Pro Asp Asn
305 310 315 320

Gly Ile Ala Tyr Gln Gln Ile Leu Pro Ile Leu Thr Pro Tyr Val Pro
325 330 335

Gly Leu Asp Gly Ser Asn Pro Gly Asn Pro Thr Thr Thr Val Val Pro
340 345 350

Pro Ala Ser Thr Ser Thr Ser Arg Pro Thr Ser Ser Thr Ser Ser Pro
355 360 365

Val Ser Thr Pro Thr Gly Gln Pro Gly Gly Cys Thr Thr Gln Lys Trp
370 375 380

Gly Gln Cys Gly Gly Ile Gly Tyr Thr Gly Cys Thr Asn Cys Val Ala
385 390 395 400

Gly Thr Thr Cys Thr Gln Leu Asn Pro Trp Tyr Ser Gln Cys Leu
405 410 415

<210> 5

5 <211> 1211

<212> DNA

<213> Acremonium thermophilum

<220>

10 <221> gen

<222> (13)..(1206)

<220>

<221> Intrón

15 <222> (96)..(154)

<220>

<221> Intrón

<222> (404)..(526)

5 <220>

<221> Intrón

<222> (1134)..(1197)

<400> 5

ggactg	cgca	tc	atg	cgctc	ctc	acccttt	ctcc	gcgcag	ctct	ggctgc	cgct	ctgcct	60	
ctgag	cgccc	atg	ccctcga	cgg	aaagtcg	acg	aggtatg	cca	atcctcg	tac	ctctgcc	120		
ctctg	tagaa	aca	agt	gacc	gact	gcaaag	acag	atactg	ggact	gctgc	aag	ccgtcct	180	
g	cg	gct	gggc	cgg	aaaggcc	t	cggt	gaacc	agccc	gtctt	ctc	gtgctcg	240	
agc	gcatcag	cg	actt	caac	gcg	aagtcgg	gct	gcgacgg	agg	ctccgcc	tact	ctgtgcg	300	
ccg	accagac	g	ccct	ggggcg	gt	caacgaca	act	tctcgta	cg	gcttcgca	gcc	acggcca	360	
tcg	ccggcg	gt	ccgagtc	ag	ctgg	tgt	gcg	cctgcta	tgc	gtgagtt	ct	ctgcaagc	420	
cg	ttccac	cccc	gctttc	tgt	gcaggcc	g	ctt	cccccc	t	accaccca	ct	ccccccc	480	
ccc	gcctctg	t	gatc	gggca	tcc	gagctaa	gtt	gcgtgtc	gtc	cagactc	ac	ttcaact	540	
c	gggccccgt	c	gcggg	caag	acc	atgggtg	tgc	agtcgac	cag	caccggc	gg	cga	600	
gc	agcaacca	gtt	cga	cctc	gcc	atccccg	gc	ggcg	ggcgt	ggg	catcttc	aac	ggctgcg	660
c	ctcccagtt	c	ggcg	gcctc	ccc	ggcgccc	agt	acggcg	cat	cagcgac	c	gcagccagt	720	
g	ctcgtcctt	cccc	gcgccg	ct	cagccgg	g	ctg	ccagtg	gc	gcttcgac	t	ggttccaga	780	
a	cgcgcgacaa	cccc	accttc	cagc	gc	gtgcagtg	ccc	gtccgag	ct	cacgtccc	840			
gc	acgggctg	ta	agcgcgac	gac	gacgcca	g	ctatcccgt	ctt	caaccg	c	tagcgctc	900		
ct	ggccttga	c	ggcagcaac	ccc	ggcaacc	c	gaccaccac	c	gtcgttcct	ccc	gcttcta	960		
c	ctccacctc	c	gtccgacc	ag	cagcacta	g	ctctcccgt	t	tcgacccg	a	ctggccagc	1020		
c	ggcg	gctg	caccacccag	a	agtggggcc	a	gtgcggcg	t	atcggtac	a	ccggctgca	1080		
c	taactgcgt	t	gctggcacc	a	ctgcactc	a	gctcaacc	c	ctgg	tacagc	c	aggtatgtt	1140	
t	ctcttcccc	ctt	ctagact	c	gcttggatt	t	gacagttgc	t	aacatctgc	t	caacagtgc	1200		
ct	gtaactgc	a											1211	

<210> 6

<211> 315

15 <212> PRT

<213> Acremonium thermophilum

<400> 6

Met Arg Ser Ser Pro Phe Leu Arg Ala Ala Leu Ala Ala Ala Leu Pro
1 5 10 15
Leu Ser Ala His Ala Leu Asp Gly Lys Ser Thr Arg Tyr Trp Asp Cys
20 25 30
Cys Lys Pro Ser Cys Gly Trp Ala Gly Lys Ala Ser Val Asn Gln Pro
35 40 45
Val Phe Ser Cys Ser Ala Asp Trp Gln Arg Ile Ser Asp Phe Asn Ala
50 55 60
Lys Ser Gly Cys Asp Gly Gly Ser Ala Tyr Ser Cys Ala Asp Gln Thr
65 70 75 80
Pro Trp Ala Val Asn Asp Asn Phe Ser Tyr Gly Phe Ala Ala Thr Ala
85 90 95
Ile Ala Gly Gly Ser Glu Ser Ser Trp Cys Cys Ala Cys Tyr Ala Leu
100 105 110

Thr Phe Asn Ser Gly Pro Val Ala Gly Lys Thr Met Val Val Gln Ser
115 120 125

Thr Ser Thr Gly Gly Asp Leu Gly Ser Asn Gln Phe Asp Leu Ala Ile
130 135 140

Pro Gly Gly Gly Val Gly Ile Phe Asn Gly Cys Ala Ser Gln Phe Gly
145 150 155 160

Gly Leu Pro Gly Ala Gln Tyr Gly Gly Ile Ser Asp Arg Ser Gln Cys
165 170 175

Ser Ser Phe Pro Ala Pro Leu Gln Pro Gly Cys Gln Trp Arg Phe Asp
180 185 190

Trp Phe Gln Asn Ala Asp Asn Pro Thr Phe Thr Phe Gln Arg Val Gln
195 200 205

Cys Pro Ser Glu Leu Thr Ser Arg Thr Gly Cys Lys Arg Asp Asp Asp
210 215 220

Ala Ser Tyr Pro Val Phe Asn Pro Pro Ser Val Pro Gly Leu Asp Gly
225 230 235 240

Ser Asn Pro Gly Asn Pro Thr Thr Thr Val Val Pro Pro Ala Ser Thr
245 250 255

Ser Thr Ser Arg Pro Thr Ser Ser Thr Ser Ser Pro Val Ser Thr Pro
260 265 270

Thr Gly Gln Pro Gly Gly Cys Thr Thr Gln Lys Trp Gly Gln Cys Gly
275 280 285

Gly Ile Gly Tyr Thr Gly Cys Thr Asn Cys Val Ala Gly Thr Thr Cys
290 295 300

Thr Gln Leu Asn Pro Trp Tyr Ser Gln Cys Leu
305 310 315

<210> 7

<211> 1663

5 <212> DNA

<213> Chaetomium thermophilum

<220>

<221> gen

<222> (1)..(1663)

<220>

5 <221> Intrón

<222> (1591)..(1654)

<400> 7

atgatgtata agaagttcgc cgctctcgcc gccctcgtgg ctggcgcctc cgcccagcag 60

gcttgcctcc	tcaccgctga	gaaccaccct	agcctcacct	ggaagcgctg	cacctctggc	120
ggcagctgct	cgaccgtgaa	cggcgccgtc	accatcgatg	ccaactggcg	ctggactcac	180
accgtctccg	gctcgaccaa	ctgctacacc	ggcaaccagt	gggatacctc	cctctgcact	240
gatggcaaga	gctgcgcccc	gacctgctgc	gtcgatggcg	ctgactactc	ttcgacctat	300
ggatatacca	ccagcgggtga	ctccctgaac	ctcaagtctg	tcaccaagca	ccagtacggc	360
accaacgtcg	gctcccgtgt	ctatctgatg	gagaacgaca	ccaagtacca	gatgttcgag	420
ctcctcggca	acgagttcac	cttcgatgtc	gatgtctcca	acctgggctg	cggtctcaac	480
ggcgccctct	acttcgtttc	catggatgct	gatgggtggc	tgagcaaata	ctctggcaac	540
aaggctggcg	ccaagtacgg	taccggctac	tgcgatgtct	agtgcgcgcg	cgacctcaag	600
ttcatcaacg	gcgaggccaa	cgttgggaac	tggacccccct	cgaccaacga	tgccaacgcc	660
ggcttcggcc	gctatggcag	ctgctgctct	gagatggatg	tctgggaggc	caacaacatg	720
gctactgcct	tcactcctca	cccttgccac	accgttggcc	agagccgctg	cgaggccgac	780
acctgcggtg	gcacctacag	ctctgaccgc	tatgctggtg	tttgcgacct	tgatggctgc	840
gacttcaacg	cctaccgcca	aggcgacaag	accttctacg	gcaagggcat	gactgtcgac	900
accaacaaga	agatgaccgt	cgtcacccag	ttccacaaga	actcggctgg	cgctcctcagc	960
gagatcaagc	gcttctacgt	ccaggacggc	aagatcattg	ccaacgctga	gtccaagatc	1020
cccggcaacc	ccggaaactc	cattacccag	gagtattgct	atgcccagaa	ggctgccttc	1080
agtaacaccg	atgacttcaa	ccgcaaggcg	ggtatggctc	agatgagcaa	ggccctcgca	1140
ggccccatgg	tcctggatcat	gtccgtctgg	gatgaccact	acgccaacat	gctctggctc	1200
gactcgacct	accccatcga	ccaggccggc	gcccccgccg	ccgagcgccg	tgcttgcccc	1260
accacctccg	gtgtccctgc	cgagatcgag	gcccagggtc	ccaacagcaa	cgatcatcttc	1320
tccaacatcc	gtttcggccc	catcggtctg	accgtccctg	gccttgacgg	cagcaacccc	1380
ggcaacccga	ccaccaccgt	cgttcctccc	gcttctacct	ccacctcccg	tccgaccagc	1440
agcactagct	ctcccgtttc	gaccccgact	ggccagcccc	gcggctgcac	caccacagaag	1500
tggggccagt	gcggcggtat	cggtctacac	ggctgcacta	actgcgttgc	tggcaccacc	1560
tgcactcagc	tcaacccctg	gtacagccag	gtatgtttct	cttccccctt	ctagactcgc	1620
ttggatttga	cagttgctaa	catctgctca	acagtgcctg	taa		1663

<210> 8

<211> 1076

5 <212> DNA

<213> Acremonium thermophilum

<220>

<221> gen

<222> (1)..(1076)

5 <220>

<221> Intrón

<222> (84)..(142)

<220>

10 <221> Intrón

<222> (392)..(514)

<400> 8

atg ⁻ cgctcct caccctttct ccgcgcagct ctggctgccg ctctgcctct gagcgcccat	60
gccctcgacg gaaagtcgac gaggtatgcc aatcctcgta cctctgccct ctgtagaaac	120
aagtgaccga ctgcaaagac agatactggg actgctgcaa gccgtcctgc ggctggccgg	180
gaaaggcctc ggtgaaccag cccgtcttct cgtgctcggc cgactggcag cgcattcagcg	240
acttcaacgc gaagtcgggc tgcgacggag gctccgccta ctctgtgcgc gaccagacgc	300
cctggg ⁻ cggt caacgacaac ttctcgtagc gcttcgcagc cacggccatc gccggcggct	360
ccgagtccag ctggtgctgc gcctgctatg cgtgagttct ctgcaagccg cttcccaccc	420
ccgctttctg tgcaggccgc tttcccccta cccaccact tcccccccc cgcctctgtg	480
atcgggcatc cgagctaagt tgcgtgtcgt ccagactcac cttcaactcg ggccccgtcg	540
cgggcaagac catggtggtg cagtcgacca gcaccggcgg cgacctgggc agcaaccagt	600
tcgacctcgc catccccggc ggcggcgtgg gcatcttcaa cggtgtgcgc tcccagttcg	660
gcggcctccc cggcgcccag tacggcggca tcagcgaccg cagccagtgc tcgtccttcc	720
ccgcgccgct ccagccgggc tgccagtggc gcttcgactg gttccagaac gccgacaacc	780
ccaccttcac cttccagcgc gtgcagtgcc cgtccgagct cacgtcccgc acgggctgta	840
agcgcgacga cgacgccagc tatcccgtct tcaaccgcgc tagcggtggc tccccagca	900
ccaccagcac caccaccagc tccccgtccg gtcccacggg caaccctcct ggaggcgggtg	960
gctgcactgc ccagaagtgg gccagtgcg gcggcactgg cttcacgggc tgcaccacct	1020
gcgtctcggg caccacctgc caggtgcaga accagtggta ttccagtggt ctgtga	1076

15

<210> 9

<211> 45

<212> DNA

<213> Thermoascus aurantiacus

5 <400> 9

attaaccgcg gactgcgcat catgaagctc ggctctctcg tgctc 45

<210> 10

<211> 29

10 <212> DNA

<213> Thermoascus aurantiacus

<400> 10

aactgaggca tagaaactga cgcatatt 29

15 <210> 11

<211> 28

<212> DNA

<213> Chaetomium thermophilum

20 <400> 11

taatttacgt acctggcctt gacggcag 28

<210> 12

<211> 30

25 <212> DNA

<213> Chaetomium thermophilum

<400> 12

attaactgca gttacaggca ctgttgagca 30

30

<210> 13

<211> 42

<212> DNA

<213> Acremonium thermophilum

35

<400> 13

attaaccgcg gactgcgcat catgcgctcc tcacccttc tc

42

<210> 14

5 <211> 33

<212> DNA

<213> Acremonium thermophilum

<400> 14

10 ttaatctgca gtcacagaca ctgggaatac cac

33

<210> 15

<211> 81

<212> PRT

15 <213> Chaetomium thermophilum

<400> 15

Val Pro Gly Leu Asp Gly Ser Asn Pro Gly Asn Pro Thr Thr Thr Val
1 5 10 15

Val Pro Pro Ala Ser Thr Ser Thr Ser Arg Pro Thr Ser Ser Thr Ser
20 25 30

Ser Pro Val Ser Thr Pro Thr Gly Gln Pro Gly Gly Cys Thr Thr Gln
35 40 45

Lys Trp Gly Gln Cys Gly Gly Ile Gly Tyr Thr Gly Cys Thr Asn Cys
50 55 60

Val Ala Gly Thr Thr Cys Thr Gln Leu Asn Pro Trp Tyr Ser Gln Cys
65 70 75 80

Leu

20

REIVINDICACIONES

1. Proteína de fusión de celulasa que comprende una primera secuencia de aminoácidos de un núcleo de endoglucanasa que tiene al menos una identidad del 75% con la SEQ ID n.º 2, o un fragmento de la misma que tiene actividad celulasica, y una segunda secuencia de aminoácidos que comprende un conector y un dominio de fijación a la celulosa (CBD) que tiene al menos una identidad del 75% con la SEQ ID n.º 15, o un fragmento de la misma que tiene actividad de fijación a la celulosa.
2. Proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el núcleo de endoglucanasa tiene al menos el 80% de identidad con la SEQ ID n.º 2, o un fragmento de la misma que tiene actividad celulasica.
3. Proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el conector y el CBD tienen al menos el 80% de identidad con la SEQ ID n.º 15, o un fragmento de la misma que tiene actividad de fijación a la celulosa.
4. Proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el núcleo de endoglucanasa comprende la secuencia de SEQ ID n.º 2, y el conector y el CBD comprenden la secuencia de SEQ ID n.º 15.
5. Proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID n.º 4, o un fragmento de la misma que tiene actividad celulasica y actividad de fijación a la celulosa.
6. Proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el núcleo de endoglucanasa está codificado por un gen similar al incluido en *E. coli* DSM 17326, o cuya proteína de fusión está codificada por una fusión génica similar a la incluida en *E. coli* DSM 18159.
7. Polinucleótido aislado seleccionado entre el grupo que consiste en:
 - a) una secuencia de nucleótidos de SEQ ID n.º 3, o una secuencia que codifica una proteína de fusión de celulasa de acuerdo con la reivindicación 1,
 - b) una hebra complementaria de a).
8. Vector de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos de acuerdo con la reivindicación 7.
9. Célula hospedadora que comprende el vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 8.
10. Método para producir una proteína de fusión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende las etapas de transformar una célula hospedadora con un vector de expresión que codifica dicha proteína de fusión y cultivar dicha célula hospedadora en condiciones que permiten la expresión de dicha proteína de fusión y, opcionalmente, recuperar y purificar la proteína de fusión producida.
11. Preparación enzimática, que comprende la proteína de fusión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
12. Procedimiento para tratar material celulósico, en donde dicho procedimiento comprende poner en contacto el material celulósico con la proteína de fusión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, o con la preparación enzimática de acuerdo con la reivindicación 11.
13. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 12, en el que el material celulósico es material textil, plantas utilizadas en alimentos para consumo animal, o pasta de papel o fibra secundaria procedente de madera.
14. Alimento para consumo animal, que comprende la proteína de fusión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
15. Cepa de *Escherichia coli* que tiene el número de acceso DSM 18159.

Figura 1

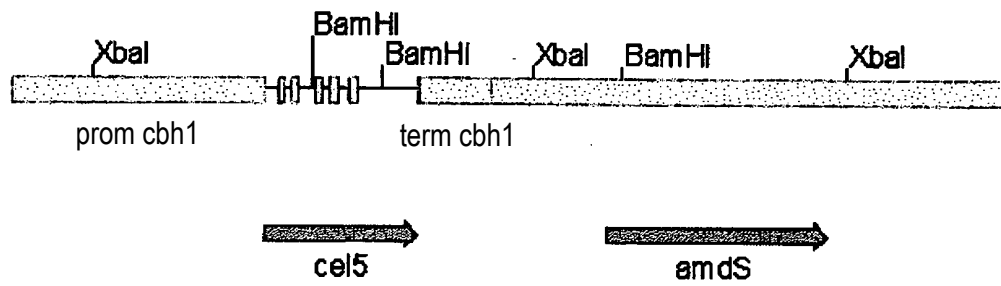


Figura 2 (A)

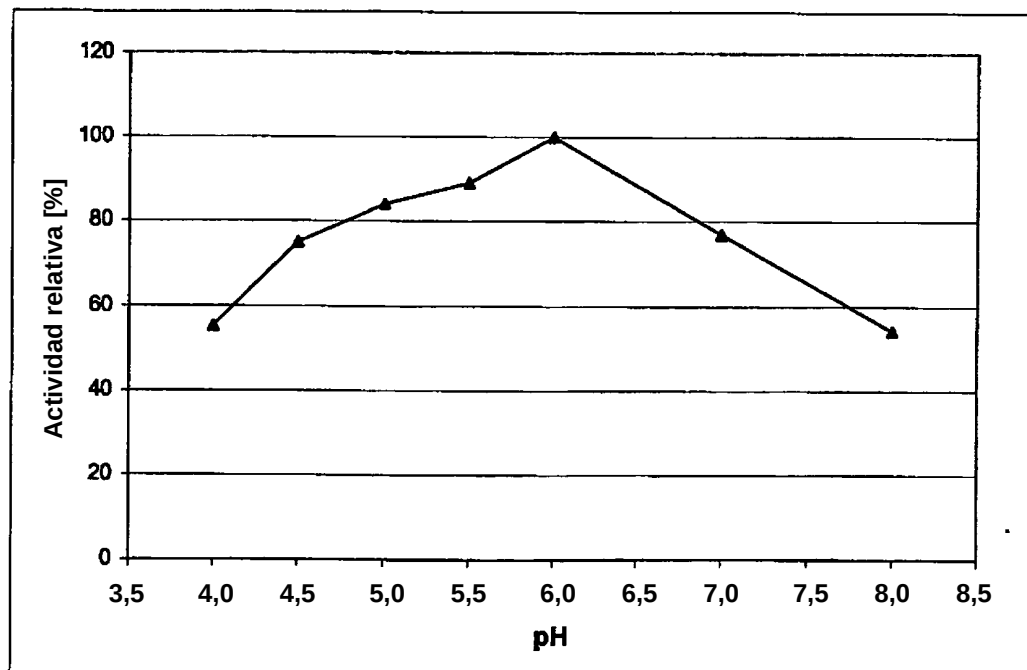


Figura 2 (B)

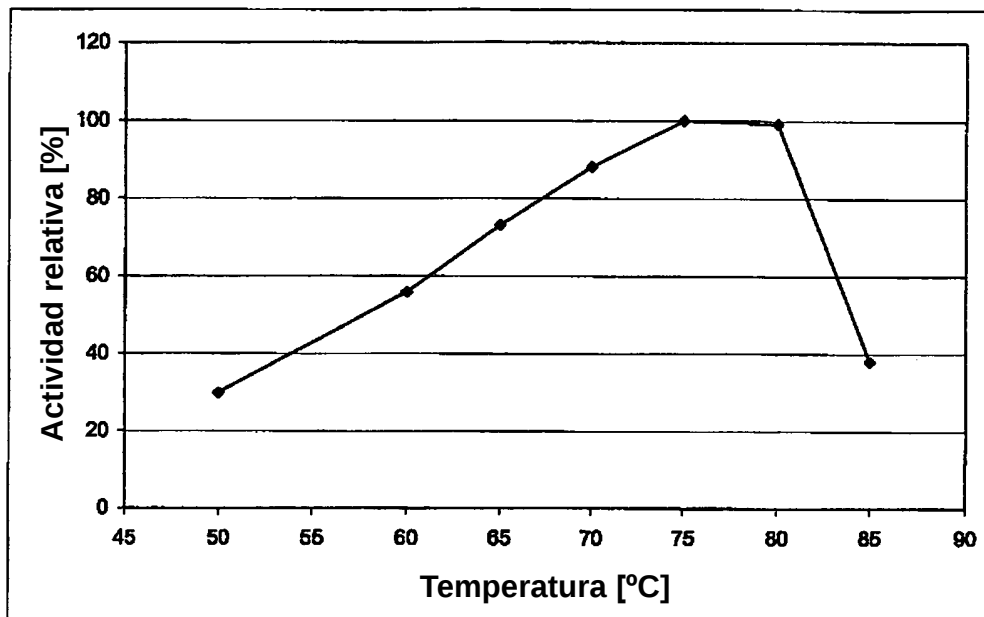


Figura 3

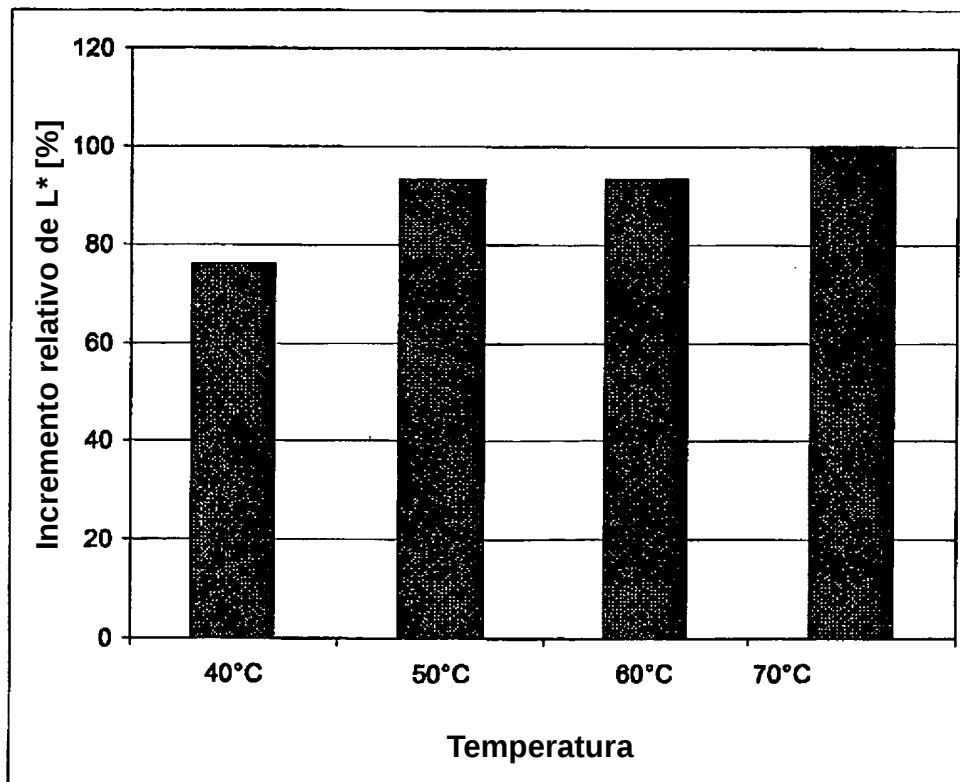


Figura 4

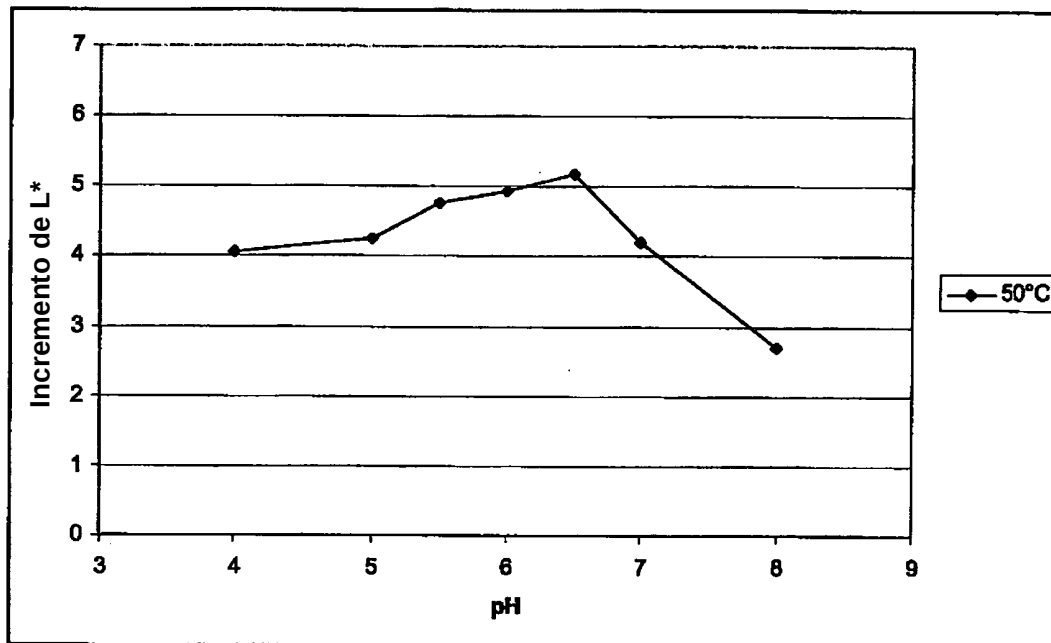


Figura 5

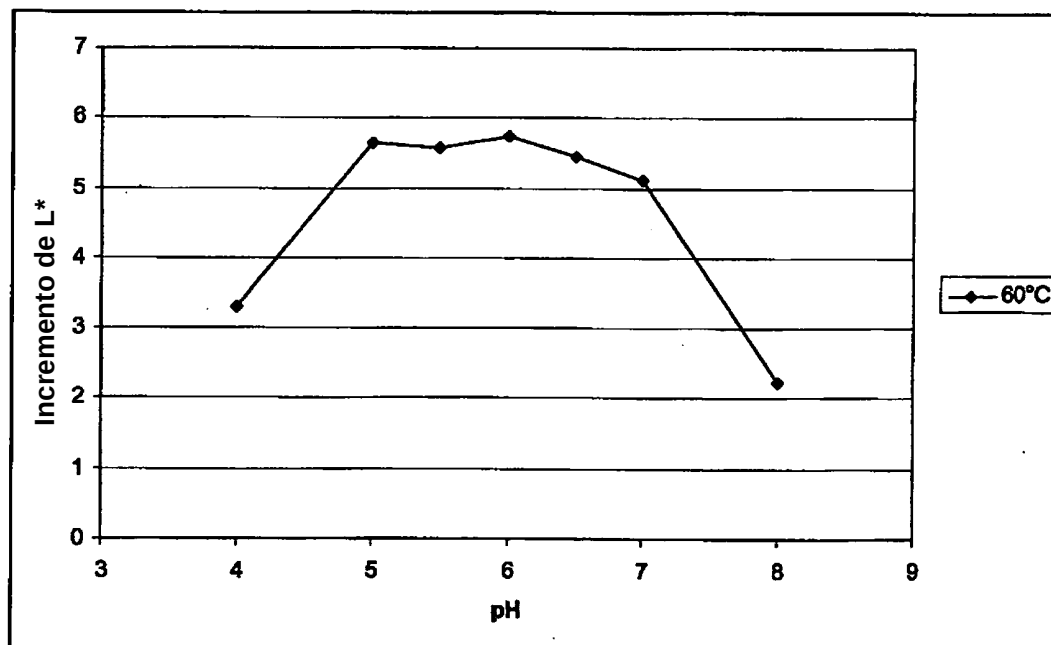


Figura 6

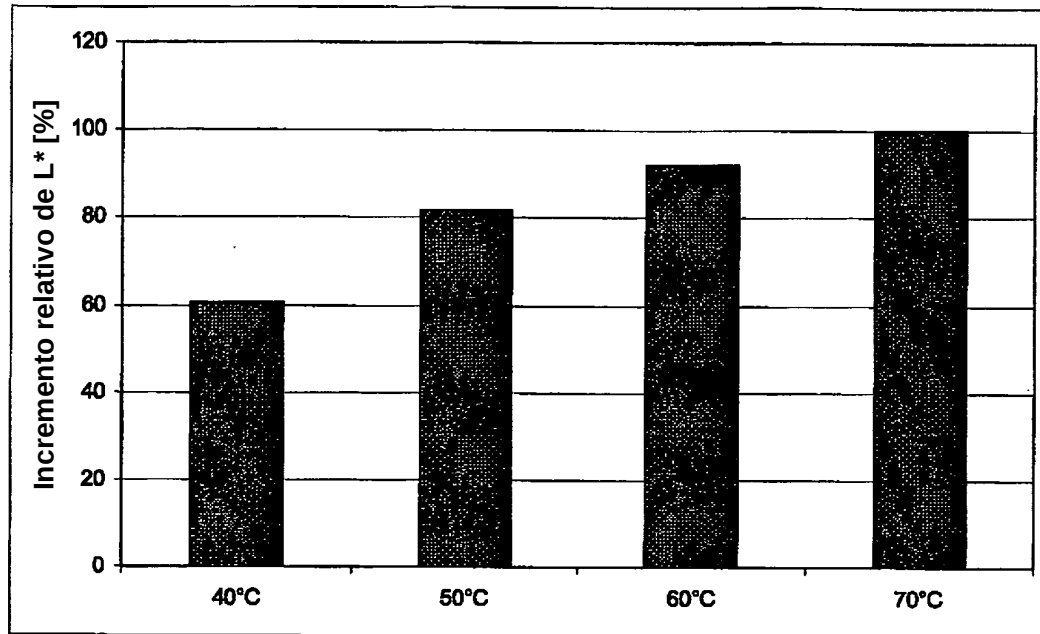


Figura 7

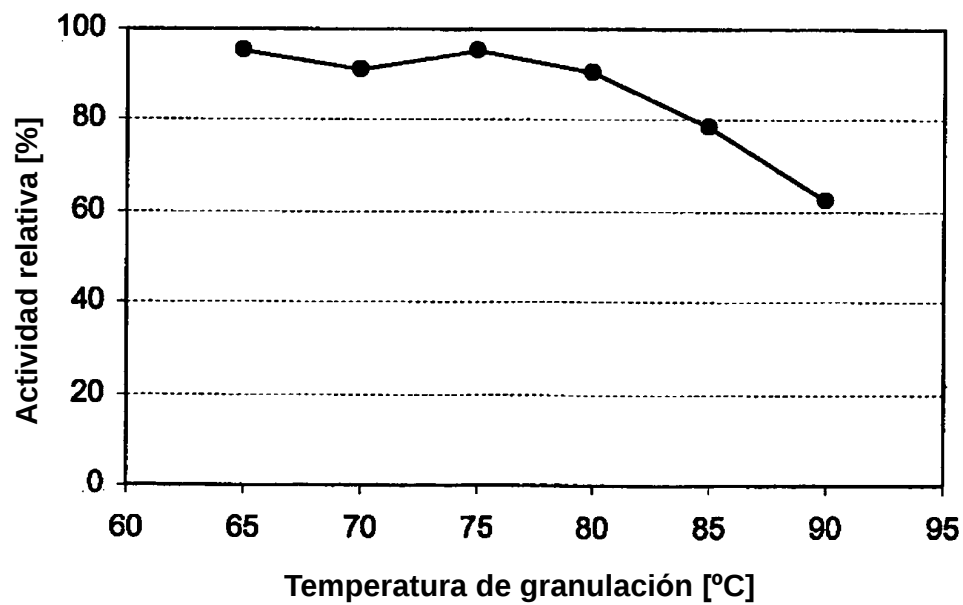


Figura 8

