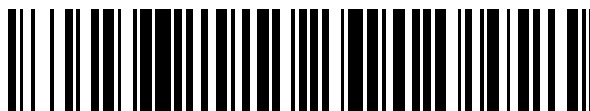


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 458 301**

51 Int. Cl.:

C12N 9/42 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C12N 15/80 (2006.01)

C11D 3/386 (2006.01)

D06M 16/00 (2006.01)

A23K 1/165 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.04.2006 E 06725936 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.03.2014 EP 1874927**

54 Título: **Celulasas mejoradas**

30 Prioridad:

29.04.2005 FI 20055202

29.04.2005 US 119526

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

30.04.2014

73 Titular/es:

AB ENZYMES OY (100.0%)

TYKKIMÄENTIE 15

05200 RAJAMÄKI, FI

72 Inventor/es:

VEHMAANPERÄ, JARI;

PURANEN, TERHI;

VALTAKARI, LEENA;

KALLIO, JARNO;

ALAPURANEN, MARIKA;

PALOHEIMO, MARJA y

OJAPALO, PENTTI

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 458 301 T3

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

DESCRIPCIÓN

Celulasas mejoradas.

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere a nuevas proteínas de fusión de celulasa, a preparaciones y a composiciones que contienen estas proteínas de fusión de celulasa, a vectores de expresión, a células hospedadoras y a métodos para su preparación y a usos de las celulasas, a preparaciones y composiciones en la industria textil, de detergentes y de pasta y papel.

Antecedentes de la invención

- 10 La celulosa es un polisacárido lineal de restos de glucosa unidos por enlaces β -1,4. En la naturaleza, la celulosa está normalmente asociada con lignina junto con hemicelulosas, tales como xilanos y glucomananos. Las enzimas celololíticas hidrolizan celulosa y son producidas por una amplia diversidad de bacterias y hongos. Las celulasas son enzimas importantes desde el punto de vista industrial con un valor comercial anual actual de aproximadamente 190 millones de dólares americanos. En la industria textil, las celulasas se usan en el acabado de tela vaquera para crear un aspecto moderno de lavado a la piedra en ropa de tela vaquera en un proceso de biolavado a la piedra (biostoning) y también se usan, por ejemplo, para eliminar pelusa y prevenir la acumulación de fibra en la superficie de prendas de algodón. En la industria de detergentes las celulasas se usan para realzar los colores y para prevenir el agrisado y la acumulación de fibra en la superficie del tejido de las prendas (pilling). Adicionalmente las celulasas se usan en la industria alimentaria y en la fabricación de piensos animales, y tienen un gran potencial en la industria de la pasta y del papel, por ejemplo, en destintado para eliminar la tinta de las superficies de la fibra y en la mejora del drenaje de la pasta. El amplio espectro de usos industriales de las celulasas ha establecido una necesidad de productos comerciales de celulasa que contienen diferentes componentes de celulasa y que actúan óptimamente a diferentes intervalos de pH y temperatura.

- 25 El uso práctico de las celulasas es complicado por la naturaleza de las celulasas conocidas, que a menudo son mezclas de celulasas que tienen una diversidad de actividades y especificidades por sustratos. Por esta razón, se han realizado esfuerzos para obtener celulasas que solo tengan las actividades deseadas. Las propiedades exclusivas de cada celulasa hacen que algunas sean más adecuadas para determinados fines que otras. Aunque las enzimas difieren de diversas formas, una de las diferencias más importantes es el pH óptimo. Las celulasas neutras son más activas en el intervalo de pH de 6-8 y las celulasas alcalinas en el intervalo de pH de 7,5-10, mientras que las celulasas ácidas, con un pH óptimo de 4,5-5,5, muestran niveles de actividad muy bajos a valores de pH más elevados. Las celulasas neutras y ácidas son especialmente útiles en la industria textil. En el tratamiento de tejidos las celulasas atacan a las cadenas de las moléculas de celulosa que forman las fibras de algodón, afectando de esta manera a las características del tejido.

- 35 En la industria textil, el aspecto "lavado a la piedra" o aspecto desgastado ha suscitado interés en los productores de tela vaquera en los últimos años. El lavado a la piedra tradicional con piedra pómez reduce la resistencia del tejido y sobrecarga las lavadoras. La tendencia se ha dirigido a procesos de acabado enzimáticos de tela vaquera y las celulasas han reemplazado o se están utilizando junto con la piedra pómez para dar a los tejidos este aspecto "usado" deseado. El tratamiento enzimático controlado perjudica menos a las prendas y a las lavadoras y elimina la necesidad de utilizar piedra.

- 40 Las celulasas aplicadas en el tratamiento de tela vaquera se dividen normalmente en dos grupos principales: celulasas ácidas y neutras. Las celulasas ácidas actúan típicamente en un intervalo de pH de 4,5 a 5,5 y las celulasas neutras en un intervalo de pH de 6 a 8. Las celulasas ácidas utilizadas en el biolavado a la piedra proceden principalmente de *Trichoderma reesei* (forma sexual de *Hypocrea jecorina*) y las celulasas neutras proceden de una variedad de hongos, que incluyen los géneros *Melanocarpus*, *Humicola*, *Thielavia*, *Myceliophthora*, *Fusarium*, *Acremonium* y *Chrysosporium* (Haakana et al. 2004). Las enzimas de *T. reesei* incluyen, por ejemplo, celulasas de glucósido de la familia 5 (endoglucanasa II, EGII), familia 7 (celobiohidrolasa I, CBHI) y familia 12 (endoglucanasa III, EGIII; Ward et al. 1993) y las celulasas neutras, más frecuentemente endoglucanasas, de la familia 45 y la familia 7 (Henrissat, 1991; Henrissat y Bairoch, 1993).

- 50 Las celulasas comprenden un dominio/núcleo (CD) catalítico que expresan actividad celulasa. Además del dominio catalítico la molécula de celulasa puede comprender uno o más dominios de unión a celulosa (CBD, *Cellulose Binding Domain*), denominados también dominios/módulos de unión a carbohidratos (CBD/CBM), que pueden estar localizados en el extremo N o en el extremo C del dominio catalítico. Los CBD tienen actividad de unión a carbohidratos e intervienen en la unión de la celulasa con la celulosa cristalina pero tienen escaso o ningún efecto sobre la actividad hidrolítica celulasa de la enzima en sustratos solubles. Estos dos dominios están típicamente conectados mediante una región engarzadora flexible y altamente glucosilada.

- 55 Las celulasas que ejercen su acción atacando principalmente a la superficie de la fibra, son especialmente útiles en el lavado a la piedra de la tela vaquera teñida con colorante Índigo, ya que el colorante se localiza en la superficie de la fibra. Cuando se utilizan para tratar el tejido de algodón, las celulasas neutras generalmente requieren un tiempo de lavado más prolongado que las celulasas ácidas. Sin embargo, las celulasas neutras tienen una acción menos

agresiva sobre el algodón que las celulasas ácidas, y no afectan a la resistencia del tejido tanto como las celulasas ácidas. Las celulasas neutras tienen un perfil de pH más amplio y por tanto el aumento de pH que se produce durante el biolavado a la piedra tiene escaso efecto sobre la actividad de enzimas celulasas neutras. Sin embargo, dado que los tratamientos con celulasa también tienen efectos no deseables, tales como, la producción de daños a la fibra y la pérdida de resistencia, debe buscarse un equilibrio adecuado entre los efectos deseados y no deseados.

El documento WO97/14804 describe tres nuevas celulasas neutras procedentes de *Melanocarpus*, que son especialmente útiles en la industria textil y de detergentes. Especialmente se describe una endoglucanasa de 20 kDa (Cel45A), una endoglucanasa de 50 kDa (Cel7A) y una celobiohidrolasa de 50 kDa (Cel7B). En el presente documentos, estas celulasas se denominan "celulasa 20K", "celulasa 50K" y "celulasa B 50K", respectivamente, derivan de *Melanocarpus albomyces* y presentan buenos efectos de lavado a la piedra.

Dadas las exigencias existentes, especialmente en la industria textil y de detergentes, de celulasas adicionales mejoradas, se ha sugerido que, formando proteínas de fusión, podrían obtenerse mejoras en las celulasas. Además, en el documento WO97/14804 se sugieren, en líneas generales, construcciones de proteínas de fusión de celulasa 20K, celulasa 50K y celulasa B 50K con, por ejemplo, celulasa, hemicelulasa o manasa de *Trichoderma reesei* o dominios funcionales de las mismas. Además, para crear nuevas propiedades para las celulasas descritas, se sugieren fusiones de las celulasas descritas con dominios, tales como dominios de unión a celulosa (CBD), preferentemente con su engarce. Sin embargo, no se proporcionan ejemplos específicos, ni se describen las nuevas propiedades en cuestión.

Las proteínas de fusión de celulasa también se conocen, por ejemplo, del documento WO96/29397, que desvela endoglucanasas formadas por una fusión entre endoglucanasas de *Myceliophthora thermophila*, de *Macrophomina phaseolina* y de *Crinipellis scabellia* y el CBD/engarce de *Humicola insolens*. Dichas endoglucanasas, en su forma natural, no tienen un CBD/engarce.

El documento EP 663 950 desvela variantes de celulasa, especialmente variantes de celulasa de 43 kDa de *Humicola insolens*, en las que la celulasa puede incluir una región engarzadora de otra especie de microorganismo, por ejemplo, para proporcionar propiedades mejoradas, tales como resistencia mejorada a tensioactivos aniónicos, a oxidación o a agentes blanqueantes.

Sin embargo, existe una necesidad continua de celulasas mejoradas que también sean menos dañinas para la fibra en la industria textil y en otros campos donde se utilizan tradicionalmente celulasas. En particular, existe una necesidad continua de celulasas que sean más eficaces para mejorar la economía de los procesos.

La presente invención tiene la intención de satisfacer esta necesidad.

Breve descripción de la invención

Un objeto de la presente invención es proporcionar nuevas proteínas de fusión de celulasa que tengan propiedades hidrolíticas mejoradas para su uso en la industria textil, especialmente en el lavado a la piedra de tela vaquera, y para su uso en composiciones de detergentes, así como en otros campos. Las nuevas proteínas de fusión de celulasa de invención son activas a valores de pH neutros y alcalinos, tienen un resultado de lavado altamente mejorado en aplicaciones textiles de bioacabado y biolavado a la piedra y en aplicaciones de detergentes, e incluso no comprometen la resistencia de los tejidos. Con la eficacia mejorada de las proteínas de fusión de celulasa de la invención, el proceso de fabricación de las enzimas es significativamente más económico. Se consiguen ventajas adicionales, también en cuanto a logística y conservación de los productos enzimáticos, ya que se requieren menores cantidades del producto enzimático.

Un objeto adicional de la presente invención es proporcionar polinucleótidos que codifiquen a las nuevas proteínas de fusión de celulasa de la presente invención.

Un objeto adicional de la presente invención es proporcionar nuevos plásmidos de expresión o vectores que contengan dichos polinucleótidos, útiles para la producción de las nuevas proteínas de fusión de celulasa de la presente invención y nuevos hospedadores transformados con dichos plásmidos de expresión.

Un objeto adicional de la presente invención es proporcionar preparaciones enzimáticas, que contengan una o más nuevas proteínas de fusión de celulasa que tengan propiedades hidrolíticas mejoradas.

Un objeto aún adicional de la presente invención es proporcionar métodos de uso de las preparaciones enzimáticas y de las proteínas de fusión de celulasa para el acabado de textiles, especialmente para el biolavado a la piedra de tela vaquera.

Un objeto todavía adicional de la presente invención es proporcionar medios para el uso de las preparaciones enzimáticas de la invención en composiciones de detergentes.

La presente invención se refiere a una nueva proteína de fusión de celulasa que comprende:

A. una primera secuencia de aminoácidos opcionalmente modificada de un núcleo de celulasa derivado de una

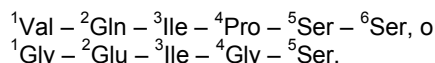
especie, y

B. una segunda secuencia de aminoácidos opcionalmente modificada de un engarce y/o dominio de unión a celulosa (CBD) derivado de otra especie,

5 en la que entre dicha primera secuencia de aminoácidos y dicha segunda secuencia de aminoácidos se ha introducido una región de unión, mediante la cual se obtiene una proteína de fusión estable. La proteína de fusión de la invención comprende una primera secuencia de aminoácidos de un núcleo de celulasa, que es la celulasa de 20 K de *Melanocarpus albomyces* de SEC ID N°: 2 o una modificación de la misma seleccionada del grupo que consiste en: la delección de Ala en la posición 207, la delección de Val en la posición 208, la sustitución de Phe209Trp y la inserción de Pro después de la posición 206, y

10 una segunda secuencia de aminoácidos de un engarce y un dominio de unión a celulosa (CBD), que es el engarce y el CBD de la celobiohidrolasa I de *Trichoderma reesei* de SEC ID N°: 4, o una modificación de la misma seleccionada del grupo que consiste en: la sustitución de tirosina en la posición 492 (posición 31 del CBD), posición 493 (posición 32 del CBD) de la CBHI madura de *T. reesei* con un aminoácido alifático o aromático y las delecciones de los aminoácidos 434 a 444 o 434 a 460 de la secuencia de la CBHI madura de *T. reesei*,

15 en la que dicha primera secuencia de aminoácidos y dicha segunda secuencia de aminoácidos están conectadas mediante una región de unión que tiene la fórmula:

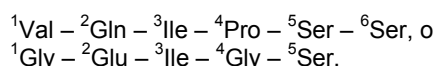


20 La presente invención también se refiere a un vector de expresión que comprende una primera secuencia de polinucleótidos que codifica una primera secuencia de aminoácidos opcionalmente modificada de un núcleo de celulasa derivado de una especie, una segunda secuencia de polinucleótidos que codifica una segunda secuencia de aminoácidos opcionalmente modificada de un engarce y/o dominio de unión a celulosa (CBD) derivado de otra especie, y un polinucleótido que codifica una región de unión y que conecta dicha primera y segunda secuencia de polinucleótidos, codificando dichas secuencias de polinucleótidos las secuencias de aminoácidos respectivas de las

25 proteínas de fusión de celulasa de la invención. El vector de expresión de la invención comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica una primera secuencia de aminoácidos de un núcleo de celulasa, que es la celulasa de 20 K de *Melanocarpus albomyces* de SEC ID N°: 2 o una modificación de la misma seleccionada del grupo que consiste en: la delección de Ala en la posición 207, la delección de Val en la posición 208, la sustitución de Phe209Trp y la inserción de Pro después de la posición 206, y una secuencia de polinucleótidos que codifica una segunda

30 secuencia de aminoácidos de un engarce y un dominio de unión a celulosa (CBD), que es el engarce y el CBD de la celobiohidrolasa I de *Trichoderma reesei* de SEC ID N°: 4, o una modificación de la misma seleccionada del grupo que consiste en: la sustitución de tirosina en la posición 492 (posición 31 del CBD), posición 493 (posición 32 del CBD) de la CBHI madura de *T. reesei* con un aminoácido alifático o aromático y las delecciones de los aminoácidos 434 a 444 o 434 a 460 de la secuencia de la CBHI madura de *T. reesei*, y una secuencia de polinucleótidos que

35 codifica una región de unión que conecta dicha primera y segunda secuencia de aminoácidos, teniendo dicha región de unión la fórmula:



40 La presente invención también se refiere a nuevos hospedadores transformados con los vectores de la invención, especialmente hospedadores que pueden realizar una expresión a alto nivel de la proteína de fusión de celulasa de la invención.

Adicionalmente, la presente invención se refiere a una preparación enzimática que contiene una o más proteínas de fusión de celulasa de la invención.

45 Adicionalmente, la presente invención se refiere a un método para el uso de las preparaciones enzimáticas de la invención para el acabado de textiles, especialmente para el biolavado a la piedra de tela vaquera.

La presente invención también se refiere al uso de las preparaciones enzimáticas de la invención en composiciones de detergentes.

Dibujos

La Fig. 1 es el mapa esquemático del plásmido pALK1480.

50 La Fig. 2 es el mapa esquemático del plásmido pALK492.

La Fig. 3 es el mapa esquemático del plásmido pALK424.

La Fig. 4 es el mapa esquemático del plásmido pALK1237.

La Fig. 5 es el mapa esquemático del plásmido pALK1241.

La Fig. 6 es el mapa esquemático del plásmido p3SR2.

La Fig. 7 es el mapa esquemático del plásmido pALK1649.

La Fig. 8 es el mapa esquemático del plásmido pALK1694.

Fig. 9A. Casete de expresión usado en la transformación de protoplastos de *Trichoderma reesei* para producir las proteínas de fusión 20K+CBD. El gen 20K+CBD está bajo el control del promotor *cbh1* (*cel7A*) (prom *cbh1*) y la terminación de la transcripción se garantiza usando la secuencia terminadora (term) *cbh1*. Se incluyeron, el gen *amdS* (*amdS*) y la región 3' flanqueante de *cbh1* (3' flanqueante *cbh1*). Fig. 9B. Secuencia de aminoácidos de un punto de unión en el cual la proteína de 20K de *Melanocarpus albomyces* (Cel45A) se fusiona con el péptido engarzador de la CBHI de *Trichoderma reesei* (Cel7A) seguido por el dominio de unión a celulosa (CBD) en los plásmidos pALK1434 y pALK1435. Los aminoácidos incluidos en la región de engarce se indican subrayados y la secuencia de aminoácidos de la región CBD se indica en cursiva. El primer aminoácido de la región CBD se indica con un número superíndice.

Fig. 10A. Casete de expresión usado en la transformación de protoplastos de *Trichoderma reesei* para producir las proteínas de fusión 20K+CBD. El gen 20K+CBD está bajo el control del promotor *cbh1* (*cel7A*) (prom *cbh1*) y la terminación de la transcripción se garantiza usando la secuencia terminadora (term) *cbh1*. Se incluye el gen *amdS* (*amdS*) y la región 3' flanqueante de *cbh1* (3' flanqueante *cbh1*). Fig. 10B. Secuencia de aminoácidos de un punto de unión en el cual la proteína de 20K de *Melanocarpus albomyces* (Cel45A) se fusiona con el péptido engarzador de la CBHI de *Trichoderma reesei* (Cel7A) seguido por el dominio de unión a celulosa (CBD) en los plásmidos pALK1768, pALK1769, pALK1770 y pALK1775. Los aminoácidos incluidos en la región de engarce se indican subrayados y la secuencia de aminoácidos de la región CBD se indica en cursiva. El primer aminoácido de la región CBD se indica con un número superíndice.

Fig. 11A. Casete de expresión usado en la transformación de protoplastos de *Trichoderma reesei* para producir la proteína de fusión 20K+CBD_{mut}. El gen 20K+CBD_{mut} está bajo el control del promotor *cbh1* (*cel7A*) (prom *cbh1*) y la terminación de la transcripción se garantiza usando la secuencia terminadora (term) *cbh1*. El gen *amdS* se incluyó como un marcador de transformación. Fig. 11B. Secuencia de aminoácidos de un punto de unión en el cual la proteína de 20K de *Melanocarpus albomyces* (Cel45A) se fusiona con el péptido engarzador de la CBHI de *Trichoderma reesei* (Cel7A) seguido por el dominio de unión a celulosa (CBD). También se presentan las sustituciones de aminoácidos en la región CBD de los casetes de expresión pALK1877 - pALK1880. Los aminoácidos incluidos en la región de engarce se indican subrayados, y la secuencia de aminoácidos de la región CBD se indica en cursiva. El primer aminoácido y los restos de tirosina o sus sustituciones en la región CBD se indican con números superíndice.

Fig. 12A. Secuencia de aminoácidos del péptido engarzador interdominio de la CBHI de *T. reesei* (Cel7A). Los aminoácidos incluidos en la región de engarce se indican subrayados. ΔG-444 y ΔG-460 representan la delección de engarce de los restos 434-444 y 434-460, respectivamente. Fig. 12B. Secuencia de aminoácidos de un punto de unión en el cual la proteína 20K de *Melanocarpus albomyces* (Cel45A) se fusiona con el péptido engarzador truncado de la CBHI de *Trichoderma reesei* (Cel7A) seguido por el dominio de unión a celulosa (CBD) intacto o mutado en los casetes de expresión pALK1893, pALK1896, pALK1899 y pALK1952. Los aminoácidos incluidos en la región de engarce se indican subrayados, y la secuencia de aminoácidos de la región CBD se indica en cursiva. El primer aminoácido y los restos de tirosina o sus sustituciones en la región CBD se indican con números superíndice.

Fig. 13A. Casete de expresión usado en la transformación de protoplastos de *Trichoderma reesei* para la producción de la proteína de fusión 50K+CBD. El gen 50K+CBD está bajo el control del promotor *cbh1* (prom *cbh1*) y la terminación de la transcripción se garantiza con la adición del terminador (term) *cbh1*. Se incluyen el gen *amdS* (*amdS*) y la región 3' flanqueante *cbh1* (3' *cbh1*). Fig. 13B. Secuencia de aminoácidos del punto de unión de la proteína de 50K de *M. albomyces* unida al engarce+CBD de la CBHI de *T. reesei*. Los aminoácidos incluidos en la región de engarce se indican subrayados, y la secuencia de aminoácidos de la región CBD se marca en cursiva. El primer aminoácido de la región CBD se indica con un número superíndice.

Fig. 14A. Casete de expresión usado en la transformación de protoplastos de *Trichoderma reesei* para la producción de la proteína de fusión 50KB+CBD. El gen 50KB+CBD está bajo el control del promotor *cbh1* (prom *cbh1*) de *T. reesei* y la terminación de la transcripción se garantiza con la adición del terminador (term) *cbh1*. Se incluyen el gen *amdS* (*amdS*) y la región 3' flanqueante *cbh1* (3' *cbh1*). Fig. 14B. Secuencia de aminoácidos del punto de unión de la proteína de 50KB de *M. albomyces* unida al engarce+CBD de la CBHI de *T. reesei*. Los aminoácidos incluidos en la región de engarce se indican subrayados, y la secuencia de aminoácidos de la región CBD se marca en cursiva. El primer aminoácido de la región CBD se indica con un número superíndice.

Fig. 15A. Casete de expresión usado en la transformación de protoplastos de *Trichoderma reesei* para la producción de la proteína de fusión CBHI+CBD de *Thermoascus aurantiacus*. El gen CBHI+CBD está bajo el control del promotor *cbh1* (*cel7A*) (prom *cbh1*) y la terminación de la transcripción se garantiza usando la

secuencia terminadora (term) *cbh1*. Se incluyó el gen *amdS* como marcador de transformación. Fig. 15B. Secuencia de aminoácidos de un punto de unión en el cual la proteína CBHI de *Thermoascus aurantiacus* se fusiona con el péptido engarzador de la CBHI de *Trichoderma reesei* seguido por el dominio de unión a celulosa (CBD). Los aminoácidos incluidos en la región de engarce se indican subrayados y la secuencia de aminoácidos de la región CBD se marca en cursiva. El primer aminoácido de la región CBD se indica con un número superíndice.

Fig. 16. Rendimiento de las cepas RF5977 y RF6090 que expresan las proteínas de fusión de la invención comparado con el de una preparación 20K comercial en el tratamiento de tela vaquera. Aumento de luminosidad en función de la dosificación enzimática en las condiciones de lavado descritas en los Ejemplos 8 y 9.

Fig. 17. Efecto de las proteínas de fusión 20K+CBD y de preparaciones enzimáticas comerciales correspondientes sobre la resistencia del tejido de tela vaquera. Fig. 17A. Resistencia al desgarro (N), urdimbre. Fig. 17B. Resistencia al desgarro (N), trama.

Fig. 18. Muestra el efecto eliminador de acumulación de fibra en la superficie del tejido (*pilling*) de la proteína de fusión 20K+CBD.

Fig. 19. Ilustra el rendimiento de la proteína de fusión 20K+CBD en la aplicación de detergentes. La figura muestra la diferencia comparativa de color entre el artículo 224 contra el agrisado lavado con o sin la enzima, y el artículo original (no lavado); A. a 40 °C y B. a 60 °C.

Fig. 20. Ilustra el rendimiento de la proteína de fusión 20K+CBD en la aplicación de detergentes. La figura muestra la diferencia comparativa de color entre el artículo 224 contra el agrisado lavado con la enzima y sin la enzima; A. a 40 °C y B. a 60 °C.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se basa en intentos para mejorar adicionalmente celulasas neutras, en particular los descritos en el documento WO97/14804, cuyo objetivo es reducir la pérdida de la resistencia del tejido en el tratamiento enzimático. En algunas aplicaciones, la celulasa 20K ha demostrado propiedades no deseables en relación con la resistencia de la fibra, posiblemente debido al pequeño tamaño. La hipótesis sencilla fue que un aumento de tamaño de la enzima disminuiría la capacidad de la misma para penetrar en las fibras, debilitando de este modo las fibras a un menor grado, es decir, la enzima sería menos agresiva. Para ello se utilizó la estrategia de proteínas de fusión sugerida en el documento WO97/14804 y se diseñaron construcciones de fusión que contenían un núcleo de celulasa neutra de una especie de *Melanocarpus* y una cola que consistía en un engarce/CBD de una celobiohidrolasa I ácida de *T. reesei*. Sin embargo, de manera sorprendente, contrariamente a las sugerencias de la técnica anterior, las construcciones de proteínas de fusión completamente estables no podrían obtenerse, salvo si los compañeros de fusión se separan entre sí en las condiciones de cultivo. Esto era supuestamente debido a la presencia de proteasa (o proteasas).

Para producir proteínas de fusión estables, una estrategia fue diseñar nuevas construcciones de unión que no tenían aminoácidos hidrófobos adyacentes (por ejemplo, V, I, L, F y W) para impedir la escisión por aspartilproteasas. Sin embargo, aunque las construcciones produjeron proteínas de fusión, ocasionalmente se observaba alguna degradación.

Basándose en el alineamiento de celulasas neutras que, de manera natural, contienen una cola de engarce/CBD, se produjeron construcciones adicionales y finalmente estas construcciones demostraron que eran más estables y más útiles en ensayos posteriores. Además, se diseñaron construcciones de fusión que llevaban mutaciones en el CBD dando como resultado una afinidad o adsorción reducida o mínima para la celulosa (Linder *et al.* 1995).

Las nuevas construcciones producidas mejoraron las propiedades de resistencia, como era el objetivo. Sorprendentemente, las proteínas de fusión de celulasa estables también mostraron una mejora inesperada en los resultados del lavado, y su eficacia fue incluso seis veces tan alta como la de sus celulasas "parentales". Sin embargo, los rendimientos de producción se mantuvieron aproximadamente al mismo nivel. Esto significa que, para conseguir el mismo resultado de lavado de la celulasa de la técnica anterior solo se necesita una sexta parte de la cantidad real de la actividad celulasa. Esto produce reducciones considerables en la etapa de producción y también en la logística y almacenamiento, disminuyendo de este modo la carga ambiental. También se reducen los efectos no deseados de las preparaciones de celulasa, aportando de este modo ahorros adicionales a los usuarios finales del producto enzimático. Considerando que anualmente se producen alrededor de 2 pares de billones de pantalones vaqueros, y que la mayoría de ellos tiene un acabado con celulasa, la ventaja es muy significativa.

Por consiguiente, la presente invención proporciona una nueva proteína de fusión de celulasa que comprende

A. una primera secuencia de aminoácidos opcionalmente modificada de un núcleo de celulasa derivada de una especie, y

B. una segunda secuencia de aminoácidos opcionalmente modificada de un engarce y/o dominio de unión a celulosa

(CBD) derivada de otra especie,

en la que, como se ha definido específicamente en líneas anteriores, entre dicha primera secuencia de aminoácidos y dicha segunda secuencia de aminoácidos se ha introducido una región de unión, mediante la cual se obtiene una proteína de fusión estable.

- 5 En una realización de la invención la región de unión tiene la siguiente fórmula general:

¹Val – ²Gln – ³Ile – ⁴Pro – ⁵Ser – ⁶Ser

En otra realización de la invención la región de unión tiene la siguiente fórmula general:

¹Gly – ²Glu – ³Ile – ⁴Gly – ⁵Ser.

- 10 De acuerdo con la invención la primera secuencia de aminoácidos es de una celulasa neutra y la segunda secuencia de aminoácidos es de una celulasa ácida.

La primera secuencia de aminoácidos es de una celulasa de la familia 45 (Cel45) y la segunda secuencia de aminoácidos es de una celulasa de la familia 7 (Cel7).

- 15 Como se usa en el presente contexto, la expresión “núcleo de celulasa” o “núcleo” significa el dominio catalítico / núcleo (CD) de una enzima que expresa actividad celulasa. Dicho dominio catalítico puede estar en su forma natural (es decir, intacto) o, preferentemente, estar modificado como se define más adelante. Las expresiones variante “derivada” y funcional indican polipéptidos indican polipéptidos que expresan la misma actividad celulasa pero que incluyen modificaciones como se define más adelante.

- 20 En el presente contexto se utilizan códigos de aminoácidos convencionales de una letra y códigos de aminoácidos de tres letras. Por tanto, A y Ala indican alanina, R y Arg indican arginina, N y Asn indican asparagina, D y Asp indican ácido aspártico, Cys y C indican cisteína, E y Glu indican ácido glutámico, Q y Gln indican glutamina, G y Gly indican glicina, H e His indican histidina, I e Ile indican isoleucina, L y Leu indican leucina, K y Lys indican lisina, M y Met indican metionina, F y Phe indican fenilalanina, P y Pro indican prolina, S y Ser indican serina, T y Thr indican treonina, W y Trp indican triptófano, Y Tyr indican tirosina, y V y Val indican valina. Además de aminoácidos L de origen natural, pueden usarse aminoácidos D.

- 25 En las proteínas de fusión de celulasa de la invención, la celulasa natural es, preferentemente, de origen fúngico. La celulasa neutra puede derivar de *Melanocarpus albomyces*. La celulasa ácida utilizada en las proteínas de fusión de celulasa de la invención proviene de *Trichoderma reesei*.

- 30 La primera secuencia de aminoácidos es la celulasa 20 K de *Melanocarpus albomyces* de SEC ID N°: 2 o un derivado de la misma, y la segunda secuencia de aminoácidos es del engarce y el CBD de la celobiohidrolasa I de *Trichoderma reesei* de SEC ID N°: 4 o un derivado de la misma.

- 35 En una realización preferida de la invención las proteínas de fusión de celulasa contienen modificaciones en el núcleo de celulasa y/o en el engarce y/o el en CBD. Como se usa en el presente contexto, la expresión “modificado” significa mutaciones, tales como una delección, inserción, o sustitución de uno o más aminoácidos, u otras modificaciones, tales como glucosilaciones. Como ejemplos de dichas mutaciones se incluye la sustitución de restos de tirosina conservados en la posición 31 (correspondiente a la tirosina Y492 del polipéptido maduro) y/o posición 32 (correspondiente a la tirosina Y493 del polipéptido maduro) con un aminoácido alifático, preferentemente con alanina, y/o con un aminoácido aromático, tal como triptófano, del CBD de la CBHI de *Trichoderma reesei*, como describen Linder *et al.*, 1995. Otros ejemplos de dichas mutaciones incluyen mutaciones inter-engarce de la CBHI de *Trichoderma reesei*, como describen Srisodsuj *et al.*, 1993, tales como las delecciones de aminoácidos de la posición 40 434 a 444 y de la posición 434 a 460 de la secuencia de CBHI madura de *Trichoderma*. Otros ejemplos de dichas mutaciones incluyen la delección de Ala en la posición 207, la delección de Val en la posición 208, la sustitución de Phe209Trp, y la inserción de Pro después de la posición 206 en la secuencia de la celulasa 20 K de *Melanocarpus albomyces* de SEC ID N°: 2.

- 45 Las proteínas de fusión de celulasa de la invención son estables. En el contexto de la presente invención la expresión “proteína de fusión de celulasa estable” significa que al menos 20 %, preferentemente al menos 40 %, más preferentemente al menos 70 %, más preferentemente 90 %-100 %, de la proteína de fusión de celulasa producida contiene una región de unión no escindida entre las secuencias de aminoácidos durante la fermentación. Esto significa que un 20 %-100 %, preferentemente 40 %-100 %, más preferentemente 70 %-100 % de la celulasa producida tiene la primera y la segunda secuencia de aminoácidos fusionadas entre sí. La expresión “proteína de fusión de celulasa estable” significa adicionalmente que la preparación de proteína de fusión de celulasa puede ser estable como tal o que se ha estabilizado, por ejemplo, con tratamiento térmico o ajustando el pH o añadiendo estabilizantes o agentes reductores de actividad proteasa o separando la proteína de fusión del cultivo. En el presente contexto, tratamiento térmico significa un tratamiento a temperatura, que permite que la proteína de fusión se mantenga adecuadamente estable en la preparación. El tratamiento térmico puede ser, por ejemplo, un 50 tratamiento a un pH de 6,0 a 65 °C durante 60 a 70 minutos.

En el presente contexto, la expresión “proteína de fusión intacta” significa que la unión entre la primera y segunda secuencias de aminoácidos en la proteína de fusión de la invención permanece íntegra, aunque puede aparecer o no degradación terminal en dichas secuencias.

En la proteína de fusión de celulasa de la invención, la primera secuencia de aminoácidos es una secuencia 20 K de *Melanocarpus albomyces* que tiene la SEC ID N°: 2 o una modificación definida de la misma. También se describe una realización en la que la primera secuencia de aminoácidos es la secuencia 50 K de *Melanocarpus albomyces* que tiene la SEC ID N°: 6 o una variante funcional de la misma. En otra realización desvelada la primera secuencia de aminoácidos es la secuencia 50 KB de *Melanocarpus albomyces* que tiene la SEC ID N°: 8 o una variante funcional de la misma. En otra realización desvelada la primera secuencia de aminoácidos es la secuencia de la CBHI de *Thermoascus aurantiacus* que tiene la SEC ID N°: 10 o una variante funcional de la misma. En la proteína de fusión de celulasa de la invención la segunda secuencia de aminoácidos es el engarce y la secuencia del dominio de unión a celulasa de SEC ID N°: 4 de la celobiohidrolasa I de *Trichoderma reesei* o una modificación definida de la misma.

Por tanto, en una realización muy preferida de la proteína de fusión de celulasa de la invención, la primera secuencia de aminoácidos del núcleo de celulasa se selecciona de SEC ID N°: 37, 38, 39 y 40, especialmente SEC ID N°: 39 y la segunda secuencia de aminoácidos de un engarce y secuencia CBD se selecciona de SEC ID N°: 44, 45, 46, 47, 48, 49 y 50. En una realización especial de la invención, la primera secuencia de aminoácidos del núcleo de celulasa es la SEC ID N°: 39 y la segunda secuencia de aminoácidos de un engarce y secuencia CBD es la SEC ID N°: 47, 49 o 50.

La presente invención también se refiere a un vector de expresión que comprende una primera secuencia de polinucleótidos que codifica una primera secuencia de aminoácidos opcionalmente modificada de un núcleo de celulasa derivada de una especie, y una segunda secuencia de polinucleótidos que codifica una segunda secuencia de aminoácidos opcionalmente modificada de un engarce y/o dominio de unión a celulosa (CBD) derivada de otra especie, y un polinucleótido que codifica una región de unión específica y que conecta dicha primera y segunda secuencia de polinucleótidos, codificando dichas secuencias de polinucleótidos las secuencias de aminoácidos respectivas, como se ha definido anteriormente de modo específico.

La presente invención también se refiere a preparaciones de celulasa que contienen una o más proteínas de fusión de celulasa de la invención en solitario o junto con enzimas adicionales y aditivos de acuerdo con la aplicación especial en cuestión.

La presente invención también se refiere a usos de y a métodos para el uso de las preparaciones de proteína de fusión de celulasa de la invención con fines específicamente descritos más adelante.

Las preparaciones de proteínas de fusión de celulasa de la invención son especialmente útiles en la industria textil y de detergentes. Estas celulasas muestran un efecto de desgaste muy mejorado y un aumento de luminosidad visible y medible. Muestran retrotinción (*backstaining*) aceptable, así como contrastes buenos y nítidos de biolavado a la piedra. Son útiles en la industria textil para el bioacabado de tejidos o prendas, por ejemplo, eliminación de acumulación de fibra en la superficie del tejido (*depilling*), eliminación de pelusa (*defuzzing*), aclarado del color, reducción de aspereza, creación de diferentes acabados (por ejemplo, un efecto de “piel de melocotón”, “desgastado”, “lavado con arena” o “aspecto antiguo”) y para el bioacabado de hilo, por ejemplo, reducción de pilosidad y mejora de la suavidad. Tener dichas buenas propiedades de eliminación de acumulación de fibra es muy inusual de las celulasas neutras, ya que las enzimas utilizadas en aplicaciones de bioacabado industrial son típicamente celulasas ácidas. La celulasa neutra que tiene excelentes propiedades de eliminación de acumulación de fibra, como la proteína de fusión 20K+CBD, permite realizar el tratamiento de bioacabado simultáneamente durante la tinción, lo que conduce a ahorros considerables. Además, la inalterabilidad del color es frecuentemente mejor en condiciones neutras que en condiciones ácidas.

Otros usos incluyen el uso en composiciones de detergentes para mejorar las propiedades del cuidado del tejido por su efecto contra la acumulación de fibra en la superficie del (*pilling*), antiagrisado, aclarado del color y suavidad y para mejorar el efecto limpiador textil, por ejemplo, eliminación de suciedad.

Como se usa en el presente contexto, la expresión “biolavado a la piedra” de tejidos o prendas significa el uso de enzimas en lugar de, o además de, piedra pómez, para el tratamiento de tejidos o prendas, especialmente de tela vaquera.

Como se usa en el presente contexto, la expresión “bioacabado” se refiere al uso de enzimas en una hidrólisis controlada de fibras celulósicas para modificar la superficie del tejido o del hilo, de tal manera que impida permanentemente la acumulación de fibra en la superficie del tejido, mejore la manipulación del tejido, tal como su tersura y suavidad, limpie la estructura de la superficie reduciendo la formación de pelusas, lo que da como resultado el aclaramiento de los colores, mejore la drapabilidad del tejido, mejore la capacidad de absorción de la humedad, lo que también puede mejorar la adsorción de colorantes.

Como se usa en el presente contexto, la expresión “retrotinción” se refiere a la tendencia que tiene el tinte liberado para depositarse de nuevo sobre la superficie de las fibras de tejido.

Como se usa en el presente contexto, la expresión “detergente” se refiere a un agente limpiador que puede contener agentes tensioactivos (tensioactivos aniónicos, no iónicos, catiónicos y anfólicos), sintetizantes y otros ingredientes opcionales tales como agentes anti-redeposición y de suspensión de suciedad, abrillantadores ópticos, agentes blanqueadores, colorantes y pigmentos e hidrolasas. En la Patente de Estados Unidos N° 5.433.750 se proporciona una lista adecuada del contenido de detergentes y en la Patente de Estados Unidos N° 3.664.961 se proporciona una lista adecuada de tensioactivos.

Una secuencia de aminoácidos que es un “equivalente” o un “derivado” de una secuencia de aminoácidos específica significa una secuencia de aminoácidos que no es idéntica a la secuencia de aminoácidos específica, pero en su lugar contiene al menos algunos cambios de aminoácidos (deleciones, sustituciones, inversiones, inserciones, etc.) que no afectan esencialmente a la actividad biológica de la proteína en comparación con una actividad similar de la secuencia de aminoácidos específica, cuando se usa para una aplicación determinada.

La actividad biológica de una celulasa es su actividad catalítica, y/o su capacidad de unirse a material celulósico.

Un vector de expresión es un plásmido o vector de clonación que puede expresar ADN que codifica las proteínas de fusión de celulasa de la invención después de la transformación en un hospedador deseado. Cuando se utiliza un hospedador fúngico, el gen de interés se proporciona preferentemente a un hospedador fúngico como parte de un vehículo de clonación o expresión que integra en su interior el cromosoma fúngico, o permite que el gen de interés se integre en el cromosoma hospedador, o como un plásmido que se replica de manera autónoma. Las secuencias son parte del vehículo de clonación o vehículo de expresión también puede integrarse con dicho ADN durante el proceso de integración. Además en hongos, el vector de expresión, o partes del mismo, pueden dirigirse al interior de locus predeterminados.

El ADN que codifica las proteínas de fusión de la invención también se coloca preferentemente bajo el control de (es decir, está unido operativamente con) determinadas secuencias de control, tales como secuencias promotoras proporcionadas por el vector (que se integran con el gen de interés). Como alternativa, las secuencias de control pueden ser las que se encuentran en un sitio de inserción.

Las secuencias de control de expresión de un vector de expresión variarán dependiendo de si el vector se diseña para expresar un determinado gen en un hospedador procariota o eucariota (por ejemplo, un vector lanzadera puede proporcionar un gen para la selección en hospedadores bacterianos). Las secuencias de control de 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 inicio y terminación de la traducción.

Se dice que una molécula polinucleotídica, tal como ADN, es “capaz de expresar” un polipéptido si esta contiene secuencias de control de expresión que contienen información reguladora transcripcional y dichas secuencias están “unidas operativamente” a la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido.

Una unión operativa es una unión en la que una secuencia está conectada con una secuencia (o secuencias) reguladora de tal manera que coloca la expresión de la secuencia bajo la influencia o el control de la secuencia reguladora. Se dice que dos secuencias de ADN (tal como una secuencia de la región promotora unida al extremo 5' de la secuencia codificante de la proteína) están unidas operativamente si la función del promotor da como resultado la transcripción.

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

En una realización preferida, se construyen transformantes genéticamente estables mediante los cuales el ADN que codifica las proteínas de fusión de celulasa de la invención se integra en el cromosoma del hospedador por transformación con un vector, que incluye secuencias que promueven la integración de dicho vector en el cromosoma.

Las células que en sus cromosomas tienen ADN integrado, estable, que codifica las proteínas de fusión de celulasa de la invención, se seleccionan introduciendo también uno o más marcadores, homólogos o heterólogos, que permiten la selección de células hospedadoras que contienen el vector de expresión en el cromosoma, por ejemplo, el marcador puede proporcionar resistencia a biocidas, por ejemplo, resistencia a antibióticos, o a metales pesados, tales como cobre, o marcadores que complementan una mutación auxotrófica en el cromosoma hospedador y similar. El gen marcador de selección puede estar unido directamente a las secuencias génicas de ADN a expresar o puede introducirse en la misma célula por co-transformación.

Una vez que el vector o la secuencia de ADN que contiene la construcción (o construcciones) se prepara para la expresión, la construcción (o construcciones) de ADN se introducen en una célula hospedadora apropiada mediante cualquiera de una diversidad de medios adecuados, incluyendo transformación, como se conoce en la técnica. Después de la introducción del vector, las células receptoras se cultivan en un medio selectivo, que se selecciona para el cultivo de células transformadas.

Los sistemas hospedadores de producción y expresión adecuados son, por ejemplo, el sistema de producción desarrollado por el hongo hospedador *Trichoderma* (documento EP 244 234) o el sistema de producción de *Aspergillus*, tal como *A. oryzae* o *A. niger* (documentos WO 9708325 y WO 9533386, US 5.843.745, US 5.770.418) o el sistema de producción desarrollado para *Fusarium*, tal como *F. oxysporum* (Malardier *et al.*, 1989). Los sistemas de producción adecuados desarrollados para bacterias son sistemas de producción desarrollados para *Bacillus*, por ejemplo, *B. subtilis* o para *E. coli*, o para el actinomiceto *Streptomyces*. Los sistemas de producción adecuados desarrollados para levaduras son sistemas desarrollados para *Saccharomyces*, *Shizosaccharomyces* o *Pichia pastoris*. También son posibles sistemas de producción en algunos otros microbios o en células de mamífero o en plantas.

La expresión de la secuencia (o secuencias) génica clonada da como resultado la producción de la proteína deseada, o la producción de un fragmento de esta proteína. Esta expresión puede tener lugar de una manera continua en las células transformadas, o de una manera controlada.

Se entiende que los fragmentos son partes de moléculas de ácido nucleico lo suficientemente largas para codificar la proteína descrita o un fragmento biológicamente activo de la misma. El término "derivado" significa, en este contexto, que las secuencias de nucleótidos de estas moléculas difieren de las secuencias de las moléculas de ácido nucleico descritas anteriormente, en una o más posiciones y tienen alta homología con respecto a dicha secuencia. Se entiende que la homología se refiere a una identidad de secuencia de al menos 40 %, particularmente una identidad de al menos 60 %, preferentemente más de 80 % y aún más preferentemente más del 90 %. Las variaciones de las moléculas de ácido nucleico descritas anteriormente pueden ser el resultado de una delección, sustitución, inserción, adición o combinación. Además, homología significa que las secuencias de nucleótidos o proteínas codificadas respectivas son funcional y/o estructuralmente equivalentes.

Como se usa en el presente contexto las expresiones "preparación enzimática" y "preparación de celulasa" se refieren a un cualquier producto enzimático, que contiene al menos una proteína de fusión de celulasa. Por tanto, dicha preparación enzimática puede ser un medio de cultivo agotado o un filtrado que contenga una o más proteínas de fusión de celulasa o una o más proteínas de fusión de celulasa y otras enzimas, una proteína de fusión de celulasa aislada o una mezcla de una o más proteínas de fusión de celulasa o una mezcla de una o más proteínas de fusión de celulasa y una o más enzimas distintas. Además de la actividad de proteína de fusión de celulasa, dicha preparación puede contener aditivos, tales como estabilizantes, tampones, conservantes, tensioactivos y/o componentes del medio de cultivo. Los aditivos preferidos son tales como los que se usan normalmente en las preparaciones enzimáticas destinadas para la aplicación en la que usa la preparación enzimática. La preparación enzimática puede estar en forma de líquido, polvo o granulado.

En el presente documento, por "medio de cultivo agotado" se entiende el medio de cultivo del hospedador que comprende las enzimas producidas. Preferentemente las células hospedadoras se separan de dicho medio después de la producción.

La preparación enzimática puede comprender una o más proteínas de fusión de celulasa de la presente invención u otras enzimas de celulasa junto con una o más proteínas de fusión de celulasa de la presente invención. Por ejemplo, las proteínas de fusión de celulasa que tienen diferentes propiedades pueden combinarse para elaborar la preparación enzimática más útil para diferentes condiciones.

Para obtener las preparaciones enzimáticas de la invención, los hospedadores que tienen las propiedades deseadas (es decir, hospedadores capaces de expresar cantidades económicamente asequibles de las proteínas de fusión de celulasa de la invención) se cultivan en condiciones adecuadas, las enzimas deseadas se segregan del hospedador en el medio de cultivo, y la preparación enzimática se recupera de dicho medio de cultivo por métodos conocidos en la técnica.

La preparación enzimática puede comprender además de proteínas de fusión celulasa, una o más enzimas distintas, que pueden ser, por ejemplo, amilasas, lacasas y/o peroxidasas. Como alternativa, antes, durante o después del tratamiento con la proteína de fusión de celulasa de la presente invención, puede realizarse otro tratamiento enzimático. El tratamiento enzimático puede comprender, por ejemplo, uno o más tratamientos con amilasa, uno o más tratamientos con celulasa y/o uno o más tratamientos con peroxidasa y/o lacasa. El que otras enzimas se incluyan en la preparación enzimática o se usen en el tratamiento enzimático, depende de la aplicación.

La preparación enzimática puede ser el medio de cultivo con o sin las células hospedadoras naturales o transformadas, o se recupera del mismo por la aplicación de métodos bien conocidos en la técnica. Sin embargo, debido a que las proteínas de fusión de celulasa de la invención se segregan en los medios de cultivo y presentan actividad en las condiciones ambientales de licor celulolítico, es una ventaja de la invención que las preparaciones enzimáticas de la invención puedan utilizarse directamente a partir del medio de cultivo sin purificación adicional. Si se desea, dichas preparaciones pueden liofilizarse o de otra manera la actividad enzimática puede concentrarse y/o estabilizarse para su conservación. Las preparaciones enzimáticas de la invención son muy económicas de proporcionar y usar porque (1) las enzimas pueden usarse en bruto, sin procesar; el aislamiento de una enzima específica del medio de cultivo es innecesario y porque (2) las enzimas se segregan en el medio de cultivo, por lo cual solo es preciso recuperar el medio de cultivo para obtener la preparación enzimática deseada; no se requiere

extraer ninguna enzima de los hospedadores. Preferentemente, para efectuar dicha producción el hospedador es *Trichoderma*, y especialmente *T. reesei*.

Las preparaciones enzimáticas de la invención pueden proporcionarse como un licor o como un sólido, por ejemplo, en un polvo seco o en forma granular o líquida, especialmente gránulos no espolvoreables, o un líquido estabilizado, o la preparación enzimática puede concentrarse de otra manera o estabilizarse para su conservación o uso. Se contempla que las preparaciones enzimáticas que contienen una o más de las celulasas neutras de la invención puedan enriquecerse adicionalmente o puedan carecer parcial o completamente de actividades enzimáticas específicas, para satisfacer las exigencias de una utilidad específica en diversas aplicaciones, por ejemplo, en la industria textil. Puede seleccionarse una mezcla de actividades enzimáticas segregada por un hospedador, y especialmente por un hongo, para que sea ventajosa en una aplicación industrial particular, por ejemplo, en el biolavado a la piedra.

Las preparaciones enzimáticas de la invención pueden ajustarse para satisfacer las exigencias de las necesidades específicas en diversas aplicaciones en la industria textil, de detergentes o de pasta y papel.

Las combinaciones pueden prepararse con otras macromoléculas, no necesariamente todas ellas producidas por el mismo hospedador (por ejemplo, otras enzimas tales como endoglucanasas, proteasas, lipasas, peroxidasas, oxidasas o amilasas), o con productos químicos que pueden potenciar el rendimiento, la estabilidad o capacidad tamponante de la preparación enzimática deseada. Los gránulos no espolvoreables pueden revestirse. Las preparaciones enzimáticas líquidas pueden estabilizarse añadiendo un poliol, tal como propilenglicol, un azúcar o un alcohol de azúcar, ácido láctico o ácido bórico, o cloruro sódico, de acuerdo con procedimientos establecidos.

Pueden prepararse formas protegidas de las enzimas de la invención como se describe en el documento EP 238.216.

Las preparaciones enzimáticas de la invención pueden contener un tensioactivo que puede ser aniónico, no iónico, catiónico, anfotérico o una mezcla de estos tipos, especialmente cuando se usan como una composición de detergente. Se describen composiciones de detergentes útiles, por ejemplo, en el documento WO 94/07998 y en las patentes de Estados Unidos Nos 5.443.750 y 3.664.961.

Si se requiere, también puede purificarse una enzima deseada de acuerdo con condiciones convencionales, tales como extracción, precipitación, cromatografía, cromatografía por afinidad, electroforesis o similares.

Las preparaciones enzimáticas de la presente invención son especialmente útiles en la industria textil, preferentemente en el biolavado a la piedra y en el bioacabado o en la industria de detergentes. Otros sectores útiles son la industria de la pasta y del papel.

El lavado a la piedra consta de tres etapas: eliminación del apresto, abrasión y post-tratamiento. La primera etapa, el proceso de eliminación del apresto, es normalmente el primer tratamiento en húmedo de los vaqueros y significa la eliminación de almidón u otros agentes encolantes aplicados normalmente a los hilos de la urdimbre para impedir que se produzcan daños durante el proceso de hilado. Para eliminar el apresto basado en almidón se utilizan alfa amilasas para mejorar y dar uniformidad al procesado de humectación. Después de eliminar el apresto, los vaqueros se aclaran normalmente con agua o directamente se continúa con la etapa de abrasión.

La segunda etapa, la abrasión, puede realizarse con enzimas o con piedra pómez o con ambas. En todos los casos se requiere acción mecánica para eliminar el tinte y el tratamiento se realiza normalmente en lavadoras, tal como de tipo tambor. En el presente documento, el término “desgastado” significa el aspecto del tejido de tela vaquera cuando se ha tratado con enzimas de celulasa o con piedras o con ambas. Como resultado de una eliminación desigual de tinte, existen contrastes entre áreas teñidas y áreas en las que se ha eliminado el tinte. Expresiones sinónimas son “aspecto de lavado a la piedra” o “aspecto usado”. En el lavado a la piedra enzimático, o biolavado a la piedra, la abrasión con piedra pómez se elimina completa o parcialmente y la celulasa se añade para facilitar la abrasión del tinte Índigo de la superficie de la fibra. El tratamiento con celulasa puede realizarse usando celulasas neutras o ácidas o ambas. Si un tejido no está tratado con celulasa o lavado a la piedra, se dice que el aspecto del tejido es “apagado”, ya que se perderían los contrastes de moda. Cuando se desea un efecto más descolorido, puede realizarse blanqueamiento usando agentes químicos y/o métodos enzimáticos, tales como, un tratamiento con lacasa.

Después de la abrasión se realiza la tercera etapa, el post-tratamiento, que incluye las etapas de lavado y aclarado durante las cuales pueden utilizarse, detergentes, abrillantadores ópticos o suavizantes. Después del tratamiento enzimático, la reacción debe detenerse para impedir que se produzcan daños en los materiales tratados, por ejemplo por temperatura y/o inactivación del pH, comprendiendo lo último un aclarado cuidadoso y/o un lavado con detergente. Esto garantiza que la resistencia mecánica de la fibra no esté adicionalmente comprometida por la presencia continuada de la enzima.

La expresión “tela vaquera” significa, en relación con la presente invención, tejido de tela vaquera, normalmente prendas de tela vaquera, particularmente vaqueros. Ventajosamente la tela vaquera es tela vaquera teñida con Índigo. La tela vaquera también puede tratarse con Índigo, con derivados de Índigo o tela vaquera teñida con Índigo

junto con algún otro colorante, por ejemplo tela vaquera teñida con Índigo con fondos de azufre.

El tratamiento con una o varias celulasas puede sustituir por completo el tratamiento con piedra pómez (por ejemplo, 1 kg de enzima comercial frente a 100 kg de piedra). Sin embargo, cuando se desee, para producir un acabado muy desgastado, el tratamiento con celulasa puede combinarse con tratamiento con piedra pómez. A través de un lavado que combine una celulasa neutra con piedra pómez también se consigue un efecto de piel de melocotón en el que se crea un recubrimiento piloso delicado que sobresale. Las celulasas de la presente invención son especialmente útiles para proporcionar un aspecto desgastado y minimizar la retrotinción en el biolavado a la piedra.

El biolavado a la piedra se realiza preferentemente en un intervalo de pH de aproximadamente 4,5 - 9,5, y más preferentemente entre un intervalo de pH de 6,0 - 8,0. La temperatura de la reacción puede variar de aproximadamente 40 - 80 °C, preferentemente entre 50 - 70 °C, y más preferentemente entre 55 - 65 °C y aún más preferentemente a una temperatura de 60 °C. La proporción de licor (proporción del volumen de líquido por peso de tejido) puede variar de aproximadamente 2:1 - 30:1, preferentemente 4:1 - 15:1, y más preferentemente 5:1 - 10:1. La dosificación enzimática puede variar de aproximadamente 5-8000 NCU/g de tejido, preferentemente 20-3000 NCU/g de tejido y más preferentemente 30-1500 NCU/g de tejido. El tiempo de tratamiento puede variar entre 15 min - 4 h, más preferentemente 20 min - 90 min y más preferentemente 30 min - 60 min. Cabe destacar que la dosificación enzimática depende en gran medida del tipo de tejido, de la maquinaria, de las condiciones de procesado (pH, temperatura, proporción de licor, tiempo de tratamiento, carga de tela vaquera, escala de proceso) y del tipo de preparación enzimática y similar. Si se desea, puede utilizarse piedra pómez en combinación con las proteínas de fusión de celulasa. La dosificación enzimática necesaria será entonces significativamente inferior. Un experto en la técnica puede definir dosificaciones y condiciones adecuadas.

Las proteínas de fusión de celulasa de la presente invención son útiles en la industria textil para el bioacabado de tejidos o prendas, por ejemplo, eliminación de acumulación de fibra en la superficie del tejido, eliminación de pelusa, aclarado del color, reducción de aspereza, creación de diferentes acabados (por ejemplo, un efecto de "piel de melocotón", "desgastado", "lavado con arena" o "aspecto antiguo") y para el bioacabado de hilo, por ejemplo, reducción de pilosidad y mejora de la suavidad). Las proteínas de fusión de celulasa de la presente invención pueden usarse en bioacabado en condiciones ácidas y neutras usando básicamente las mismas condiciones que las del biolavado a la piedra.

Las proteínas de fusión de celulasa de la presente invención son útiles en composiciones de detergentes para mejorar las propiedades del cuidado del tejido por su efecto contra la acumulación de fibra en la superficie del tejido, antiagrisado, aclarado del color y suavidad y para mejorar el efecto limpiador textil, por ejemplo, eliminación de suciedad.

El material textil que se trata con las preparaciones enzimáticas de la invención puede fabricarse con fibras que contienen celulosa natural o con fibras que contienen celulosa fabricada por el hombre o mezclas de las mismas. Son ejemplos de fibras celulósicas naturales el algodón, lino, cáñamo, yute y ramio. Son ejemplos de fibras celulósicas fabricadas por el hombre la viscosa, el acetato de celulosa, triacetato de celulosa, rayón, cupro y liocel. Las fibras celulósicas mencionadas anteriormente también pueden emplearse como mezclas de fibras sintéticas tales como poliéster, poliamida o fibras acrílicas. El material textil puede ser hilo o punto o tejido o puede formarse por cualquier otro medio.

Las celulasas de la invención, además de ser especialmente útiles para el tratamiento de tejidos, son útiles en general en cualquier sector que requiera actividad celulasa.

En la industria de la pasta y del papel, pueden usarse celulasas neutras, por ejemplo, en la eliminación de tinta de diferentes papeles y cartones reciclados que tienen pH neutro o alcalino, mejorando la calidad de la fibra o aumentando el drenaje en la fabricación del papel. Otros ejemplos incluyen la eliminación de espesante de la pasta de impresión y el exceso de tinta después de la impresión textil y como un tratamiento para piensos animales. Por ejemplo, si la aplicación que se desea es mejorar la resistencia mecánica de la pasta, entonces las preparaciones enzimáticas de la invención pueden proporcionar una o más de estas proteínas para potenciar o facilitar la capacidad de las fibras de celulosa de unirse entre sí. De una manera similar, en la aplicación del refinado de pasta, las preparaciones de proteínas de fusión de celulasa de la invención pueden proporcionar una o más de esas proteínas a un nivel que potencie o facilite dicha dilatación. De las proteínas de fusión de la invención especialmente adecuadas para aplicaciones de pasta, son aquellas con un núcleo CBHI de 50KB de *Melanocarpus albomyces* o *Thermoascus aurantiacus*.

Las proteínas de fusión de celulasa de la presente invención proporcionan ventajas inesperadas cuando se usan en la industria textil y especialmente en el biolavado a la piedra. Las proteínas de fusión de celulasa de la invención son considerablemente más eficaces que las celulasas de la técnica anterior. En el biolavado a la piedra podían usarse al menos dos veces, normalmente al menos tres veces e incluso seis veces dosificaciones más bajas en cuanto a dosificación de unidades de actividad de celulasa neutra sobre el peso del tejido, sin alterar la resistencia del tejido. En otras palabras, usando las proteínas de fusión de celulasa de la presente invención se consigue un resultado hasta seis veces mayor. Dado que el rendimiento de producción de las proteínas de fusión de celulasa de la invención corresponde al de la celulasa de 20K conocida, la eficacia de producción global se mejora

significativamente. Esto puede proporcionarse directamente con grandes ahorros en cuanto a las cantidades necesarias de la enzima: la posibilidad de usar cantidades reducidas de la enzima ofrece un valor económico considerable en cuanto tanto a la fabricación como al uso, incluyendo la logística.

La invención se ilustra en los siguientes ejemplos.

5 EJEMPLO 1. Construcciones de los vectores de expresión para proteínas de fusión 20K+CBD

En el aislamiento, purificación y tratamientos enzimáticos de ADN (plásmidos, fragmentos de ADN), en reacciones de cadena de la polimerasa (PCR), y en transformaciones con *E. coli*, etc. se utilizaron métodos convencionales de biología molecular. Los métodos básicos utilizados se describen en los manuales convencionales de biología molecular, por ejemplo, Sambrook *et al.* (1989) y Sambrook y Russell (2001).

- 10 Se diseñaron construcciones de plásmidos para unir la secuencia codificante 20K de *Melanocarpus albomyces* (Cel45A, AC N° AJ515703; SEC ID N°: 1) con la secuencia codificante del engarce y el CBD de la CBHI de *Trichoderma reesei* (AC N° AR088330; Sridsodsuk *et al.* 1993; SEC ID N°: 3). Se diseñaron en total seis uniones diferentes, como se describe en la Tabla 1.

- 15 Para las construcciones n° 1 y n° 2 expuestas en la Tabla 1, se introdujo un solo sitio *NruI* en el extremo de la secuencia codificante 20K. Este sitio permite la fusión directa después del codón para la serina n° 213 de la 20K madura con cualquier fragmento de ADN con un extremo romo. Se desarrolló una reacción PCR con los cebadores 20K_*Nco* (SEC ID N°: 11) y 20K_*NruXho* (SEC ID N°: 14) con el plásmido pALK1480 (Fig. 1) como molde usando el programa A (Tabla 3). El plásmido pALK1480 tiene la copia genómica de la *cel45A* de *M. albomyces* (que codifica la Cel45A o 20K) insertado bajo el promotor *cbh1* de *T. reesei* y una fusión exacta y tiene el terminador *cbh1* cadena
- 20 abajo del gen en el vector pUC19 (New England Biolabs, Inc., Estados Unidos). La mezcla de reacción de la PCR contenía tampón de reacción 1x DyNAzyme™ EXT (Finnzymes, Finlandia), Mg²⁺ 8 mM (la concentración final ajustada con adición de MgCl₂), dNTP 0,2 mM, 0,5 μM de cada cebador, 1,0 unidades de ADN polimerasa DyNAzyme™ EXT (Finnzymes, Finlandia), y aproximadamente 50 ng/100 μl de molde. El producto PCR se sometió a digestión con las enzimas de restricción *NcoI* y *XhoI* y los fragmentos se aislaron del gel de agarosa después
- 25 electroforesis. El fragmento de 6,1 kb cortado de manera similar y aislado de pALK1480 se ligó con el fragmento de la PCR, y se transformó en *E. coli* XL1-Blue (Stratagene, Estados Unidos). El ADN plasmídico se aisló de los transformantes y se verificó, por secuenciación, un candidato adecuado. El plásmido resultante se denominó pALK1429.

- 30 Las reacciones de la PCR se realizaron por separado, como se ha indicado anteriormente, con los pares de cebadores 1_*BamMly* (SEC ID N°: 16) + *XhoAge* (SEC ID N°: 15) y 2_*BamMly* (SEC ID N°: 17) + *XhoAge* (SEC ID N°: 15) con pALK492 como molde (Fig. 2), y los productos resultantes de la PCR, que contenían el engarce y el CBD, se sometieron a digestión con *MlyI* (que produce un extremo romo justo antes del primer codón deseado de la secuencia codificante del engarce y CBD) y *AgeI*. El plásmido pALK492 lleva un fragmento *PstI* de aproximadamente 6,9 kb del ADN cromosómico QM6a de *T. reesei* que incluye el gen *cbh1/cel7A* subclonado en el
- 35 sitio *PstI* de pUC19. El plásmido pALK1429 obtenido anteriormente se sometió a digestión con *NruI* y *AgeI*, y parte del vector se aisló y se ligó por separado con los dos productos de la PCR digeridos obtenidos anteriormente y se transformó en *E. coli* XL1-Blue. Los ADN plasmídicos se aislaron, se verificaron por secuenciación y los plásmidos resultantes se denominaron pALK1430 (que lleva, como inserto, el producto de la PCR 1_*BamMly* + *XhoAge*) y pALK1431 (que lleva, como inserto, el producto PCR 2_*BamMly* + *XhoAge*).

Tabla 1. Diferentes uniones construidas entre la 20K de *Melanocarpus albomyces* y el engarce+CBD de CBHI de *Trichoderma reesei*.

Construcción Nº	Uniones engarce-núcleo	núcleo 20K molde pALK1480			engarce+CBD molde pALK492		Construcciones de plásmidos
		cebador 5'	cebador 3'		cebador 5'	cebador 3'	
1	...hddggfavfkaps.-gstgn...	20K_NcoI	20K_NruXho_GPI		1_BamMly-oligo	XhoAge_oligo	pAKL1434 <-pALK1430 <-pALK1429
2	...hddggfavfkaps.-ggpppg...	20K_NcoI	20K_NruXho_GPI		2_BamMly-oligo	XhoAge_oligo	pAKL1435 <-pALK1431 <-pALK1429
3	...hddggfa.fGPIgs-tgn...	20K_NcoI_2	20K_NruXho_GPI		3_BamMly-oligo	XhoAge_oligo	pAKL1768 <-pALK1764 <-pALK1758
4	...hddggfWGEIgs-tgn...	20K_NcoI_3	20K_NruXho_WGEI		3_BamMly-oligo	XhoAge_oligo	pAKL1769 <-pALK1765 <-pALK1759
5	...hddggfPavQIPSS-tgn...	20K_NcoI_2	20K_NruXho_PavQIPS		3_BamMly-oligo	XhoAge_oligo	pAKL1770 <-pALK1766 <-pALK1760
6	...hddggfaWGEIgs-tgn...	20K_NcoI_3	20K_NruXho_WGEI-2		3_BamMly-oligo	XhoAge_oligo	pAKL1775 <-pALK1774 <-pALK1773

En la segunda columna, la parte que está más a la izquierda es la secuencia derivada de *Melanocarpus* y la parte que está más de la derecha es la secuencia derivada de *Trichoderma*. Las letras minúsculas indican secuencias originales, las letras mayúsculas indican la secuencia modificada, el punto (.) indica un aminoácido deletado y un guión indica el punto de unión unido ligando los plásmidos en cuestión. El primer aminoácido de la secuencia de *Melanocarpus* es histidina nº 201 de la secuencia madura y en las construcciones nº 1, nº 3, nº 4 y nº 6 el primer aminoácido de la secuencia de *Trichoderma* es glicina nº 427, la construcción nº 2 glicina nº 434 y en la construcción nº 5 serina nº 428 de la secuencia madura.

Tabla 2. Cebadores usados

Cebador	Longitud nucleótidos	Secuencia	Secuencia ID N°:
20K_Nco	27	5'-TACGCCATGGTCGTCCAGTCGACCAGC	11
20K_Nco_2	35	5'-TACGCCATGGTCGTCCAGTCGACCAGCACGGGCGG	12
20K_Nco_3	46	5'-TACGCCATGGTCGTCCAGTCGACCAGCACGGGCGGCGACCTCGGCA	13
20K_NruXho	40	5'-CGTACTCGAGTCATCGCGAGGGGGCCCTTGAAGACGGCGAA	14
XhoAge	30	5'-TGACTCGAGACCGGTGCGTCAGGCTTTTCGC	15
1_BamMly	34	5'-TAGGATCCGAGTCCCATTTGGCAGCACCGGCAACC	16
2_BamMly	36	5'-TAGGATCCGAGTCCCTAGCGGGCGGCAACCCCTCCCGGC	17
3_BamMly	34	5'-TAGGATCCGAGTCCCATTTACCGGGCAACCCCTAGCG	18
20K_NruXho_GPI	55	5'-CGTACTCGAGTCATCGCGAGCCGATGGGGCCGAAGCGCGCGTCGTCGTG	19
20K_NruXho_WGEI	52	5'-CGTACTCGAGTCATCGCGAGCCGATCTCGCCCCAGAAGCCCGTCGTCGTG	20
20K_NruXho_PavQIPS	58	5'-CGTACTCGAGTCATCGCGAGCGGATCTGGACGGCGGGGAAGCCCGTCGTCGTG	21
20K_NruXho_WGEI-2	52	5'-CGTACTCGAGTCATCGCGAGCCGATCTCGCCCCAGGCGAAGCCCGTCGTC	22
50K_NruXhoI	37	5'-TCGTCTCGAGTCGCGATGGGGCCGAAGCGGATGTTGG	23
50K_SphI	31	5'-GGAGGGCATGCCCAACAGCAGCGAGATCACC	24
2-50K_NruISpeI	38	5'-CGGCACTAGTTTCGCGACCCCGATCTCGCCCCAGCGCAGG	25
50K_XhoI	26	5'-CGCCGAGGGCCGGCTCGAGAGCATCC	26

Tabla 3. Programas de la reacción PCR usados

Etapas	A	B	C	D
1	95 °C 5 min	95 °C 5 min	98 °C 1 min	98 °C 1 min
2	95 °C 1 min	95 °C 1 min	98 °C 30 s	98 °C 30 s
3	55 °C 1 min	60 °C 5 min	72 °C 1 min	65 °C 30 s
4	72 °C 1 min	72 °C 5 min	IR A 2 29x	72 °C 1 min
5	IR A 2 24x	IR A 2 24x	95 °C 5 min	IR A 2 29x
6	MANTENER A 4 °C	72 °C 1 min	MANTENER A 4 °C	72 °C 10 min
7		MANTENER A 4 °C		MANTENER A 4 °C

El marcador *amdS* y la región 3' flanqueante *cbh1* de *T. reesei* se insertaron en los vectores pALK1430 y pALK1431 de la siguiente manera: el vector pALK424 (patente de Estados Unidos 5.837.51; Fig. 3) se escindió con *EcoRI* y *SpeI*, el fragmento resultante de 4,8 kb se hizo romo mediante la reacción de relleno de Klenow y se ligó por separado con los plásmidos pALK1430 y pALK1431 escindidos con *StuI*, respectivamente, y se transformó en *E. coli* XL1-Blue. Los ADN plasmídicos se aislaron y la orientación deseada de los insertos se comprobó por digestión con enzimas de restricción apropiadas. Los plásmidos verificados se denominaron pALK1434 (inserto de pALK1430) y pALK1435 (inserto de pALK1431), respectivamente (Tabla 1).

Para las construcciones n° 3, n° 4, n° 5 y n° 6 expuestas en la Tabla 1, se adoptó una estrategia diferente. La secuencia codificante de la 20K y los diferentes puntos de unión modificados (Tabla 1) se diseñaron para finalizar en el codón codificante de serina, que forma una parte del sitio *NruI* añadido. Para todas estas construcciones se utilizó el mismo inserto para proporcionar la secuencia codificante de la parte principal del engarce y CBD. Este último se construyó de la siguiente manera. Se realizó una reacción PCR con la mezcla de reacción descrita anteriormente (excepto sin adición de Mg^{2+}) y usando el par de cebadores 3_ BamMly (SEC ID N°: 18) y XhoAge (SEC ID N°: 15) y como molde ADN de pALK492. Se usó el programa B indicado en la Tabla 3. El producto de la PCR resultante se sometió a digestión con *BamHI* y *XhoI*, se aisló y se ligó con parte del vector escindido de manera similar de pBluescript II KS+ (Stratagene, Estados Unidos) y se transformó en *E. coli* XL1 Blue. El ADN plasmídico se aisló, se comprobó por digestión con enzimas de restricción apropiadas y se verificó por secuenciación. Se seleccionó un plásmido candidato con la secuencia deseada y se denominó pALK1767.

Para la construcción n° 3 indicada en la Tabla 1 se realizó una reacción PCR usando el par de cebadores 20K_Nco_2 (SEC ID N°: 12) y 20K-NruXho_GPI (SEC ID N°: 19) y como molde ADN de pALK1480. Se usaron dos mezclas de reacción: una con la composición descrita anteriormente para la construcción de pALK1767, y la otra con DMSO añadido al 3 % (v/v). Estas dos mezclas de reacción se dividieron y se desarrollaron con los programas C y D de la Tabla 3. Todas las reacciones produjeron fragmentos de ADN de tamaño esperado y las preparaciones se combinaron y sometieron a digestión con *NcoI* y *XhoI*. El fragmento de ADN se aisló y se ligó con un fragmento de 6,1 kb escindido y aislado de manera similar de pALK1480 y se transformó en *E. coli* XL1 Blue. El ADN plasmídico se aisló, se comprobó por digestión con enzimas de restricción apropiadas y se verificó por secuenciación. Se seleccionó un plásmido candidato con la secuencia deseada y se denominó pALK1758.

Para la construcción n° 4 indicada en la Tabla 1 se realizó una reacción PCR usando el par de cebadores 20K_Nco_3 (SEC ID N°: 13) y 20K-NruXho_WGEI (SEC ID N°: 20) y como molde ADN de pALK1480. La mezcla de reacción PCR contenía tampón de reacción 1x Phusion™ GC (Finnzymes, Finlandia), dNTP 0,2 mM, 0,5 μ M de cada cebador, DMSO al 3 % (v/v) y 1,5 unidades de ADN polimerasa Phusion™ (Finnzymes, Finlandia) y aproximadamente 70 ng/100 μ l del molde. La mezcla de reacción se dividió y se procesó con los programas C y D de la Tabla 3. Ambas reacciones produjeron tamaños de ADN de tamaño esperado y las preparaciones se combinaron y se sometieron a digestión con *NcoI* y *XhoI*. El fragmento de ADN se aisló y se ligó con un fragmento de 6,1 kb aislado y escindido de manera similar de pALK1480 y se transformó en *E. coli* XL1 Blue. El ADN plasmídico se aisló, se comprobó por digestión con enzimas de restricción apropiadas y se verificó por secuenciación. Se seleccionó un plásmido candidato con la secuencia deseada y se denominó pALK1759.

Para la construcción n° 5 indicada en la Tabla 1 se realizó una reacción PCR usando el par de cebadores 20K_Nco_2 (SEC ID N°: 12) y 20K-NruXho_PavQIPS (SEC ID N°: 21) y como molde ADN de pALK1480. Se usaron dos mezclas de reacción: una con la composición descrita anteriormente para la construcción de pALK1759 y la otra sin DMSO. Estas dos mezclas de reacción se dividieron y se procesaron con los programas C y D de la Tabla 3. Todas las reacciones produjeron fragmentos de ADN de tamaño esperado y las preparaciones se combinaron y se sometieron a digestión con *NcoI* y *XhoI*. El fragmento de ADN se aisló y se ligó con el fragmento de 6,1 kb aislado y escindido de manera similar de pALK1480 y se transformó en *E. coli* XL1 Blue. Los ADN plasmídicos se aislaron, se

comprobaron por digestión con enzimas de restricción apropiadas y se verificaron por secuenciación. Se seleccionó un plásmido candidato y se denominó pALK1760; éste había adquirido una mutación en el único sitio *XhoI*, pero esto no supuso ningún problema para la subclonación posterior.

Para la construcción nº 6 indicada en la Tabla 1 se realizó una reacción PCR usando el par de cebadores 20K_Nco_3 (SEC ID Nº: 13) y 20K-NruXho_WGEI-2 (SEC ID Nº: 22) y como molde ADN de pALK1480 (70 ng/100 µl). Se usó la misma composición de mezcla de reacción que para la construcción del plásmido pALK1767, y se procesó con el programa C de la Tabla 3. La preparación se sometió a digestión con *NcoI* y *XhoI*. El fragmento de ADN se aisló y se ligó con un fragmento de 6,1 kb escindido y aislado de manera similar de pALK1480 y se transformó en *E. coli* XL1 Blue. Los ADN plasmídicos se aislaron, se comprobaron por digestión con enzimas de restricción apropiadas y se verificaron por secuenciación. Se seleccionó un plásmido candidato y se denominó pALK1773.

Los plásmidos pALK1758, pALK1759, pALK1760 y pALK1773 se escindieron por separado con *NruI* y *Agel*, y las partes del vector se aislaron. Cada preparación se ligó con un fragmento de 235 pb aislado de pALK1767 después de digestión con *MlyI* y *Agel* y cada mezcla de ligamiento se transformó por separado en *E. coli* XL10-Gold. Los ADN plasmídicos se aislaron, se comprobaron por digestión con enzimas de restricción apropiadas y se verificaron por secuenciación. Los plásmidos verificados se denominaron pALK1764, pALK1765, pALK1766 y pALK1774, respectivamente (Tabla 1).

El marcador *amdS* y la región 3' flanqueante *cbh1* de *T. reesei* se insertaron en los vectores pALK1764, pALK1765, pALK1766 y pALK1774 de la siguiente manera: pALK424 se escindió con *EcoRI* y *SpeI*, el fragmento resultante de 4,8 kb se hizo como mediante la reacción de relleno de Klenow, y se ligaron por separado con los plásmidos pALK1764, pALK1765, pALK1766 y pALK1774 escindidos con *StuI*, respectivamente y se transformaron en *E. coli* XL10-Gold. Los ADN plasmídicos se aislaron y la orientación deseada de los insertos se comprobó por digestión de enzimas de restricción apropiadas. Los plásmidos verificados se denominaron pALK1768, pALK1769, pALK1770 y pALK1775, respectivamente (Tabla 1) (Fig. 10).

EJEMPLO 2. Producción de las proteínas de fusión 20K+CBD en *T. reesei*

Los casetes de expresión lineales de 8,7 kb de los plásmidos pALK1434 y pALK1435 se aislaron de la estructura vectorial después de digestión con *EcoRI* y se transformaron en protoplastos A47 de *T. reesei*. Las transformaciones se realizaron como se describe en Penttilä *et al.* (1987) con las modificaciones descritas en Karhunen *et al.* (1993) seleccionando con acetamida como la única fuente de nitrógeno. Los transformantes se purificaron en placas de selección a través de conidios sencillos antes de esporularlos en PD (Agar con Dextrosa de Patata).

La producción 20K+CBD de los transformantes se analizó a partir del sobrenadante de cultivo de los cultivos en matraz agitador (50 ml). Los transformantes se cultivaron durante 7 días en un medio inductor de celulasa complejo (Joutsjoki *et al.* 1993) tamponado con KH_2PO_4 al 5 % a un pH de 5,5. La actividad enzimática de la proteína de fusión se midió como la liberación de azúcares reductores de carboximetilcelulosa (CMC al 3 %) a 50 °C en tampón Hepes 50 mM, pH 7,0 durante 10 min (actividad NCU; kcat; Bailey y Nevalainen, 1981; Haakana *et al.*, 2004). Las actividades NCU de los mejores transformantes de producción se presentan en la Tabla 4. Los genotipos de los transformantes seleccionados se confirmaron usando transferencias de Southern, en las que se incluyeron diversas digestiones genómicas y el casete de expresión respectivo se usó como una sonda. La proteína 20K+CBD se detectó a partir del sobrenadante de cultivo usando los anticuerpos policlonales suscitados contra la celulasa neutra 20K purificada de *Melanocarpus albomyces* (Haakana *et al.* 2004) y el sistema AP de transferencia de Western ProtoBlot (Promega). Los análisis de transferencia de Western mostraron que las enzimas de fusión 20K+CBD se produjeron principalmente como proteínas de fusión estables en *T. reesei*.

Tabla 4. Actividades NCU de los transformantes 20K+CBD seleccionados a partir de cultivos en matraz agitador

Transformante	Nº de construcción	Número RF	Actividad de la celulasa neutra, NCU/ml	Fenotipo de la celulasa endógena
A47/pALK1434/nº 20	nº 1	RF5580	3278	CBHI-
A47/pALK1434/nº 23	nº 1	RF5581	2091	(CBHI+)
A47/pALK1434/nº 37	nº 1	RF5582	2330	CBHI-
A47/pALK1435/nº 3	nº 2	RF5583	3624	CBHI-
A47/pALK1435/nº 7	nº 2	RF5584	3211	CBHI-
A47/pALK1435/nº 11	nº 2	RF5585	1172	(CBHI+)
A47/pALK1435/nº 14	nº 2	RF5586	3152	CBHI

En la Tabla 4, el número de construcción se refiere al de la Tabla 1; el número RF se refiere a que los transformantes se denominaron como cepas RF.

El posible direccionamiento del casete de expresión hacia el locus *cbh1* (*cel7A*) se identificó como un fenotipo CBHI negativo por transferencia de Western. La detección de la proteína CBHI se realizó usando los anticuerpos monoclonales CI-258 o CI-261 (Aho *et al.*, 1991) y el sistema AP de transferencia de Western ProtoBlot (Promega, USA). Los genotipos de los transformantes seleccionados se confirmaron usando transferencias de Southern, en las que se incluyeron diversas digestiones genómicas y como sonda se usó el casete de expresión respectivo.

Los casetes de expresión lineales de 8,7 kb de los plásmidos pALK1768, pALK1769, pALK1770 y pALK1775 preparados en el Ejemplo 1 se aislaron de la estructura vectorial después de digestión con *EcoRI* y se transformaron en protoplastos RF5796 y RF5798 de *T. reesei* (originándose ambas cepas de la cepa QM6a (Bailey y Nevalainen, 1981) y teniendo el fenotipo CBHI- CBHII- EGI- EGII- para las celulasas endógenas de *T. reesei*) seleccionando con acetamida como la única fuente de nitrógeno. Los transformantes se purificaron en placas de selección a través de conidios sencillos antes de su esporulación sobre PD.

La producción de 20K+CBD de los transformantes se analizó a partir de los sobrenadantes de cultivo de los cultivos en matraz agitador (50 ml). Los transformantes se cultivaron durante 7 días en un medio inductor de celulasa complejo (Joutsjoki *et al.* 1993) tamponado con KH_2PO_4 al 5 % a pH 5,5. La actividad NCU de las proteínas de fusión 20K+CBD producidas se ensayó después como se ha descrito anteriormente. Las actividades NCU de los transformantes seleccionados se presentan en la Tabla 5. Los genotipos de los transformantes seleccionados se confirmaron usando transferencias de Southern, en las que se incluyeron diversas digestiones genómicas y como sonda se usó el casete de expresión respectivo. La proteína 20K+CBD se detectó de los sobrenadantes de cultivo usando anticuerpos policlonales suscitados contra la celulasa neutra 20K purificada de *M. albomyces* (Haakana *et al.* 2004) y el sistema AP de transferencia de Western ProtoBlot (Promega, USA). El análisis de transferencia de Western mostró que los transformantes produjeron la enzima de fusión 20K+CBD. Algunos cultivos también mostraron una banda que reaccionaba con el antisero anti-20K y que tenía la movilidad de la proteína 20K de tipo silvestre, indicando que posiblemente se había producido alguna escisión del engarce+CBD durante el cultivo. La proteína de fusión 20K+CBD producida por los transformantes pALK1770 se seleccionó para estudios posteriores debido a su estabilidad.

Tabla 5. Actividades NCU de los transformantes 20K+CBD seleccionados a partir de cultivos en matraz agitador

Transformante	Nº de construcción	Número RF	Actividad celulasa neutra, NCU/ml
RF5796/pALK1768/nº 6	nº 3	RF5966	3622
RF5796/pALK1768/nº 7	nº 3	RF5967	1316
RF5796/pALK1768/nº 9	nº 3	RF6035	6605
RF5798/pALK1768/nº 11	nº 3	RF5970	1525
RF5798/pALK1768/nº 17	nº 3	RF5971	2885
RF5798/pALK1768/nº 20	nº 3	RF5972	2598
RF5796/pALK 1769/nº 7	nº 4	RF5968	4344
RF5796/pALK1769/nº 10	nº 4	RF5969	4858
RF5796/pALK1769/nº 11	nº 4	RF6036	6145
RF5798/pALK1769/nº 4	nº 4	RF5973	4505
RF5798/pALK1769/nº 8	nº 4	RF5974	4895
RF5796/pALK 1770/nº 13	nº 5	RF5975	3073
RF5796/pALK1770/nº 17	nº 5	RF5976	2256
RF5796/pALK1770/nº 22	nº 5	RF5977	2107
RF5798/pALK1770/nº 10	nº 5	RF5978	1907
RF5798/pALK 1770/nº 14	nº 5	RF5979	3661

Transformante	Nº de construcción	Número RF	Actividad celulasa neutra, NCU/ml
RF5796/pALK1775/nº 8	nº 6	RF6078	2431
RF5796/pALK1775/nº 13	nº 6	RF6078	3505
RF5796/pALK1775/nº 21	nº 6	RF6080	2541
RF5798/pALK1775/nº 22	nº 6	RF6081	1697
RF5798/pALK1775/nº 29	nº 6	RF6082	3096

En la Tabla 5, el número de construcción se refiere al de la Tabla 1; el número RF se refiere a que los transformantes se denominaron como cepas RF.

- 5 Las cepas de *T. reesei* RF5582, RF5583, RF6036, RF5977 y RF5978 se cultivaron en un biorreactor para ensayos de aplicación. Algunas preparaciones se trataron con calor (pH 6,0, 65 °C, 60 – 70 min) para inactivar cualquier actividad enzimática endógena remanente de *T. reesei*. La 20K+CBD es relativamente termoestable (Miettinen-Oinonen *et al.* 2004), y no se desnaturaliza durante el tratamiento.

EJEMPLO 3. Producción de las proteínas de fusión 20K + CBD mutantes por afinidad en *T. reesei*

- 10 La enzima 20K de *Melanocarpus albomyces* (cel45A, AC Nº AJ515703) se fusionó con el dominio de unión a celulosa (CBD) de CBHI de *Trichoderma reesei*, en el que los restos de tirosina conservados en las posiciones 31 (correspondiente a Y492 del polipéptido maduro) y/o 32 (correspondiente a Y493 del polipéptido maduro) se mutaron a alanina como describen Linder *et al.*, 1995. Además, el resto de tirosina en la posición 31 se reemplazó por triptófano, un aminoácido encontrado de forma natural en la región CBD de, por ejemplo, CBHI de *Humicola grisea* (Azevedo *et al.*, 1990) y EGV de *T. reesei* (Cel45A, Saloheimo *et al.*, 1994). Los CBD mutados se construyeron por
- 15 PCR, y las sustituciones de aminoácidos de Y31A, Y32A, Y31W e Y31A_Y32A se incluyeron en el dominio de unión a celulosa de CBHI de *T. reesei* (numeración de acuerdo con la secuencia de aminoácidos del CBD). En todas las construcciones se usó el cebador director: 3_BamMly: 5'-TAGGATCCGAGTCCCATTACCGCAACCCTAGCG-3' (SEC ID. Nº: 18). Los cebadores inversos usados para la amplificación de los diferentes productos del CBD_{mut} se describen en la Tabla 6. Las mezclas de reacción de la PCR contenían tampón de reacción 1x PfuUltra™ HF
- 20 (Stratagene, USA) proporcionando una concentración de Mg²⁺ 2 mM, dNTP 0,2 mM, 2 µM de cada cebador y 1,5 unidades de ADN polimerasa PfuUltra™ HF (Stratagene, Estados Unidos) y aproximadamente 45 ng del plásmido pALK492 como molde. El plásmido pALK492 (Fig. 2) contiene el gen *cbh1* de *T. reesei*. Las condiciones para las reacciones de la PCR fueron las siguientes: desnaturalización inicial durante 2 min a 95 °C, seguido de 30 ciclos de 1 min a 95 °C, hibridación durante 1 min. a 65 °C (gradiente ±5 °C), extensión durante 2 min. a 72 °C y una
- 25 extensión final a 72 °C durante 10 min.

Tabla 6. Cebadores inversos de la PCR diseñados para amplificar productos CBD mutados

Cebador	Longitud (nucleótidos)	Secuencia, inversa	Sustitución de aminoácidos	Secuencia ID N°
XhoAge_ Y31A	69	5'-TGACTCGAGACCGGTGCGTCAGGCTTTCGCACGGAGCTTTACAGGCACTGAGAGTAGGCAGGGTTCAGG	Y31A	SEC ID N°: 27
XhoAge_ Y32A	69	5'-TGACTCGAGACCGGTGCGTCAGGCTTTCGCACGGAGCTTTACAGGCACTGAGAGGCGTAAGGGTTCAGG	Y32A	SEC ID N°: 28
XhoAge_ Y31W	69	5'-TGACTCGAGACCGGTGCGTCAGGCTTTCGCACGGAGCTTTACAGGCACTGAGAGTACCAAGGGTTCAGG	Y31W	SEC ID N°: 29
XhoAge_ Y31A- Y32A	69	5'-TGACTCGAGACCGGTGCGTCAGGCTTTCGCACGGAGCTTTACAGGCACTGAGAGGCGGCAGGGTTCAGG	Y31A_Y32A	SEC ID N°: 30

Todas las combinaciones de cebadores produjeron el fragmento de ADN específico en las reacciones de la PCR a una temperatura de hibridación de 60 °C. Los productos de la PCR se aislaron de estas reacciones, se sometieron a digestión con enzimas de restricción *XhoI* y *BamHI* y después se clonaron con pBluescript II KS+ (Stratagene, USA). Los plásmidos obtenidos se denominaron pALK1884 (mutación Y31A), pALK1885 (mutación Y32A), pALK1886 (mutación Y31W) y pALK1887 (mutaciones Y31A_Y32A). Los fragmentos de la PCR en los plásmidos se confirmaron por secuenciación. Los insertos digeridos con *MlyI* y *AgeI* de los plásmidos pALK1884 a pALK1887 se ligaron posteriormente a un fragmento vectorial pALK1760 digerido con *NruI* y *AgeI* que contenía el gen de 20K de longitud completa de *Melanocarpus albomyces* fusionado con el promotor *cbh1* (*cel7A*) y el terminador de *T. reesei*. La parte C terminal del gen 20K en pALK1760 se modificó de tal manera que el ligamiento del fragmento CBD produjo un punto de unión de PAVQIPSS (construcción nº 5), que se observó que daba como resultado un producto de fusión estable en *T. reesei* como se describe en los Ejemplos 1 y 2. En la etapa final, el marcador *amdS* se añadió como un fragmento *SpeI-EcoRI* de extremo romo (4,5 kb) del plásmido p3SR2 (Fig. 6) para obtener plásmidos de expresión de pALK1877 (mutación Y31A), pALK1878 (mutación Y32A), pALK1879 (mutación Y31W) y pALK1880 (mutación Y31A_Y32A) para la producción de enzimas de fusión 20K+CBD_{mut} en *T. reesei*. En la Fig. 11B se muestran las secuencias de aminoácidos de la proteína de fusión 20K con el péptido engarzador seguido por la región CBD mutada. Los plásmidos de expresión se confirmaron por secuenciación, y los casetes de expresión lineales de 8,4 kb (Fig. 11A) se aislaron de la estructura vectorial después de digestión con *NotI* y se transformaron en protoplastos RF5796 de *T. reesei*. Las transformaciones se realizaron en Penttilä *et al.* (1987) con las modificaciones descritas en Karhunen *et al.* (1993), seleccionando con acetamida como una única fuente de nitrógeno. Los transformantes se purificaron en placas de selección a través de conidios sencillos antes de esporularlos en PD.

La producción de 20K+CBD_{mut} de los transformantes se analizó del sobrenadante de cultivo de los cultivos en matraz agitador (50 ml). Los transformantes se cultivaron durante 7 días en un medio inductor de celulasa complejo (Joutsjoki *et al.* 1993) tamponado con KH₂PO₄ al 5 %, a pH 5,5. La actividad enzimática de la proteína de fusión se midió como la liberación de azúcares reductores de carboximetilcelulosa (CMC al 3 %) a 50 °C en tampón Hepes 50 mM, pH 7,0 durante 10 min (actividad NCU, nkat; Bailey y Nevalainen, 1981; Haakana *et al.*, 2004). Las actividades NCU de los transformantes de mejor producción se muestran en la Tabla 7. Los genotipos de los transformantes seleccionados se confirmaron usando transferencia de Southern, en las que se incluyeron diversas digestiones genómicas y como sonda se usó el casete de expresión respectivo. La proteína 20K+CBD_{mut} se detectó del sobrenadante de cultivo usando anticuerpos policlonales suscitados contra la celulasa neutra 20K purificada de *Melanocarpus albomyces* (Haakana *et al.* 2004) y el sistema AP de transferencia de Western ProtoBlot (Promega). El análisis de transferencia de Western mostró que las enzimas de fusión 20K+CBD_{mut} se produjeron como proteínas de fusión estables en *T. reesei*.

Tabla 7. Actividades NCU de los transformantes 20K+CBD_{mut} seleccionados a partir de cultivo en matraz agitador

Transformante	Sustitución de aminoácido	Número RF	Actividad celulasa neutra, NCU/ml
pALK1877/nº 26	Y31A	RF6084	3658
pALK1877/nº 34	Y31A	RF6085	2447
pALK1878/nº 02	Y32A	RF6086	3434
pALK1878/nº 13	Y32A	RF6088	2915
pALK1879/nº 13	Y31W	RF6090	2545
pALK1879/nº 24	Y31W	RF6091	3452
pALK1880/nº 06	Y31A_Y32A	RF6092	3415
pALK1880/nº 25	Y31A_Y32A	RF6094	2727

El número RF se refiere a que los transformantes se denominaron como cepas RF.

Las cepas RF6084 a RF6086, RF6088, RF6090 a RF6092 y RF6094 se fermentaron para obtener material para los ensayos de aplicación (véase los EJEMPLOS 9-11).

EJEMPLO 4. Producción de las proteínas de fusión 20K+CBD con delección de engarce en *T. reesei*.

La enzima de 20K de *Melanocarpus albomyces* se fusionó con el dominio de unión a celulosa (=CBD) de CBHI de *Trichoderma reesei*, que posteriormente se modificó introduciendo delecciones en el péptido de engarce interdominio. Las delecciones de engarce se diseñaron de acuerdo con Srisodsuk *et al.*, 1993. La delección de aminoácidos de la posición 434 a 444 (mutante ΔG-444) del polipéptido maduro elimina aproximadamente un tercio del engarce incluyendo la secuencia repetida rica en glicina y prolina pero dejando todos los supuestos sitios de O-glucosilación intactos. La delección de restos de la posición 434 a 460 (Mutante ΔG-460) elimina prácticamente todo el engarce

(Fig. 12A). También se construyeron delecciones de engarce 20K+CBD adicionales que tenían una mutación de afinidad doble de Y31A_Y32A en la región CBD.

Se realizaron reacciones PCR para introducir las delecciones al péptido engarzador, así como la sustitución de aminoácidos a la región CBD. Las amplificaciones PCR se realizaron como se describe en el Ejemplo 3, excepto que se utilizó una temperatura de hibridación de 60 °C (gradiente ± 5 °C). Se utilizaron los cebadores directos

5'-TAGGATCCGAGTCCCATTACCGGCAACCCTAGCACCACCACCCGCCGCCAGCC-3' (SEC ID N°: 31) y

5'-TAGGATCCGAGTCCCATTACCGGCAACCCTAGCCCTACCCAGTCTCACTACGGCCAGTGC-3' (SEC ID N°: 32) para sintetizar las delecciones de engarce de $\Delta G-444$ y $\Delta G-460$, respectivamente. Correspondientemente, se usó el cebador inverso 5'-TGA CTGAGACCGGTGCGTCAGGCTTTGCGACGGAGCTTTACAGG-3' (SEC ID N°: 33) para amplificar la región CBD intacta de la CBHI de *T. reesei*. La mutación Y31A_Y32A en la región CBD se generó con el cebador inverso

5'-TGA CTGAGACCGGTGCGTCAGGCTTTGCGACGGAGCTTTACAGGCACTGAGAGGCGGCAGGGTTCAGG-3' (SEC ID. N°: 30).

Todas las combinaciones de cebadores produjeron el fragmento de ADN específico en las reacciones de la PCR desde el intervalo de temperaturas de hibridación de 55,2 °C a 65,0 °C. Los plásmidos de expresión pALK1893 (delección $\Delta G-444$), pALK1896 (delección $\Delta G-460$), pALK1899 (delección $\Delta G-444$, mutación Y31A_Y32A) y pALK1952 (delección $\Delta G-460$, mutación Y31A_Y32A) se construyeron como se describe en el Ejemplo 3. En la Fig. 12 se muestran las secuencias de aminoácidos de la fusión de la proteína 20K con el péptido de engarce truncado seguido por el CBD intacto o mutado. Se aislaron los casetes de expresión lineales de 8,3 kb de la estructura vectorial después de digestión con *EcoRI* y se transformaron en protoplastos RF5796 de *T. reesei*. La transformación, la purificación de transformantes, los cultivos en matraz agitador, las mediciones de actividad, las hibridaciones de transferencia de Southern y los análisis de transferencia de Western se realizaron como se describe en el Ejemplo 3.

Tabla 8. Actividades NCU de los transformantes seleccionados 20K+CBD con delección de engarce a partir de cultivo en matraz agitador

Transformante	Delección de engarce/ Sustitución de aminoácidos	Número RF	Actividad celulasa neutra, NCU/ml
pALK1893/n° 08	$\Delta G-444$	RF6107	1182
pALK1893/n° 10	$\Delta G-444$	RF6108	2058
pALK1896/n° 05	$\Delta G-460$	RF6110	2576
pALK1896/n° 07	$\Delta G-460$	RF6111	2628
pALK1899/n° 07	$\Delta G-444$, Y31a_Y32A	RF6112	1947
pALK1899/n° 20	$\Delta G-444$, Y31a_Y32A	RF6114	2462
pALK 1952/n° 01	$\Delta G-460$, Y31a_Y32A	RF6115	2428
pALK1952/n° 17	$\Delta G-460$, Y31a_Y32A	RF6116	1738

El número RF se refiere a que los transformantes se denominaron como cepas RF.

Las cepas seleccionadas RF6107, RF6108, RF6110 a RF6112 y RF6114 a RF6116 se fermentaron para obtener material para los ensayos de aplicación (Ejemplos 9 a 11). Los análisis de transferencia de Western mostraron que las enzimas fusión 20K+CBD con delección de engarce se produjeron como proteínas de fusión estables en *T. reesei*.

EJEMPLO 5. Producción de la proteína de fusión 50K+CBD recombinante de *Melanocarpus albomyces* en *T. reesei* (Referencia)

Se diseñaron construcciones de plásmidos para unir la secuencia codificante de 50K (*cel7A*, AC n° AJ515704) de *Melanocarpus albomyces* con la región de engarce y el dominio de unión a celulosa (CBD) de la CBHI de *T. reesei* (*cel7A*, AC n° AR088330; Srisodsuk *et al.* 1993). El plásmido pALK1237 (Fig. 4), que es una base para las nuevas

construcciones, contenía el gen *cel7A* bajo el control del promotor *cbh1* de *T. reesei* como una fusión exacta.

En primer lugar, se introdujo un solo sitio de restricción *NruI* cerca del extremo C de la secuencia codificante 50K. Esto permite la fusión directa de cualquier ADN con extremo romo después del aminoácido S393 del polipéptido 50K maduro (Fig. 13B). Se realizó una reacción de PCR con los cebadores 2_50K_NruISpel (5' CGGCACTAGTTCGCGACCCGATCTCGCCCCAGCGCAGG 3'; SEC ID N°: 25) y 50K_XhoI (5' CGCCGAGGGCCGGCTCGAGAGCATCC 3'; SEC ID N°: 26) usando como molde pALK1237. La reacción de la PCR contenía el tampón de reacción 1x DyNAzyme™ EXT (Finnzymes, Finlandia), dNTP 0,25 mM, 0,5 µM de cada cebador, 2,0 unidades de ADN polimerasa DyNAzyme™ EXT (Finnzymes, Finlandia) y aproximadamente 50 ng/100 µl de ADN molde pALK1237. Las condiciones para la amplificación de la PCR fueron las siguientes: desnaturalización inicial durante 5 min. a 96 °C, seguido de 25 ciclos de hibridación durante 15 s a 96 °C, durante 60 s a 56 °C o 61 °C, extensión durante 60 s a 72 °C, y una extensión final a 72 °C durante 10 min. El producto de la PCR se sometió a digestión con las enzimas de restricción *XhoI* y *SpeI* y se purificó del gel de agarosa. El fragmento de la PCR purificado se ligó en el fragmento de restricción de 6,9 kb de *XhoI-SpeI* del plásmido pALK1237 y se transformó en *E. coli* XL1-Blue (Stratagene, USA). El ADN plasmídico se aisló de los transformantes y se verificaron tres candidatos por secuenciación. El clon seleccionado se denominó pALK1703.

El engarce+CBD de CBHI de *T. reesei* se amplificó por PCR con los cebadores 3_BamMly_50 (5' TTGGATCCGAGTCGCGACCCGCAACCCTAGCG 3'; SEC ID N°: 36) y XhoAge (5' TGAATCGAGACCGGTGCGTCAGGCTTTTCGC 3'; SEC ID N°: 15) usando, como molde, pALK492. Las condiciones de reacción de la PCR fueron como se ha descrito anteriormente, excepto que el tiempo de extensión en la reacción de amplificación fue de 90 s. El producto de la PCR se sometió a digestión con las enzimas *MlyI* y *AgeI* y se purificó del gel de agarosa. El fragmento de la PCR que contenía el engarce+CBD se ligó en el fragmento de restricción de 6,8 kb de *AgeI-NruI* de pALK1703 y se transformó en *E. coli* XL1-Blue (Stratagene, Estados Unidos). Los transformantes se analizaron como se ha descrito anteriormente y un clon adecuado se denominó pALK1704.

Para permitir la selección de los transformantes de *T. reesei*, se insertó el gen marcador *amdS* y la región 3' flanqueante *cbh1* de *T. reesei* en el plásmido vectorial pALK1704. Se aisló un fragmento de restricción de 4,8 kb de *EcoRI-SpeI* de pALK424 (documento US 5.837.515) y los extremos del fragmento se rellenaron con la enzima Klenow. El fragmento del marcador *amdS* con extremo romo se ligó en el pALK1704 digerido con *StuI* y se transformó en *E. coli* XL1-Blue (Stratagene, Estados Unidos). El ADN plasmídico se aisló de los transformantes y la orientación deseada del inserto se verificó por enzimas de restricción. El transformante seleccionado se denominó pALK1708.

Se aisló un casete de expresión lineal de 9,2 kb (Fig. 13A) de la estructura pALK1708 por digestión con *EcoRI*, se transformó en protoplastos RF5636 de *T. reesei* (derivado de la cepa QM6a; Bailey y Nevalainen, 1981) y los transformantes se seleccionaron con acetamida como única fuente de nitrógeno. La cepa hospedadora carecía de tres celulasas principales endógenas: CBHI (Cel6A), EGI (Cel7B) y EGII (Cel5A). La transformación se realizó de acuerdo con Penttilä *et al.* (1987) con las modificaciones descritas por Karhunen *et al.* (1993). Los transformantes se purificaron en placas de selección a través de conidios sencillos antes de esporularlos en PD.

Se analizó la producción de la proteína de fusión 50K+CBD de los transformantes del sobrenadante de cultivo de cultivos en matraz agitador (50 ml). Los transformantes se cultivaron durante 7 días en un medio inductor de celulosa complejo (Joutsjoki *et al.* 1993) tamponado con KH₂PO₄ al 5 % a pH 5,5. La actividad enzimática de la proteína de fusión se midió como la liberación de azúcares reductores de carboximetilcelulosa (CMC al 3 %) a 50 °C en tampón Hepes 50 mM, pH 7,0 (actividad NCU; Bailey y Nevalainen 1981; Haakana *et al.* 2004). La actividad de los transformantes varió de 2035 a 3633 NCU/ml. La proteína 50K+CBD se detectó del sobrenadante de cultivo por el sistema AP de transferencia de Western ProtoBlot (Promega) usando anticuerpos policlonales suscitados contra la celulasa neutra 50K purificada de *Melanocarpus albomyces* (Haakana *et al.* 2004). El análisis de transferencia de Western mostró que la proteína de fusión 50K+CBD producida de *T. reesei* es estable. Se analizaron los genotipos de los transformantes seleccionados por transferencia de Southern usando, como sonda, el casete de expresión. El posible direccionamiento del casete de expresión del locus *cbh1* también se verificó por transferencia de Western usando anticuerpos monoclonales CBHI (CI-261, Aho *et al.* 1991) para detectar la proteína CBHI.

EJEMPLO 6. Producción de la proteína de fusión 50KB+CBD recombinante de *Melanocarpus albomyces* en *T. reesei* (Referencia).

Se diseñaron las construcciones de plásmidos para unir la secuencia codificante 50KB de *Melanocarpus albomyces* (*cel7B*, AC n° AJ515705) con la región de engarce y el dominio de unión a celulosa (CBD) de CBHI de *T. reesei* (*cel7A*, AC n° AR088330; Srisodsuk *et al.* 1993). El plásmido pALK1241 (Fig. 5), que es una base para las nuevas construcciones, contenía el gen *cel7B* bajo el control del promotor *cbh1* de *T. reesei* como una fusión exacta.

En primer lugar, se introdujo un único sitio de restricción *NruI* cerca del extremo C de la secuencia codificante 50KB. Esto permite la fusión directa de cualquier ADN con extremo romo después del aminoácido S426 del polipéptido 50KB maduro (Fig. 14B). Se realizó una reacción de PCR con los cebadores 50KB_NruIXhoI (5' TCGTCTCGAGTCGCGATGGGGCCGAAGCGGATGTTGG 3'; SEC ID N°: 23) y 50KB_SphI (5' GGAGGGCATGCCAACAGCAGCGAGATCACC 3'; SEC ID N°: 24) usando, como molde, pALK1241. La reacción

de la PCR contenía tampón de reacción 1x DyNAzyme™ EXT (Finnzymes, Finlandia), dNTP 0,25 mM, 0,5 µM de cada cebador, 2,0 unidades de ADN polimerasa DyNAzyme™ EXT (Finnzymes, Finlandia) y aproximadamente 50 ng/100 µl de ADN molde pALK1241. Las condiciones para la amplificación de la PCR fueron las siguientes: desnaturalización inicial durante 5 min. a 96 °C, seguido de 25 ciclos de hibridación durante 15 s a 96 °C, durante 60 s de hibridación a 56 °C o 60 °C, extensión durante 60 s a 72 °C, y una extensión final a 72 °C durante 5 min. El producto de la PCR se sometió a digestión con las enzimas de restricción *XhoI* y *SphI* y se purificó del gel de agarosa. El fragmento de la PCR purificado se ligó en el fragmento de restricción de 6,9 kb de *XhoI-SphI* del plásmido pALK1241 y se transformó en *E. coli* XL1-Blue (Stratagene, USA). El ADN plasmídico se aisló de los transformantes y se verificó un candidato por secuenciación. El clon seleccionado se denominó pALK1705.

El engarce+CBD de CBHI de *T. reesei* se amplificó por PCR con los cebadores 3_BamMly_50 (5' TTGGATCCGAGTCGCAGCACCGGCAACCCTAGCG 3'; SEC ID. N°: 18) y XhoAge (5' TGACTCGAGACCGGTGCGTCAGGCTTTTCGC 3'; 15) usando, como molde, pALK492. Las condiciones de reacción de la PCR fueron como se ha descrito anteriormente, excepto que el tiempo de extensión en la reacción de amplificación fue de 90 s. El producto de la PCR se sometió a digestión con las enzimas *MlyI* y *AgeI* y se purificó del gel de agarosa. El fragmento de la PCR que contenía el engarce+CBD se ligó en el fragmento de restricción de 7,2 kb de *AgeI-NruI* de pALK1705 y se transformó en *E. coli* XL1-Blue (Stratagene, Estados Unidos). Los transformantes se analizaron como se ha descrito anteriormente y un clon adecuado se denominó pALK1706.

Para permitir la selección de transformantes de *T. reesei*, el gen marcador *amdS* y la región 3' flanqueante *cbhI* de *T. reesei* se insertaron en el plásmido vectorial pALK1706. Se aisló un fragmento de restricción de 4,8 kb de *EcoRI-SpeI* de pALK424 (documento US 5.837.515) y los extremos del fragmento se rellenaron con la enzima Klenow. El fragmento marcador *amdS* con extremo romo se ligó en el pALK1706 digerido con *StuI* y se transformó en *E. coli* XL1-Blue (Stratagene, USA). El ADN plasmídico se aisló de los transformantes y la orientación deseada del inserto se verificó por digestión con enzimas de restricción. El transformante seleccionado se denominó pALK1709.

Se aisló un casete de expresión lineal de 9,6 kb (Fig. 14A) de la estructura pALK1709 por digestión con *EcoRI*, se transformó en protoplastos RF5636 de *T. reesei* y se seleccionaron transformantes con acetamida como única fuente de nitrógeno. La cepa hospedadora carecía de tres celulasas endógenas principales: CBHI (Cel6A), EGI (Cel7B) y EGII (Cel5A). La transformación se realizó de acuerdo con Penttilä *et al.* (1987) con modificaciones descritas por Karhunen *et al.* (1993). Los transformantes se purificaron en placas de selección a través de conidios sencillos antes de esporularlos en PD.

Se analizó la producción de la proteína de fusión 50K+CBD de los transformantes del sobrenadante de cultivo de cultivos en matraz agitador (50 ml). Los transformantes se cultivaron durante 7 días en un medio inductor de celulosa complejo (Joutsjoki *et al.* 1993) tamponado con KH₂PO₄ al 5 % a pH 5,5. La actividad celobiohidrolasa de la proteína de fusión se midió usando el sustrato 4-metilumbeliferil-β-D-lactósido (actividad MUL; van Tilbeurgh *et al.* 1988). Se detectó la proteína 50KB+CBD del sobrenadante de cultivo por el sistema AP de transferencia de Western ProtoBlot (Promega) usando anticuerpos policlonales suscitados contra la celulasa 50KB purificada de *Melanocarpus albomyces* (Haakana *et al.* 2004). En el análisis de transferencia de Western no se detectó la proteína de 50KB de tipo silvestre lo que mostraba que la proteína de fusión 50KB+CBD producida de *T. reesei* es estable. Se analizaron los genotipos de los transformantes seleccionados por transferencia de Southern usando, como sonda, el casete de expresión. El posible direccionamiento del casete de expresión al locus *cbhI* también se verificó por transferencia de Western usando anticuerpos monoclonales CBHI (CI-261, Aho *et al.* 1991) para detectar la proteína CBHI.

EJEMPLO 7. Producción de las proteínas de fusión CBHI+CBD recombinantes de *Thermoascus aurantiacus* en *T. reesei* (Referencia)

La CBHI de *Thermoascus aurantiacus* (AC N° AF478686, Hong *et al.*, 2003; SEC ID N°: 9) se fusionó con el engarce y el CBD de la CBHI de *Trichoderma reesei* (AC N° AR088330, Srisodsuk *et al.* 1993; SEC ID N°: 3). Primero, la secuencia codificante del engarce y el CBD de la CBHI de *T. reesei* se sintetizó por PCR usando los siguientes cebadores:

5'-TTAAACATATGTTATCTACTCCAACATCAAGGTCGGACCCATTGGCAGCACCGGCAACCCTAGCGGC-3' (secuencia directa, SEC ID N°: 34) y

5'-TATATGCGGCCGACCGGTGCGTCAGGCTTTTCGCACGGAGCTTTACAGGC-3 (secuencia inversa, SEC ID N°: 35).

La mezcla de la reacción de la PCR contenía tampón de reacción 1x DyNAzyme™ EXT (Finnzymes, Finlandia), Mg²⁺ 15 mM, dNTP 0,2 mM, 2 µM de cada cebador, 0,6 unidades de ADN polimerasa DyNAzyme™ EXT (Finnzymes, Finlandia), y aproximadamente 75 ng/30 µl del molde pALK492. El plásmido pALK492 contiene el gen *cbh1* (*cel7A*) de *T. reesei*. Las condiciones para la reacción de la PCR fueron las siguientes: desnaturalización inicial durante 2 min, a 98 °C, seguido de 30 ciclos de hibridación durante 30 s a 98 °C, durante 30 s a 68 °C (gradiente ±4 °C), extensión durante 30 s a 72 °C y una extensión final a 72 °C durante 10 min. El fragmento de ADN específico en

la reacción de la PCR se obtuvo a un intervalo de temperatura de hibridación de 64 °C a 68,5 °C. El fragmento CBD sintetizado, que contiene también la secuencia de nucleótidos 3'-terminal del gen *cbh1* de *Thermoascus aurantiacus*, se sometió a digestión con las enzimas de restricción *NdeI* y *NotI* y el fragmento se aisló del gel de agarosa después de electroforesis. Después de esto, el fragmento de la PCR aislado se ligó con el fragmento del vector pALK1649 (Fig. 7) digerido con *NdeI* y *NotI* que contenía el gen *cbh1* de longitud completa de *Thermoascus aurantiacus*. El plásmido obtenido se denominó pALK1888, y el fragmento amplificado por PCR en el plásmido se confirmó por secuenciación. Como resultado de la fusión, la parte C-terminal de la CBHI de *Thermoascus aurantiacus* en el plásmido pALK1888 contenía un punto de unión de GPIGST (Fig. 15B). El inserto sometido a digestión con *SacII* y *AgeI* del pALK1888 plasmídico se ligó con el fragmento del vector pALK1694 (Fig. 8) sometido a digestión con *SacII* y *AgeI*, lo que produjo la fusión de CBHI+CBD de *Thermoascus aurantiacus* con el promotor *cbh1* (*cel7A*) de *T. reesei* (una fusión exacta) y con el terminador. En la etapa final, se añadió el fragmento marcador *amdS*, como se describe en el Ejemplo 3, para obtener el plásmido de expresión de pALK1890 para la producción de la enzima de fusión CBHI+CBD recombinante de *Thermoascus aurantiacus* en *T. reesei*. La secuencia de aminoácidos de la fusión de la proteína CBHI de *Thermoascus aurantiacus* con el péptido engarzador seguido de la región CBD de la CBHI de *T. reesei* se muestra en la Fig. 15B.

El plásmido de expresión se confirmó por digestiones con enzimas de restricción, y el casete de expresión lineal de 8,9 kb (Fig. 15A) se aisló de la estructura vectorial después de digestión con *NotI* y se transformó en protoplastos RF5796 de *T. reesei*. Las transformaciones se realizaron como en Penttilä *et al.* (1987) con las modificaciones descritas en Karhunen *et al.* (1993). Los transformantes se purificaron en placas de selección a través de conidios sencillos antes de esporularlos en PD.

La producción de CBHI+CBD de *Thermoascus aurantiacus* de los transformantes se analizó del sobrenadante de cultivo de los cultivos en matraz agitador (50 ml). Los transformantes se cultivaron durante 7 días en un medio inductor celulasa complejo (Joutsjoki *et al.* 1993) tamponado con KH_2PO_4 al 5 % a pH 5,5. La actividad celobiohidrolasa se ensayó usando el sustrato 4-metilumbeliferil- β -D-lactósido (MUL) de acuerdo con van Tilbeurgh *et al.* 1988. Los genotipos de los transformantes seleccionados se confirmaron usando transferencias de Southern en las que se incluyeron diversas digestiones genómicas y como sonda se usó el casete de expresión. Los análisis SDS-PAGE mostraron que la enzima CBHI+CBD recombinante de *Thermoascus aurantiacus* se produjo como una proteína de fusión estable en *T. reesei*.

EJEMPLO 8. Rendimiento de las preparaciones de la proteína de fusión 20K+CBD en bioacabado/biolavado a la piedra de tela vaquera

Las proteínas de fusión 20K + CBD producidas, como se describe en el Ejemplo 2, usando *Trichoderma* como hospedador, se sometieron a ensayo para determinar su capacidad en el biolavado a la piedra de tela vaquera para crear un aspecto desgastado similar al proporcionado por la piedra pómez. Para realizar la comparativa se utilizó una preparación comercial de 20K eficaz en el acabado de tela vaquera.

Como material de ensayo se utilizaron vaqueros ingleses confeccionados con tela vaquera teñida con Índigo con fondos de azufre después de eliminar el apresto con alfa-amilasa ECOSTONE® A200. Los hilos de urdimbre y trama del tejido se hilaron en anillo. Los tratamientos con celulasa se realizaron con la lavadora extractora Wascator FOM 71 CLS de Electrolux en las condiciones descritas en la Tabla 9.

Tabla 9. Condiciones de ensayo utilizadas para los tratamientos con celulasa

Parámetro del proceso	
Carga de tela vaquera	1,3 kg
Agua	19 l
Tampón/control de pH (pH 6,5)	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 31,6 g Ácido cítrico 10,5 mg
Tiempo	55 min
Temperatura	60 °C
Dosificación de celulasa	250 – 3000 NCU/g tejido

Las enzimas se dosificaron como unidades de actividad de celulasa neutra (NCU) por peso de tejido. La enzima celulasa se inactivó después de escurrir elevando el pH por encima de 11 añadiendo 5 g de NaOH (10 min, 40 °C) y aclarando tres veces. Los vaqueros se secaron en una secadora. En cada ensayo se utilizaron dos pares de vaqueros.

El nivel de efecto/abrasión con el biolavado a la piedra se evaluó midiendo el color como valores de reflectancia con un espectrofotómetro Minolta CM 2500 o CM 1000 usando las coordenadas de espacio de color $L^*a^*b^*$ (iluminante D65/2°). El color de la tela vaquera del anverso y del reverso (datos no mostrados) se midió después del eliminar el

- 5 apresto (es decir, antes del tratamiento con la celulasa) y después del tratamiento con la celulasa. Cada medición fue el promedio de aproximadamente 40 mediciones. Se utilizaron dos pares de vaqueros en cada ensayo y el resultado final es el promedio de ellos. La luminosidad o aumento de luminosidad después del tratamiento enzimático se usó para evaluar el efecto de abrasión (rendimiento o efecto de biolavado a la piedra). Los resultados se muestran en las Tablas 10 y 11, en las que los datos en negrita se usan para para destacar niveles de abrasión similares y dosificaciones equivalentes. Se utilizaron tratamientos con 20K o sin enzima para realizar comparativas. Algunas de las preparaciones (Tabla 11) se habían tratado con calor (pH 6,0, a 65 °C, durante 60 a 70 min) para inactivar cualquier reactividad enzimática endógena remanente de *T. reesei* y/o para ensayar el efecto del tratamiento con calor sobre la estabilidad de la enzima.

Tabla 10. Mediciones de color del anverso de tela vaquera tratada con las proteínas de fusión 20K+CBD

Cepa N°	Enzima	NCU/g tejido	Antes del tratamiento con celulasa		Después del tratamiento con celulasa		Aumento de L*
			L*	b*	L*	b*	
-	Sin enzima	0	16,77	-9,95	18,18	-12,39	1,42
-	20K ¹	3000	16,80	-9,70	24,00	-14,71	7,20
-	20K ¹	1500	16,73	-10,05	22,98	-14,62	6,25
RF6036	20K + CBD	500	16,41	-10,14	22,80	-14,19	6,40
RF5977	20K + CBD	250	16,68	-9,91	22,81	-14,47	6,13
RF5977	20K + CBD	500	16,73	-10,01	24,07	-14,70	7,34
RF5977	20K + CBD	1500	16,71	-9,68	25,63	-14,79	8,93

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

¹Preparación comercial

Tabla 11. Mediciones de color del anverso de la tela vaquera tratada con las proteínas de fusión 20K+CBD tratadas con calor

Cepa Nº	Enzima	NCU/g tejido	Antes del tratamiento con celulasa		Después del tratamiento con celulasa		Aumento de L*
			L*	b*	L*	b*	
-	Sin enzima	0	16,77	-9,95	18,18	-12,39	1,42
-	20K ¹ (no tratada con calor)	3000	16,80	-9,70	24,00	-14,71	7,20
-	20K ¹ (no tratada con calor)	1500	16,73	-10,05	22,98	-14,62	6,25
RF5206	20K CBHI-	3000	16,80	-10,00	22,61	-14,59	5,81
RF5582	20K+CBD construcción nº 1, CBHI-	3000	16,83	-10,01	26,39	-15,13	9,56
RF5582	20K+CBD- construcción nº 1, CBHI-	1000	16,61	-9,76	23,98	-14,98	7,37
RF5582	20K+CBD- construcción nº 1, CBHI-	500	16,70	-9,93	22,75	-14,75	6,05
RF5583	20K+CBD- construcción nº 2, CBHI-	3000	16,73	-9,98	24,78	-14,95	8,05
RF5583	20K+CBD- construcción nº 2, CBHI-	1000	16,92	-9,92	22,73	-14,75	5,81
RF5583	20K+CBD- construcción nº 2, CBHI-	500	16,62	-10,03	21,76	-14,37	5,14
RF5977	20K+CBD- construcción nº 5, ²	500	16,56	-9,77	23,00	-14,55	6,45

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

¹Preparación comercial, ² CBHI-, CBHII-, EGI-, EGII-

Los resultados indicados en la Tabla 10 y en la Fig. 16 muestran que el rendimiento de lavado de las proteínas de fusión 20K+CBD de la invención en el tratamiento de tela vaquera mejoró enormemente en comparación con las cepas 20K. Con la cepa RF5977 podía usarse una dosificación enzimática tan baja como 250 NCU/g tejido para obtener un nivel de abrasión similar (luminosidad L*) en comparación con el obtenido con la dosificación de 1500 NCU/g de 20K. Por tanto se obtuvo un rendimiento de lavado 6 veces mejor y el contraste fue bueno. Además el rendimiento del lavado obtenido con la cepa RF5978 fue similar al obtenido con RF5977.

El tratamiento con calor de las preparaciones de la proteína de fusión parecieron disminuir algo el efecto de lavado a la piedra, por ejemplo, con la cepa RF5977 se necesitó una dosificación de 500 NCU/g de tejido para obtener el mismo nivel de abrasión al obtenido con la dosificación de 250 NCU/g de la preparación enzimática no tratada con calor (Tabla 10). Sin embargo, se consiguió una mejora triplicada en el resultado del lavado en comparación con una preparación de la técnica anterior.

EJEMPLO 9. Rendimiento de las preparaciones de proteína de fusión 20K+ CBD mutante por afinidad y proteína de fusión 20K+CBD con delección de engarce en bioacabado/biolavado a la piedra de tela vaquera.

Las enzimas de fusión 20K + CBD mutante por afinidad producidas usando *Trichoderma* como hospedador descritas en el Ejemplo 3 y las proteínas de fusión 20K + CBD con delección de engarce producidas usando *Trichoderma* como hospedador, como se describe en el Ejemplo 4, se sometieron a ensayo para determinar su capacidad en el biolavado a la piedra de tela vaquera. Para realizar la comparativa se utilizó una preparación comercial de 20K eficaz en el acabado de tela vaquera.

La tela vaquera y los sistemas de ensayo para el biolavado a la piedra fueron como se indica en el Ejemplo 8. Además el efecto del tratamiento con celulasa se evaluó como en el Ejemplo 8. Los resultados del ensayo del biolavado a la piedra de las preparaciones de la proteína de fusión 20K+CBD mutante por afinidad y de la proteína de fusión 20K+CBD con delección de engarce se muestran en la Tabla 12.

La cepa RF6090 con la sustitución de aminoácido Y31W mostró excelente rendimiento de lavado (aproximadamente 6 veces mejor que con 20K) y buen contraste. La eficacia de la cepa RF6090 en comparación con 20K puede observarse claramente también en la Fig. 16. La cepa RF6084 con la sustitución de aminoácido Y31A fue aproximadamente 1,5 veces mejor que 20K. Las proteínas de fusión 20K+CBD_{mut} con una sustitución de aminoácido Y32A o Y31A_Y32A tuvieron un efecto de biolavado a la piedra inferior que 20K. El resultado del lavado de las proteínas con delección de engarce 20K+CBD en el tratamiento de tela vaquera mejoró enormemente en comparación con la cepa 20K y se obtuvo un buen contraste. Con la cepa RF6108 (Δ G-444) el resultado del lavado fue al menos 6 veces mejor que con 20K y con la cepa RF6110 (Δ G-460) fue aproximadamente 3 veces mejor.

Tabla 12. Mediciones de color del anverso de la tela vaquera tratada con las proteínas de fusión 20K+ CBD mutante por afinidad y 20K+CBD con delección de engarce

Cepa N°	Enzima (sustitución de aminoácidos)	Actividad/g tejido	Antes del tratamiento con celulasa		Después del tratamiento con celulasa		Aumento de L*
			L*	B*	L*	B*	
-	Sin enzima	0	16,77	-9,95	18,18	-12,39	1,42
-	20K ¹	3000	16,80	-9,70	24,00	-14,71	7,20
-	20K ¹	1500	16,73	-10,05	22,98	-14,62	6,25
RF6086	20K +CBDmut(Y32A)	1500	16,83	-9,68	22,05	-14,14	5,22
RF6086	20K +CBDmut(Y32A)	3000	16,68	-9,76	23,30	-14,40	6,62
RF6084	20K +CBDmut(Y31A)	1000	16,83	-9,42	23,15	-14,26	6,32
RF6090	20K +CBDmut(Y31W)	250	16,79	-9,32	22,99	-14,24	6,21
RF6090	20K +CBDmut(Y31W)	1000	16,77	-9,22	25,10	-14,74	8,33
RF6094	20K +CBDmut(Y31A_Y32A)	1500	16,78	-9,30	21,66	-14,02	4,89
RF6094	20K +CBDmut(Y31A_Y32A)	3000	16,71	-9,36	22,27	-14,14	5,56
-	20K ¹	3000	16,80	-9,70	24,00	-14,71	7,20
RF6108	20K + CBD (Δ G-444)	250	16,65	-9,59	23,62	-13,97	6,97
RF6110	20K + CBD (Δ G-460)	1000	16,81	-9,72	24,17	-14,39	7,37

L* indica la luminosidad, -b* es la dirección azul, +b* es la dirección amarilla. ¹Preparación comercial

EJEMPLO 10. Efecto de las proteínas de fusión 20K+CBD sobre la resistencia de la tela vaquera

Para las mediciones de resistencia, se seleccionaron algunos de los vaqueros obtenidos de los ensayos de lavado con las proteínas de fusión 20K+CBD (Ejemplos 8 y 9) que tuvieron un nivel de abrasión similar (L^* - valor de aproximadamente 23 o 24 después del tratamiento con celulasa). La resistencia al desgarro después del tratamiento con las proteínas de fusión 20K+CBD y con las muestras de control se midió por el método de Elmendorf de acuerdo con la norma SFS-EN ISO 13937-1. Las muestras se cortaron en la dirección tanto de la trama como en la de la urdimbre. Los resultados se muestran en la Tabla 13.

Las proteínas de fusión de celulasa produjeron esencialmente la misma pérdida de resistencia o inferior que con 20K, es decir, con algunas preparaciones la resistencia del tejido continuó siendo incluso superior. La pérdida de resistencia más baja, en la dirección tanto de la urdimbre como de la trama, se obtuvo con la cepa RF6108 con la delección de engarce $\Delta G-44$. Además, la mutante por afinidad RF6090 con la sustitución de aminoácido Y31W produjo una pérdida de resistencia inferior que la 20K. La cepa RF5977 tuvo un efecto bastante similar sobre la resistencia del tejido en comparación con 20K.

Algunos de los vaqueros lavados con las preparaciones de proteínas de fusión tratadas con calor (Ejemplo 8, Tabla 11) también se seleccionaron para las mediciones de resistencia al desgarro. Se observó que la resistencia del tejido mejoraba con algunas preparaciones tratadas con calor, pero debido al rendimiento de lavado reducido tuvieron que usarse dosificaciones más altas para obtener el mismo nivel de abrasión.

Tabla 13. Mediciones de resistencia al desgarro de vaqueros tratados con las proteínas de fusión 20K+CBD de la invención

Cepa N°	Proteína enzimática	NCU/g tejido	L*	Urdimbre		Trama	
				Resistencia al desgarro (N)	(%)	Resistencia al desgarro (N)	(%)
-	Sin enzima	0	1,5	62,2	100,0	46,2	100,0
-	20K ¹	1500	22,9	46,3	74,4	31,9	69,0
RF5977	20K CBD	250	22,9	48,1	77,3	32,1	69,5
RF6086	20K +CBDmut (Y32A)	3000	23,1	46,6	74,9	30	64,9
RF6084	20K +CBDmut (Y31A)	1000	23,1	47,2	75,9	30,6	66,2
RF6090	20K +CBDmut (Y31W)	250	23,2	48,6	78,1	34,4	74,5
RF6094	20K +CBDmut (Y31A_Y32A)	3000	22,3	48,4	77,8	32,9	71,2
-	20K ¹	3000	23,9	47,6	76,5	28,9	62,6
RF6108	20K + CBD (Δ G-444)	250	23,8	54,3	87,3	35,2	76,2
RF6110	20K + CBD (Δ G-460)	1000	24,0	48,4	77,8	29,8	64,5

¹Preparación comercial

EJEMPLO 11. Comparación de preparaciones de proteínas de fusión 20K+CBD seleccionadas con preparaciones enzimáticas de la técnica anterior

Las mejores proteínas de fusión 20K+CBD de los Ejemplos 8 y 9 se sometieron a ensayo con otro tipo de tela vaquera. Para realizar la comparativa, se utilizó la preparación 20K (Ecostone® NP8500) eficaz en el acabado de tela vaquera y dos preparaciones de la técnica anterior disponibles en el comercio, DeniMax® 399S de Novozymes y Mex 500 de Meiji, que es la preparación enzimática sólida más concentrada disponible en el comercio.

El sistema de ensayo para el biolavado a la piedra fue como el descrito en el Ejemplo 8, excepto que la carga de la tela vaquera fue de 1 kg y la proporción de licor por tanto ligeramente más alta. En cada ensayo se utilizaron cinco trozos de tela vaquera ("perneras") confeccionados con sarga de tela vaquera australiana (Bradmill Textiles Pty, Australia) después de eliminar el apresto. Los hilos de la urdimbre y de la trama del tejido estaban hilados en anillo. Las enzimas se dosificaron como unidades de actividad NCU, de manera que se obtuvieron niveles de abrasión similares (medidos como luminosidad del anverso de la tela vaquera después de tratamiento con celulasa). El efecto del tratamiento con celulasa se evaluó como en el Ejemplo 8, excepto que en cada pernera se realizaron 20 mediciones de color.

Se seleccionaron dos perneras con niveles de abrasión similares (L^* - valor de aprox. 26 después del tratamiento con celulasa) para cada ensayo de lavado para las mediciones de resistencia. La resistencia al desgarro después del tratamiento con las proteínas de fusión 20K+CBD y con las muestras de control se midieron como en el Ejemplo 10. Los resultados se muestran en la Tabla 14 y en las Figuras 17A y 17B.

La resistencia al desgarro de la trama, que es un hilo típicamente más débil que el de la urdimbre, fue mayor con las proteínas de fusión de las cepas RF5977, RF6090, RF6108 y RF6110 que con 20K. Con todas las cepas de las proteínas de fusión se obtuvo una mayor resistencia considerable en la dirección tanto de la urdimbre como de la trama en comparación con DeniMax 399S y Mex 500. Además la cepa 20K fue menos contraproducente a la resistencia del tejido que las otras preparaciones de la técnica anterior.

Tabla 14. Mediciones de la resistencia al desgarro de tela vaquera tratada con las proteínas de fusión 20K+CBD de la invención, 20K y preparaciones de la técnica anterior

Enzima	Forma	L^*	Urdimbre	Trama
			Resistencia al desgarro (N)	Resistencia al desgarro (N)
Ecostone NP8500	polvo	25,9	58,0	40,3
RF5977, 20K+CBD	gránulo	26,0	56,1	44,4
Mex 500, Meiji	polvo	26,1	48,4	31,1
DeniMax 3995, Novozymes	gránulo	25,5	50,6	38,1
RF6090, 20K+CBD _{mut} (Y31W)	líquido	26,0	57,9	43,4
RF6108, 20K+CBD (Δ G-444)	líquido	25,9	55,6	43,9
RF6110, 20K+CBD (Δ G-460)	líquido	26,9	59,8	45,4

L^* indica la luminosidad del anverso de la tela vaquera después del tratamiento con celulasa.

Ejemplo 12. Rendimiento de la preparación 20K+CBD en el bioacabado (eliminación de acumulación de fibra en la superficie del tejido (depilling))

El rendimiento de la proteína de fusión concentrada 20K+CBD en el bioacabado se sometió a ensayo. Para realizar la comparativa se utilizó una preparación de celulasa ácida comercial, rica en EGII (US 5.874.293) usada en formulaciones de bioacabado, y un tratamiento sin enzima. Se realizaron tratamientos para eliminar la acumulación de fibra en la superficie del tejido (depilling), con la lavadora extractora Wascator FOM 71 CLS de Electrolux en las condiciones descritas en la Tabla 15.

Como material de ensayo se utilizaron trozos de dos tipos de suéteres no usados confeccionados con algodón al 100 %: tejido basado en jersey y elástico con superficie cubierta de pelusa con material de relleno. En primer lugar las muestras se prelavaron durante 10 min a 60 °C con agentes tensioactivos/humectantes 1 ml/l (Sandoclean PCJ de Sandos e Imacol CN de Clariant) y se aclararon 3 veces. Después de esto, las prendas de algodón se trataron con celulasa a 60 °C durante 60 minutos en presencia de los mismos adyuvantes textiles a los utilizados en el prelavado. Después de escurrir, la enzima se inactivó (durante 10 min a 60 °C) elevando el pH por encima de 11 con hidróxido sódico. Después, los trozos de prendas de punto se aclararon tres veces y se secaron en una secadora.

Tabla 15. Condiciones de ensayo/parámetros de procesado usados en los tratamientos de bioacabado

Parámetros de procesado	
Carga del tejido	1,0 kg
Agua	15 litros
Sandoclean PC e Imacol CN	1 ml/l
Control de pH pH 5-5,3/pH 6-6,3	Ajuste con ácido acético (80 %)
Tiempo	60 min
Temperatura	60 °C
Dosificación de celulasa	De 0,25 % a 0,63 % del peso del tejido

El efecto del tratamiento con celulasa se evaluó visualmente a simple vista y con una lupa. En la Tabla 16 se muestran los resultados y en la Fig. 18 se muestran fotografías tomadas con un macroobjetivo de una cámara digital.

La preparación de la proteína de fusión 20K+CBD tuvo excelentes propiedades de bioacabado dando lugar a una amplia reducción de formación de pelusa (*fuzzing*) y prevención de formación de acumulación de fibra en la superficie del tejido (*pilling*), lo cual puede observarse claramente en las fotografías (tomadas de las muestras elásticas) en la Fig. 18. Las muestras de control, especialmente las de jersey elástico, tratadas sin enzima, contenían superficies densas cubiertas con pelusa y acusada acumulación de fibra en la superficie del tejido (*pilling*). Con la preparación 20K+CBD se obtuvo una superficie de prenda de punto muy clara incluso con la dosificación más reducida (0,25 % del peso del tejido, o.w.f. (*of weight fabric*)), correspondiente a una actividad celulasa neutra de 125 NCU/g de tejido. Esta dosificación produjo un efecto casi tan bueno como el de una dosificación doble. Usando una dosificación de una preparación de 20K+CBD al 0,5 % del peso del tejido se obtuvo un efecto similar de eliminación de acumulación de fibra en la superficie del tejido (*depilling*), en comparación con el uso de una dosificación del 0,63 % o.w.f. de la preparación rica en EG II, que se utilizó a la dosificación típica para este concentrado enzimático en la aplicación de biolavado. Además, el medio de cultivo de la proteína 20K+CBD producido por el hospedador recombinante es volumétricamente al menos dos veces tan eficaz en el bioacabado como el de EG II producido por un hospedador recombinante.

Tabla 16. Resultados de tratamientos de bioacabado con la proteína de fusión 20K+CBD en comparación con una preparación rica en EGII y control sin enzima

Muestra	Dosificación g	Dosificación, % o.w.f. ^{a)}	Efecto <i>depilling</i> ^{b)}
Conc. de 20K +CBD	5	0,50	+++++
Conc. de 20K +CBD	2,5	0,25	++++
Conc. rica en EGII	6,3	0,63	+++++
Control, sin enzima	-	-	-

^{a)} del peso de la fibra

^{b)} +++++ Excelente efecto (*depilling*) de eliminación de acumulación de fibra en la superficie del tejido, superficie visualmente muy limpia

++++ Muy buen efecto (*depilling*) de eliminación de acumulación de fibra en la superficie del tejido, superficie visualmente limpia

- Superficie densa cubierta con pelusa y/o acusada acumulación de fibra en la superficie del tejido.

Ejemplo 13. Rendimiento de la preparación 20K+CBD en aplicaciones de detergentes

Se sometió a ensayo la eficacia de una preparación de proteína de fusión 20K+CBD granulada con ciclos de lavado repetidos en una lavadora doméstica usando enzima del 0 al 0,5 % del peso de formulación de detergente (detergente convencional ECE 98), que no contenía ninguna enzima. Las condiciones de ensayo se describen en la Tabla 17. La carga, la dosificación de detergente y las condiciones principales de ensayo eran de acuerdo con la norma EN 60456:2003 aunque sin contaminantes adicionales. Las muestras de tejido se recogieron después de 5, 10 y 15 lavados.

Tabla 17. Diseño del ensayo para ensayar el rendimiento de la preparación 20K+CBD

Artículo	Especificación
Concentración de enzima en uso	0, 0,1, 0,25, 0,5 %
Lavadora	Siemens 1632 IQ
Programa de lavado	Programa de algodón estándar sin lógica difusa
Detergente	ECE 98, 50 g por lavado
pH del detergente en licor de lavado	11
Temperatura de lavado	40/60 °C
Dureza del agua	15 °fH
Carga	IEC60456:2003 carga 4 kg
Suciedad artificial añadida	Art. N° 101*, algodón manchado con negro de humo/ aceite de oliva
Total 38 piezas (37 x 37 cm) de cada tipo	Art. N° 163*, algodón manchado con papilla Art. N° 112*, algodón manchado con cacao
Tela de ensayo	Antiagrisado sobre el Art. N° 224* Resistencia a tracción sobre el Art. N° 224*

* del EMPA Test materialen AG, Suiza

Los resultados del ensayo sobre el antiagrisado, realizado sobre el artículo 224 (ISO 2267) y medido como diferencias de contraste color, se muestran en las Tablas 18 y 19 y en las Figuras 19 y 20. La diferencia de color se midió mediante el método de tristímulus usando el colorímetro Spectraflash 500 (iluminante D65/10°)

La preparación de la proteína de fusión 20K+CBD mostró un efecto positivo sobre el valor del color tristímulus Y y por lo tanto sobre el antiagrisado. El efecto de diferentes concentraciones enzimáticas fue casi el mismo. De por sí, una concentración enzimática muy pequeña (0,10 %) fue suficiente para el antiagrisado. Se obtuvieron efectos más bien similares (datos no mostrados) con la proteína de fusión 20K+CBD en comparación con la celulasa del detergente comercial BIOTOUCH®DCC que contenía una actividad celulasa neutra (NCU) 1,8 veces superior.

También se usó el artículo 224 para realizar mediciones sobre la resistencia a tracción (datos no mostrados) realizadas de acuerdo con la ISO 13934-1:1999 después de 15 lavados. Ninguna de las concentraciones enzimáticas tuvo un efecto perjudicial sobre la resistencia a tracción. Todos los resultados estaban dentro de la desviación entre sí (variación $\pm 2,5$ %). Lo mismo se aplicó al estiramiento contra la carga a la rotura.

Tabla 18. Rendimiento de la proteína de fusión 20K+CBD en aplicaciones de detergentes. Diferencia de contraste de color entre el antiagrisado del artículo 224 y el artículo original (no lavado) lavado con enzima

Temperatura de lavado, Conc. enzimática (%)	Diferencia (deltaY)		
	Después de 5 lavados	Después de 10 lavados	Después de 15 lavados
40 °C, 0 %	-7,46	-10,39	-12,30
40 °C, 0,10 %	-5,78	-6,60	-8,01
40 °C, 0,25 %	-5,52	-6,08	-8,18
40 °C, 0,50 %	-4,85	-5,24	-7,56
60 °C, 0 %	-8,65	-11,43	-13,95
60 °C, 0,10 %	-5,77	-6,77	-8,41
60 °C, 0,250 %	-4,72	-5,70	-7,46
60 °C, 0,50 %	-4,33	-6,29	-7,44

Tabla 19. Rendimiento de la proteína de fusión 20K+CBD en aplicaciones de detergentes. Diferencia de contraste de color entre el antiagrisado del artículo 224 lavado con enzima y lavado sin enzima.

Temperatura de lavado, Conc. enzimática (%)	Diferencia (deltaY)		
	Después de 5 lavados	Después de 10 lavados	Después de 15 lavados
40 °C, 0 %	0	0	0
40 °C, 0,10 %	1,68	3,79	4,29
40 °C, 0,25 %	1,94	4,31	4,12
40 °C, 0,50 %	2,61	5,15	4,74
60 °C, 0 %	0	0	0
60 °C, 0,10 %	2,88	4,66	5,54
60 °C, 0,250 %	3,93	5,73	6,49
60 °C, 0,50 %	4,32	5,14	6,51

REFERENCIAS

- 5 Aho S, V Oikonen, T Jalava, M Paloheimo, R Bühler, M-L NikuPaavola, EH Bamford y M Korhola. 1991. Monoclonal antibodies against core and cellulose-binding domains of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolases I and II and endoglucanase 1. Eur. J. Biochem. 200: 643-649.
- Azevedo Mde O, Felipe MS, Astolfi-Filho S, Radford A. 1990. Cloning, sequencing and homologies of the cbh-1 (exoglucanase) gene of *Humicola grisea* var. *thermoidea*. J Gen Microbiol. 136: 2569-2576.
- 10 Bailey MJ y Nevalainen KMH. 1981. Induction, isolation and testing of stable *Trichoderma reesei* mutants with improved production of solubilising cellulase. Enz Microbiol Technol. 3: 153-157.
- Haakana H, Miettinen-Oinonen A, Joutsjoki V, Mäntylä A, Suominen P, y Vehmaanpera J. 2004. Cloning of cellulase genes from *Melanocarpus albomyces* and their efficient expression in *Trichoderma reesei*. Enz Microbiol Technol. 34: 159-167.
- 15 Henrissat B. (1991) A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. Biochem. J. 280: 309-316. Henrissat B. and Bairoch A. (1993) New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. Biochem. J. 293: 781-788.
- Hong J, Tamaki H, Yamamoto K y Kumagai H. 2003. Cloning of a gene encoding thermostable cellobiohydrolase from *Thermoascus aurantiacus* and its expression in yeast. Appl Microbiol Biotechnol 63: 42-50.
- 20 Joutsjoki VV, Torkkeli TK, y Nevalainen KMH. 1993. Transformation of *Trichoderma reesei* with the *Hormoconis resinae* 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.
- 25 Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680 - 685.
- Linder M, Mattinen ML, Kontteli M, Lindeberg G, Ståhlberg J, Drakenberg T, Reinikainen T, Pettersson G, Annala A. 1995. Identification of functionally important amino acids in the cellulose-binding domain of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase I. Protein Science 4: 1056-1064.
- 30 Lowry OH, NJ Roseborough, AL Farr y RJ Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol Chem 193: 265-275.
- 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.
- Miettinen-Oinonen A, Londesborough J, Joutsjoki V, Lantto R y Vehmaanperä, J. 2004. Three cellulases from *Melanocarpus albomyces* with applications in the textile industry. Enz Microbiol Technol. 34: 332-341.

- 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.
- Saloheimo A, Henrissat B, Hoffren AM, Teleman O, Penttilä M. 1994. A novel, small endoglucanase gene, *egl5*, from *Trichoderma reesei* isolated by expression in yeast. *Mol Microbiol* 13: 219-228.
- 5 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.
- 10 Srisodsuk M, Reinikainen T, Penttilä M, Teeri TT. 1993. Role of the interdomain linker peptide of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase I in its interaction with crystalline cellulose. *J. Biol. Chem.* 268: 20756-20761.
- Van Tilbeurgh H, Loontjies F, de Bruyne C, Clayssens M 1988. Fluorogenic and chromogenic glycosides as substrates and ligands of carbohydrases. *Meth. Enzymol.* 160: 45-59.
- 15 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, Finlandia, 1993, ed. por P. Suominen y T. Reinikainen. Foundation for Biotechnical and Industrial Fermentation Research 8 (1993): 153-158.

LISTA DE SECUENCIAS

5	<110> AB Enzymes Oy		
	<120> Celulasas mejoradas		
	<130> 2050016		
10	<160> 50		
	<170> PatentIn versión 3.1		
15	<210> 1		
	<211> 936		
	<212> ADN		
	<213> Melanocarpus albomyces		
20	<400> 1		
	tcgcccctaa ccgagaacca aagactccaa gaatgcgctc tactcccgtt ctccgcgccc	60	
	tcctggccgc agcattgccc ctcgggggccc tcgccgcca cggtcagtcc acgaggtaac	120	
	tgatcacccg cctcattacg cgtgccgacc ggaccgcgtt cagggctcac tgctcaccgc	180	
	atccagatac tgggactgct gcaagccgtc gtgcggctgg gccggaaagg gccccgtgaa	240	
	ccagcccgtc tactcgtgcg acgccaactt ccagcgcctc cagcacttcg atgccgtctc	300	
	gggctgcgag ggcggccccg ctttctcgtg cgccgaccac agcccctggg ccattaatga	360	
	caacctctcg tacggcttcg cggcgactgc actcagcggc cagaccgagg agtcgtggtg	420	
	ctgtgcctgc tacgcgtgag tgtgcttggg cccaacgtcg gtgattccgg agttcagacc	480	
	actgaccag cgacccgctc gccagtctga cttttacatc gggctccgtg gccggcaaga	540	
	ccatggctcgt ccagtcgacc agcacgggcg gcgacctcg cagcaaccac ttcgacctca	600	
	acatccccgg cggcggcgtc ggcctcttcg acggctgcac tccccagttc ggcggcctcc	660	
	cgggcgcacg gtacggcggc atctcgtcgc gccaggagtg cgactcgttc cccgagccgc	720	
	tcaagcccgg ctgccagtgg cgcttcgact ggttcagaa cgcgacaac ccgtccttta	780	
	ccttcgagcg ggtccagtgc cccgaggagc tggctcgtcg gaccggctgc aggcgccacg	840	
	acgacggcgg cttcgccgtc ttcaaggccc ccagcgcctg atccgttttt gggcagtgtc	900	
	cgtgtgacgg cagctacgtg gaacgacctg gagctc	936	
25	<210> 2		
	<211> 214		
	<212> PRT		
	<213> Melanocarpus albomyces		
	<400> 2		

Ala Asn Gly Gln Ser Thr Arg Tyr Trp Asp Cys Cys Lys Pro Ser Cys
1 5 10 15

Gly Trp Ala Gly Lys Gly Pro Val Asn Gln Pro Val Tyr Ser Cys Asp
20 25 30

Ala Asn Phe Gln Arg Ile His Asp Phe Asp Ala Val Ser Gly Cys Glu
35 40 45

Gly Gly Pro Ala Phe Ser Cys Ala Asp His Ser Pro Trp Ala Ile Asn
50 55 60

Asp Asn Leu Ser Tyr Gly Phe Ala Ala Thr Ala Leu Ser Gly Gln Thr
65 70 75 80

Glu Glu Ser Trp Cys Cys Ala Cys Tyr Ala Leu Thr Phe Thr Ser Gly
85 90 95

Pro Val Ala Gly Lys Thr Met Val Val Gln Ser Thr Ser Thr Gly Gly
100 105 110

Asp Leu Gly Ser Asn His Phe Asp Leu Asn Ile Pro Gly Gly Gly Val
115 120 125

Gly Leu Phe Asp Gly Cys Thr Pro Gln Phe Gly Gly Leu Pro Gly Ala
130 135 140

Arg Tyr Gly Gly Ile Ser Ser Arg Gln Glu Cys Asp Ser Phe Pro Glu
145 150 155 160

Pro Leu Lys Pro Gly Cys Gln Trp Arg Phe Asp Trp Phe Gln Asn Ala
165 170 175

Asp Asn Pro Ser Phe Thr Phe Glu Arg Val Gln Cys Pro Glu Glu Leu
180 185 190

Val Ala Arg Thr Gly Cys Arg Arg His Asp Asp Gly Gly Phe Ala Val
195 200 205

Phe Lys Ala Pro Ser Ala
210

<210> 3
<211> 1820
<212> ADN
<213> Trichoderma reesei

<400> 3

```

ccgcggactg cgcacatgt atcggaagtt ggccgtcatc tcggccttct tggccacagc    60
tcgtgctcag tcggcctgca ctctccaatc ggagactcac ccgcctctga catggcagaa    120
atgctcgtct ggtggcactt gcactcaaca gacaggctcc gtggtcatcg acgccaactg    180
gcgctggact cagcgtacga acagcagcac gaactgctac gatggcaaca cttggagctc    240
gaccctatgt cctgacaacg agacctgcgc gaagaactgc tgtctggacg gtgccgccta    300
cgcgtccacg tacggagtta ccacgagcgg taacagcctc tccattgggt ttgtcaccca    360
gtctgcgcag aagaacgttg gcgctcgctt ttaccttatg ggcagcgaca cgacctacca    420
ggaattcacc ctgcttgga acgagttctc tttcgatgtt gatgtttcgc agctgccgta    480
agtgacttac catgaacccc tgacgtatct tcttgtgggc tcccagctga ctggccaatt    540
taaggtgcgg cttgaacgga gctctctact tcgtgtccat ggacgcggat ggtggcgtga    600
gcaagtatcc caccaacacc gctggcgcca agtacggcac ggggtactgt gacagccagt    660
gtccccgcga tctgaagttc atcaatggcc aggccaacgt tgagggctgg gagccgtcat    720
ccaacaacgc aaacacgggc attggaggac acggaagctg ctgctctgag atggatatct    780
gggaggccaa ctccatctcc gaggtcttta ccccccaccc ttgcacgact gtcggccagg    840
agatctgcga gggatgatgg tgcggcggaa cttactccga taacagatat ggcggcactt    900
gcgatcccga tggctgcgac tggaaacccat accgcctggg caacaccagc ttctacggcc    960
ctggctcaag ctttaccctc gataccacca agaaattgac cgttgtcacc cagtccgaga   1020
cgtcgggtgc catcaaccga tactatgtcc agaatggcgt cactttccag cagcccaacg   1080
ccgagcttgg tagttactct ggcaacgagc tcaacgatga ttactgcaca gctgaggagg   1140
cagaattcgg cggatcctct ttctcagaca agggcggcct gactcagttc aagaaggcta   1200
cctctggcgg catggttctg gtcgatgagtc tgtgggatga tgtgagtttg atggacaaac   1260
atgcgcggtg acaaagagtc aagcagctga ctgagatgtt acagtactac gccaacatgc   1320
tgtggctgga ctccacctac ccgacaaacg agacctctc cacaccgggt gccgtgcgcg   1380
gaagctgctc caccagctcc ggtgtccctg ctcaggtcga atctcagttt cccaacgcca   1440
aggtcacctt ctccaacatc aagttcggac ccattggcag caccggcaac cctagcggcg   1500
gcaaccctcc cggcggaac ccgcctggca ccaccaccac ccgccgcca gccactacca   1560
ctggaagctc tcccggacct acccagttc actacggcca gtgcggcggt attggctaca   1620
gcggccccac ggtctgcgcc agcggcacia cttgccaggc cctgaaccct tactactctc   1680
agtgcctgta aagctccgtg cgaaagcctg acgcaccggg agattccttg tgagcccgtg   1740
tcatgacggc ggcgggagct acatggcccc gggtgattta ttttttttgt atctacttct   1800
gacccttttc aaatatacgg                                     1820

```

5 <210> 4
 <211> 497
 <212> PRT
 <213> Trichoderma reesei

10 <400> 4

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

Cys Cys Ser Glu Met Asp Ile Trp Glu Ala Asn Ser Ile Ser Glu Ala
 210 215 220
 Leu Thr Pro His Pro Cys Thr Thr Val Gly Gln Glu Ile Cys Glu Gly
 225 230 235 240
 Asp Gly Cys Gly Gly Thr Tyr Ser Asp Asn Arg Tyr Gly Gly Thr Cys
 245 250 255
 Asp Pro Asp Gly Cys Asp Trp Asn Pro Tyr Arg Leu Gly Asn Thr Ser
 260 265 270
 Phe Tyr Gly Pro Gly Ser Ser Phe Thr Leu Asp Thr Thr Lys Lys Leu
 275 280 285
 Thr Val Val Thr Gln Ser Glu Thr Ser Gly Ala Ile Asn Arg Tyr Tyr
 290 295 300
 Val Gln Asn Gly Val Thr Phe Gln Gln Pro Asn Ala Glu Leu Gly Ser
 305 310 315 320
 Tyr Ser Gly Asn Glu Leu Asn Asp Asp Tyr Cys Thr Ala Glu Glu Ala
 325 330 335
 Glu Phe Gly Gly Ser Ser Phe Ser Asp Lys Gly Gly Leu Thr Gln Phe
 340 345 350
 Lys Lys Ala Thr Ser Gly Gly Met Val Leu Val Met Ser Leu Trp Asp
 355 360 365
 Asp Tyr Tyr Ala Asn Met Leu Trp Leu Asp Ser Thr Tyr Pro Thr Asn
 370 375 380
 Glu Thr Ser Ser Thr Pro Gly Ala Val Arg Gly Ser Cys Ser Thr Ser
 385 390 395 400
 Ser Gly Val Pro Ala Gln Val Glu Ser Gln Ser Pro Asn Ala Lys Val
 405 410 415
 Thr Phe Ser Asn Ile Lys Phe Gly Pro Ile Gly Ser Thr Gly Asn Pro
 420 425 430
 Ser Gly Gly Asn Pro Pro Gly Gly Asn Pro Pro Gly Thr Thr Thr Thr
 435 440 445
 Arg Arg Pro Ala Thr Thr Thr Gly Ser Ser Pro Gly Pro Thr Gln Ser
 450 455 460
 His Tyr Gly Gln Cys Gly Gly Ile Gly Tyr Ser Gly Pro Thr Val Cys
 465 470 475 480

Ala Ser Gly Thr Thr Cys Gln Val Leu Asn Pro Tyr Tyr Ser Gln Cys
485 490 495

Leu

<210> 5

<211> 1895

<212> ADN

<213> Melanocarpus albomyces

<400> 5

gaattcgggg gttgccaggg agtcgtacag ggggtgggtgg aggggggatgg gggatggaag 60
gggggatggag aagaaagcat atatgggacg tttgtgctcg ccggctcccc tctgccacgt 120
tcccttgccct ccttgccctgg gttgttgttg gtcttccctt caccatccga caaaccaacc 180
tgctgcgggt gaactcgag agcgcttcg gacgacgaca gacagacgca ccatgactcg 240
caacatcgcc ctgctcggcg ccgcgtcggc gtcctgggc ctcgcccacg gccagaagcc 300
gggcgagacg cccgaggtgc accgcagct gacgacgttc cgggtgcacca aggcggacgg 360
gtgccagccg cggaccaact acattgtgct ggactcgctg tcgcacccgg tgcaccaggt 420
ggacaacgac tacaactgcg gcgactgggg gcagaagccc aacgcgacgg cgtgcccgga 480
cgtcgagtcg tgcgcgcgca actgcatcat ggagggcgctg cccgactaca gccagcacgg 540
cgtcacgacg agcgacacgt cgctgcgcct gcagcagctc gtcgacggcc gcctcgtcac 600
gccgcgcgtc tacctgctcg acgagaccga gcaccgctac gagatgatgc acctgaccgg 660
ccaggagttc acctttgagg tcgacgccac caagctgccc tgcggcatga acagcgccct 720
ctacctgtcc gagatggacc cgaccggcgc ccggagcgag ctcaaccccg gcggtgccta 780
ctacggcacc ggctactgcg acgcccagtg cttcgtgacg ccattcatca acggcattgt 840
gagtgttccc ctttggcccc cccctgaaa atagatgtac ctgggtgcta accccgggggt 900
gtcgcaccaa aacagggcaa catcgagggc aagggtcgt gctgcaacga gatggacatc 960
tgggaggcca actcgcgggc gacgcacgtg gcgccgcaca cgtgcaacca gacgggtctg 1020
tacatgtgcg agggcgccga gtgcgagtac gacggcgtgt gcgacaagga cgggtgcggg 1080
tggaacccgt accgggtcaa catcaccgac tactacggca actcggacgc gttccgcgtc 1140
gacacgcggc ggcccttcac cgtggtgacg cagttcccgg ccgacgccga gggccggctc 1200
gagagcatcc accggctgta cgtgcaggac ggcaagggtga tcgagtcgta cgtcgtcgac 1260
gcgccggggc tgccccggac cgactcgctc aacgacgagt tctgcgccgc cacgggcgcc 1320
gcgcgctacc tcgacctcg cggcaccgcg ggcatgggcg acgccatgac gcgcggcatg 1380
gtgctggcca tgagcatctg gtgggacgag tccggcttca tgaactggct cgacagcggc 1440

gaggccggcc cctgcctgcc cgacgagggc gacccaaga acattgtcaa ggtcgagccc 1500
agccccgagg tcacctacag caacctgcgc tggggcgaga tcgggtcgac ctttgaggcc 1560
gagtccgacg acgacggcga cggcgacgac tgctagataa ctaactagtg ggcggaaagg 1620
gcgggggatg cgtaacttac atacagcccg gagttgtttt gagtgtagag tattgagctt 1680
tcgatgtgtt agttgagtgg aatggaaaat tcgcgtcttt gcccgggtgg ttgcgataaa 1740
caatagtcgg ctggtgcatt tgtgacactt caattgcgct gttggcttgg tgacagacac 1800
ggcagcgtcg atgacccgac acccagaata attcgcatgg ttgattattg ttattgtgct 1860
ttaaatcgga ggctgatgct catctcttcg aattc 1895

<210> 6

<211> 408

5 <212> PRT

<213> Melanocarpus albomyces

<400> 6

Gln Lys Pro Gly Glu Thr Pro Glu Val His Pro Gln Leu Thr Thr Phe
1 5 10 15

Arg Cys Thr Lys Ala Asp Gly Cys Gln Pro Arg Thr Asn Tyr Ile Val
20 25 30

Leu Asp Ser Leu Ser His Pro Val His Gln Val Asp Asn Asp Tyr Asn
35 40 45

Cys Gly Asp Trp Gly Gln Lys Pro Asn Ala Thr Ala Cys Pro Asp Val
50 55 60

Glu Ser Cys Ala Arg Asn Cys Ile Met Glu Gly Val Pro Asp Tyr Ser
65 70 75 80

Gln His Gly Val Thr Thr Ser Asp Thr Ser Leu Arg Leu Gln Gln Leu
85 90 95

Val Asp Gly Arg Leu Val Thr Pro Arg Val Tyr Leu Leu Asp Glu Thr
100 105 110

Glu His Arg Tyr Glu Met Met His Leu Thr Gly Gln Glu Phe Thr Phe
115 120 125

Glu Val Asp Ala Thr Lys Leu Pro Cys Gly Met Asn Ser Ala Leu Tyr
130 135 140

Leu Ser Glu Met Asp Pro Thr Gly Ala Arg Ser Glu Leu Asn Pro Gly
145 150 155 160

Gly Ala Tyr Tyr Gly Thr Gly Tyr Cys Asp Ala Gln Cys Phe Val Thr
165 170

Pro Phe Ile Asn Gly Ile Gly Asn Ile Glu Gly Lys Gly Ser Cys Cys
180 185 190

Asn Glu Met Asp Ile Trp Glu Ala Asn Ser Arg Ala Thr His Val Ala
195 200 205

Pro His Thr Cys Asn Gln Thr Gly Leu Tyr Met Cys Glu Gly Ala Glu
210 215 220

Cys Glu Tyr Asp Gly Val Cys Asp Lys Asp Gly Cys Gly Trp Asn Pro
225 230 235 240

Tyr Arg Val Asn Ile Thr Asp Tyr Tyr Gly Asn Ser Asp Ala Phe Arg
245 250 255

Val Asp Thr Arg Arg Pro Phe Thr Val Val Thr Gln Phe Pro Ala Asp
260 265 270

Ala Glu Gly Arg Leu Glu Ser Ile His Arg Leu Tyr Val Gln Asp Gly
275 280 285

Lys Val Ile Glu Ser Tyr Val Val Asp Ala Pro Gly Leu Pro Arg Thr
290 295 300

Asp Ser Leu Asn Asp Glu Phe Cys Ala Ala Thr Gly Ala Ala Arg Tyr
305 310 315 320

Leu Asp Leu Gly Gly Thr Ala Gly Met Gly Asp Ala Met Thr Arg Gly
325 330 335

Met Val Leu Ala Met Ser Ile Trp Trp Asp Glu Ser Gly Phe Met Asn
340 345 350

Trp Leu Asp Ser Gly Glu Ala Gly Pro Cys Leu Pro Asp Glu Gly Asp
355 360 365

Pro Lys Asn Ile Val Lys Val Glu Pro Ser Pro Glu Val Thr Tyr Ser
370 375 380

Asn Leu Arg Trp Gly Glu Ile Gly Ser Thr Phe Glu Ala Glu Ser Asp
385 390 395 400

Asp Asp Gly Asp Gly Asp Asp Cys
405

<210> 7
<211> 2100
<212> ADN

<213> Melanocarpus albomyces

<400> 7

cccgggtctgg agacggggag cgcgccagcg acgcaggata agaaggcgac gaccgcgcct	60
ccgagccagg cccaggacag caggagaact cgccacgcgc aagcagcacg cccgatcgac	120
agtgtccccg tctgcccaca gactctgca accatgatga tgaagcagta cctccagtac	180
ctcgcgggcg cgctgccgct cgtcggcctc gccgccggcc agcgcgctgg taacgagacg	240
cccgagaacc accccccgct cacctggcag aggtgcacgg ccccgggcaa ctgccagacc	300
gtgaacgccg aggtcgtcat tgacccaac tggcgctggc tgcacgacga caacatgcag	360
aactgctacg acggcaacca gtggaccaac gcctgcagca ccgccaccga ctgcgctgag	420
aagtgcata tgcaggggtgc cggcgactac ctgggcacct acggcgccctc gaccagcggc	480
gacgccctga cgctcaagtt cgtcaccaag cacgagtacg gcaccaacgt cggctcgcgc	540
ttctacctca tgaacggccc ggacaagtac cagatgttca acctcatggg caacgagctt	600
gcctttgacg tgcacctctc gaccgtcgag tgcggcatca acagcgccct gtacttcgtc	660
gccatggagg aggacggcgg catggccagc taccgagca accaggccgg cgcccggtag	720
ggcactgggg tgagttgagc tccgctttgt ttcgagtcgc aacgaggcac tttctgggcg	780
ccggctaact ctctcgattc ctccgacagt actgcgatgc ccaatgcgct cgtgatctca	840
agttcgttgg cggcaaggcc aacattgagg gctggaagtc gtccaccagc gaccccaacg	900
ctggcgtcgg cccgtacggc agctgctgcg ctgagatcga cgtctggtga gtgcgagacc	960
gtccacccag gttcggatgc ggggtggaaa tttcgcggct aacggagcac cccccagggg	1020
gtcgaatgcc tatgccttcg ctttcacgcc gcacgcgtgc acgaccaacg agtaccacgt	1080
ctgcgagacc accaactgcg gtggcaccta ctcgaggagc cgcttcgccg gcaagtgcga	1140
cgccaacggc tgcgactaca acccctaccg catgggcaac cccgacttct acggcaaggg	1200
caagacgctc gacaccagcc gcaagttcac gtgcgtgacc ccttggtggc caacctttct	1260
ctgcctgcct ggacacactg aaactgacac gtcgttttcg gctgcagcgt cgtctccccg	1320
ttcgaggaga acaagctctc ccagtacttc atccaggacg gccgcaagat cgagatcccc	1380
ccgccgacgt gggagggcat gcccaacagc agcgagatca ccccgagct ctgctccacc	1440
atgttcgatg tgttcaacga ccgcaaccgc ttcgaggagg tcggcggctt cgagcagctg	1500
aacaacgccc tccgggttcc catggctctc gtcagtcca tctgggacga cgtaagtacc	1560
cgccgacctc cctagccaca caagccgcat ccggcgaggc acgccatcgc tgctgctaac	1620
acgagaccgt tcgtagcact acgccaacat gctctggctc gactccatct acccgcccga	1680
gaaggagggc cagcccggcg ccgcccgtgg cgactgcccc acggactcgg gtgtccccgc	1740
cgaggctcag gctcagttcc ccgacgcgta agacttgccc ccgaccccaa gcttccactt	1800

ctggatgccg aatgctaaca cgcgaaacag ccaggtcgtc tggccaaca tccgcttcgg 1860
 ccccatcggc tcgacctacg acttctaagc cggccatgc actcgagcc ctgggccgct 1920
 caccgcccgc acctcccctc gcggaaactc tccgtgcgtc gcgggctcca aagcattttg 1980
 gcctcaagtt tttttcgttc atgtttcagt tctttccgca tgtatcctaa gctccgatag 2040
 caagagaaat tgccagtctg agttttggga acctgtgatc cacatcatgg acgcataatg 2100

<210> 8

<211> 430

5 <212> PRT

<213> Melanocarpus albomyces

<400> 8

Gln Arg Ala Gly Asn Glu Thr Pro Glu Asn His Pro Pro Leu Thr Trp
 1 5 10 15

Gln Arg Cys Thr Ala Pro Gly Asn Cys Gln Thr Val Asn Ala Glu Val
 20 25 30

Val Ile Asp Ala Asn Trp Arg Trp Leu His Asp Asp Asn Met Gln Asn
 35 40 45

Cys Tyr Asp Gly Asn Gln Trp Thr Asn Ala Cys Ser Thr Ala Thr Asp
 50 55 60

Cys Ala Glu Lys Cys Met Ile Glu Gly Ala Gly Asp Tyr Leu Gly Thr
 65 70 75 80

Tyr Gly Ala Ser Thr Ser Gly Asp Ala Leu Thr Leu Lys Phe Val Thr
 85 90 95

Lys His Glu Tyr Gly Thr Asn Val Gly Ser Arg Phe Tyr Leu Met Asn
 100 105 110

Gly Pro Asp Lys Tyr Gln Met Phe Asn Leu Met Gly Asn Glu Leu Ala
 115 120 125

Phe Asp Val Asp Leu Ser Thr Val Glu Cys Gly Ile Asn Ser Ala Leu
 130 135 140

Tyr Phe Val Ala Met Glu Glu Asp Gly Gly Met Ala Ser Tyr Pro Ser
 145 150 155 160

Asn Gln Ala Gly Ala Arg Tyr Gly Thr Gly Tyr Cys Asp Ala Gln Cys
 165 170 175

Ala Arg Asp Leu Lys Phe Val Gly Gly Lys Ala Asn Ile Glu Gly Trp
180 185 190

Lys Ser Ser Thr Ser Asp Pro Asn Ala Gly Val Gly Pro Tyr Gly Ser
195 200 205

Cys Cys Ala Glu Ile Asp Val Trp Glu Ser Asn Ala Tyr Ala Phe Ala
210 215 220

Phe Thr Pro His Ala Cys Thr Thr Asn Glu Tyr His Val Cys Glu Thr
225 230 235 240

Thr Asn Cys Gly Gly Thr Tyr Ser Glu Asp Arg Phe Ala Gly Lys Cys
245 250 255

Asp Ala Asn Gly Cys Asp Tyr Asn Pro Tyr Arg Met Gly Asn Pro Asp
260 265 270

Phe Tyr Gly Lys Gly Lys Thr Leu Asp Thr Ser Arg Lys Phe Thr Val
275 280 285

Val Ser Arg Phe Glu Glu Asn Lys Leu Ser Gln Tyr Phe Ile Gln Asp
290 295 300

Gly Arg Lys Ile Glu Ile Pro Pro Pro Thr Trp Glu Gly Met Pro Asn
305 310 315 320

Ser Ser Glu Ile Thr Pro Glu Leu Cys Ser Thr Met Phe Asp Val Phe
325 330 335

Asn Asp Arg Asn Arg Phe Glu Glu Val Gly Gly Phe Glu Gln Leu Asn
340 345 350

Asn Ala Leu Arg Val Pro Met Val Leu Val Met Ser Ile Trp Asp Asp
355 360 365

His Tyr Ala Asn Met Leu Trp Leu Asp Ser Ile Tyr Pro Pro Glu Lys
370 375 380

Glu Gly Gln Pro Gly Ala Ala Arg Gly Asp Cys Pro Thr Asp Ser Gly
385 390 395 400

Val Pro Ala Glu Val Glu Ala Gln Phe Pro Asp Ala Gln Val Val Trp
405 410 415

Ser Asn Ile Arg Phe Gly Pro Ile Gly Ser Thr Tyr Asp Phe
420 425 430

<210> 9
<211> 3459
<212> ADN

<213> *Thermoascus aurantiacus*

<400> 9

gaattctaga cttttatcct ttcattccgac cagacttccc tttttgacct tggcgccctg	60
ttgactacct acctacctag gtagtaacgt cgtcgaccct cttgaatgat ccttgtcaca	120
ctgcaaacat ccgaaaacat acggcaaaag atgattgggc atggatgcag gagacatcga	180
atgagggcctt agaaggaaat gaaaacctgg gaccaggacg ctaggtacga tgaaatccgc	240
caatgggtgaa actttaagtc gtgcctacag cacaggctct gtgaagattg cgctgttcag	300
acttaatctt ctcatcacag tccaagtctt tatgaaaagg aaaaagagag ggaagagcgc	360
tatttcgagc tgttggcctc atagggagac agtcgagcat accagcggta tcgacgttag	420
actcaaccaa gaataatgac gagaataaac acagaagtca accttgaact ggatagcagg	480
gttccagcag cagatagtta cttgcataaa gacaactccc cgagggtctt ctgcatacac	540
caggatgttc cggaattatt cactgctcgt ttccgacgtg gcgtcagtga tccgtctcca	600
cagaactcta cctgggaata acccagggga ggaatctgca agtaagaact taataccaat	660
ccccggggct gccgaggtga atcgaatctc ccgcgggaaa ttaaaccat acgatgtttt	720
tgcaccacat gcatgcttag cacgatttct ccgcaaggga gtcacagaga aagacatatt	780
tcgcatacta ctgtgactct gcagagttac atatcactca ggatacattg cagatcattg	840
tccgggcatc aaaaatggac ctgcaggatc aacggccccg caaaacacaa gtggctaaag	900
ctgggggatg cccgaaacct tctgggtgaa tatcatttga tggatgttcc cccgcattt	960
ctaagacatc gacggatcgg cccgcatact aatcctttta tcaacaaaaa gttccactcg	1020
actagagaaa aaaaaggcca aggccactag ttgcagtcgg atactggtct tttcgccgtc	1080
caacaccttc atccatgac ccttagcca ccaatgcccc acataatata tgttgacata	1140
ggtagcgtagc tctgttatcc aatcggatcc gaacctcttt aacggacccc tcctacacac	1200
cttatcctaa cttcagaaga ctgttgcca ttggggattg aggaggtccg ggtcgcagga	1260
tgcgttctag gctaaattct cgcccggtag ccatctcgaa tctctcgtga agccttcac	1320
tgaacggttg gcggcccgtc aagccgatga ccatgggttc ctgatagagc ttgtgcctga	1380
ccggccttgg cggcatagac gagctgaaca catcaggtat gaacagatca gatataaagt	1440
cggattgagt cctagtacga agcaatccgc caccaccaa tcaagcaacg agcgacacga	1500
ataacaatat caatcgaatc gcaatgtatc agcgcgctct tctcttctct ttcttcctcg	1560
ccgcccggcg cgcgcacgag gccggtaccg taaccgcaga gaatcaccct tccctgacct	1620
ggcagcaatg ctccagcggc ggtagtgtga ccacgcagaa tggaaaagtc gttatcgatg	1680
cgaactggcg ttgggtccat accacctctg gatacaccaa ctgctacacg ggcaatcag	1740
gggacaccag tatctgtccc gacgacgtga cctgcgctca gaattgtgcc ttggatggag	1800
cggattacag tggcacctat ggtgttacga ccagtggcaa cgccctgaga ctgaactttg	1860

ES 2 458 301 T3

```

tcacccaaag ctcaggaag aacattggct cgcgcctgta cctgctgcag gacgacacca 1920
cttatcagat cttcaagctg ctgggtcagg agtttacctt cgatgtcgac gtctccaatc 1980
tcccttgccg gctgaacggc gccctctact ttgtggccat ggacgccgac ggcaatttgt 2040
ccaaataccc tggcaacaag gcaggcgcta agtatggcac tggttactgc gactctcagt 2100
gccctcggga tctcaagttc atcaacggtc aggtacgtca gaagtgataa ctagccagca 2160
gagcccatga atcattaact aacgctgtca aatacaggcc aacgttgaag gctggcagcc 2220
gtctgccaac gacccaaatg ccggcggttg taaccacggt tcctcgtgcg ctgagatgga 2280
tgtctgggaa gccaacagca tctctactgc ggtgacgcct caccatgcg acacccccgg 2340
ccagaccatg tgccaggag acgactgttg tggaaacctac tcctccactc gatatgctgg 2400
tacctgcgac cctgatggct gcgacttcaa tccttaccag ccaggcaacc actcgttcta 2460
cggccccggg aagatcgctg acactagctc caaattcacc gtcgtcacc agttcatcac 2520
cgacgacggg acaccctccg gcaccctgac ggagatcaaa cgcttctacg tccagaacgg 2580
caaggtgatc ccccgatcgg agtcgacgat cagcggcgct accggcaact caatcaccac 2640
cgagtattgc acggcccaga aggcagcctt cggcgacaac accggcttct tcacgcacgg 2700
cgggcttcag aagatcagtc aggtcttggc tcagggcagtg gtcctcgtca tgagcctgtg 2760
ggacgatcac gccgccaaca tgctctggct ggacagcacc taccgactg atgcggaccc 2820
ggacaccctt ggcgtcgcgc gcggtacctg cccacgacc tccggcgctc cggccgacgt 2880
tgagtcgag aacccaatt catatgttat ctactccaac atcaaggtcg gacccatcaa 2940
ctcgaccttc accgccaact aagtaagtaa cgggcactct accaccgaga gcttcgtgaa 3000
gatacagggg tagttgggag attgtcgtgt acaggggaca tgcgatgctc aaaaatctac 3060
atcagtttgc caattgaacc atgaagaaaa gggggagatc aaagaagtct gtcagaagag 3120
aggggctgtg gcagcttaag ccttgttgta gatcgttcag agaaaaaaaa agtttgcgta 3180
cttattatat taggtcgatc attatccgat tgactccgtg acaagaatta aaaagagtac 3240
tgcttgcttg cctattttaa ttgttatata cgccgtagcg cttgcggacc acccctcaca 3300
gtatatcggg tcgcctcttc ttgtctcttc atctcacatc acaggtccag gtccagcccg 3360
gcccgggccg ggtgccatgc atgcacaggg ggactaatat attaatcgtg accctgtvcc 3420
taagctaggg tccctgcatt ttgaacctgt ggacgtctg 3459

```

<210> 10

<211> 440

<212> PRT

<213> Thermoascus aurantiacus

<400> 10

ES 2 458 301 T3

Gln Gln Ala Gly Thr Val Thr Ala Glu Asn His Pro Ser Leu Thr Trp
1 5 10 15

Gln Gln Cys Ser Ser Gly Gly Ser Cys Thr Thr Gln Asn Gly Lys Val
20 25 30

Val Ile Asp Ala Asn Trp Arg Trp Val His Thr Thr Ser Gly Tyr Thr
35 40 45

Asn Cys Tyr Thr Gly Asn Thr Trp Asp Thr Ser Ile Cys Pro Asp Asp
50 55 60

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

Thr Tyr Gly Val Thr Thr Ser Gly Asn Ala Leu Arg Leu Asn Phe Val
85 90 95

Thr Gln Ser Ser Gly Lys Asn Ile Gly Ser Arg Leu Tyr Leu Leu Gln
100 105 110

Asp Asp Thr Thr Tyr Gln Ile Phe Lys Leu Leu Gly Gln Glu Phe Thr
115 120 125

Phe Asp Val Asp Val Ser Asn Leu Pro Cys Gly Leu Asn Gly Ala Leu
130 135 140

Tyr Phe Val Ala Met Asp Ala Asp Gly Gly Leu Ser Lys Tyr Pro Gly
145 150 155 160

Asn Lys Ala Gly Ala Lys Tyr Gly Thr Gly Tyr Cys Asp Ser Gln Cys
165 170 175

Pro Arg Asp Leu Lys Phe Ile Asn Gly Gln Ala Asn Val Glu Gly Trp
180 185 190

Gln Pro Ser Ala Asn Asp Pro Asn Ala Gly Val Gly Asn His Gly Ser
195 200 205

Cys Cys Ala Glu Met Asp Val Trp Glu Ala Asn Ser Ile Ser Thr Ala
210 215 220

Val Thr Pro His Pro Cys Asp Thr Pro Gly Gln Thr Met Cys Gln Gly
225 230 235 240

Asp Asp Cys Gly Gly Thr Tyr Ser Ser Thr Arg Tyr Ala Gly Thr Cys
245 250 255

Asp Pro Asp Gly Cys Asp Phe Asn Pro Tyr Arg Gln Gly Asn His Ser
260 265 270

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

5 <210> 11
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Cebador
 10 <400> 11
 tacgccatgg tcgtccagtc gaccagc 27
 15 <210> 12
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Cebador
 20 <400> 12
 tacgccatgg tcgtccagtc gaccagcacgggcgg 35
 <210> 13
 <211> 46
 <212> ADN
 <213> Cebador

ES 2 458 301 T3

	<400> 13 tacgccatgg tcgtccagtc gaccagcacgggcggcgacc tcggca	46
5	<210> 14 <211> 40 <212> ADN <213> Cebador	
10	<400> 14 cgtactcgag tcacgcgag ggggcctga agacggcgaa	40
15	<210> 15 <211> 30 <212> ADN <213> Cebador	
20	<400> 15 tgactcgaga ccggtgcgtc aggctttcgc	30
25	<210> 16 <211> 34 <212> ADN <213> Cebador	
30	<400> 16 taggatccga gtccattgg cagcaccggc aacc	34
35	<210> 17 <211> 36 <212> ADN <213> Cebador	
40	<400> 17 taggatccga gtccatagcg cggaaccct cccggc	36
45	<210> 18 <211> 34 <212> ADN <213> Cebador	
50	<400> 18 taggatccga gtccattac cggaaccct agcg	34
55	<210> 19 <211> 55 <212> ADN <213> Cebador	
60	<400> 19 cgtactcgag tcacgcgag ccgatggggc cgaaggcgaa gccgccgtcg tcgtg	55
65	<210> 20 <211> 52 <212> ADN <213> Cebador	
70	<400> 20 cgtactcgag tcacgcgag ccgatctcgc ccagaagcc gccgtcgtcg tg	52
75	<210> 21 <211> 58 <212> ADN <213> Cebador	
80	<400> 21 cgtactcgag tcacgcgac gaggggatct ggacggcggg gaagccgccg tcgtcgtg	58

ES 2 458 301 T3

5	<210> 22 <211> 52 <212> ADN <213> Cebador		
10	<400> 22 cgtactcgag tcatcgcgag ccgatctcgc ccaggcgaa gccgccgtcg tc	52	
15	<210> 23 <211> 37 <212> ADN <213> Cebador		
20	<400> 23 tcgtctcgag tcgcatggg gccgaagcgg atgttgg	37	
25	<210> 24 <211> 31 <212> ADN <213> Cebador		
30	<400> 24 ggagggcatg cccaacagca gcgagatcac c	31	
35	<210> 25 <211> 38 <212> ADN <213> Cebador		
40	<400> 25 cggcactagt tcgacccg atctgcccc agcgcagg	38	
45	<210> 26 <211> 26 <212> ADN <213> Cebador		
50	<400> 26 cgccgagggc cggctcgaga gcatcc	26	
55	<210> 27 <211> 69 <212> ADN <213> Cebador		
60	<400> 27 tgactcgaga ccggtgcgtc aggctttcgc acggagcttt acaggcactg agagtaggca	60	
65	gggttcagg	69	
70	<210> 28 <211> 69 <212> ADN <213> Cebador		
75	<400> 28 tgactcgaga ccggtgcgtc aggctttcgc acggagcttt acaggcactg agaggcgtaa	60	
80	gggttcagg	69	
85	<210> 29 <211> 69 <212> ADN <213> Cebador		

ES 2 458 301 T3

	<400> 29		
	tgactcgaga ccggtgcgtc aggctttcgc acggagcttt acaggcactg agagtaccaa	60	
	gggttcagg	69	
5	<210> 30		
	<211> 69		
	<212> ADN		
	<213> Cebador		
10	<400> 30		
	tgactcgaga ccggtgcgtc aggctttcgc acggagcttt acaggcactg agaggcggca	60	
	gggttcagg	69	
	<210> 31		
	<211> 57		
15	<212> ADN		
	<213> Cebador		
	<400> 31		
20	taggatccga gtcccattac cggcaaccct agcaccacca ccaccgcgcg cccagcc	57	
	<210> 32		
	<211> 60		
	<212> ADN		
	<213> Cebador		
25	<400> 32		
	taggatccga gtcccattac cggcaaccct agcctaccc agtctcacta cggccagtgc	60	
	<210> 33		
30	<211> 45		
	<212> ADN		
	<213> Cebador		
	<400> 33		
35	tgactcgaga ccggtgcgtc aggctttcgc acggagcttt acagg	45	
	<210> 34		
	<211> 67		
	<212> ADN		
40	<213> Cebador		
	<400> 34		
	ttaaacadat gttatctact ccaacatcaa ggtcggaccc attggcagca ccggcaaccc	60	
	tagcggc	67	
45	<210> 35		
	<211> 50		
	<212> ADN		
	<213> Cebador		
50	<400> 35		
	tatatcggc cgcaccggtg cgtcaggctt tcgcacggag ctttacaggc	50	
	<210> 36		
	<211> 34		
55	<212> ADN		
	<213> Cebador		
	<400> 36		
60	ttgatccga gtcgcagcac cggcaaccct agcg	34	

<210> 37
 <211> 208
 <212> PRT
 <213> Melanocarpus albomyces

5

<400> 37
 Ala Asn Gly Gln Ser Thr Arg Tyr Trp Asp Cys Cys Lys Pro Ser Cys
 1 5 10 15
 Gly Trp Ala Gly Lys Gly Pro Val Asn Gln Pro Val Tyr Ser Cys Asp
 20 25 30
 Ala Asn Phe Gln Arg Ile His Asp Phe Asp Ala Val Ser Gly Cys Glu
 35 40 45
 Gly Gly Pro Ala Phe Ser Cys Ala Asp His Ser Pro Trp Ala Ile Asn
 50 55 60
 Asp Asn Leu Ser Tyr Gly Phe Ala Ala Thr Ala Leu Ser Gly Gln Thr
 65 70 75 80
 Glu Glu Ser Trp Cys Cys Ala Cys Tyr Ala Leu Thr Phe Thr Ser Gly
 85 90 95
 Pro Val Ala Gly Lys Thr Met Val Val Gln Ser Thr Ser Thr Gly Gly
 100 105 110
 Asp Leu Gly Ser Asn His Phe Asp Leu Asn Ile Pro Gly Gly Gly Val
 115 120 125
 Gly Leu Phe Asp Gly Cys Thr Pro Gln Phe Gly Gly Leu Pro Gly Ala
 130 135 140
 Arg Tyr Gly Gly Ile Ser Ser Arg Gln Glu Cys Asp Ser Phe Pro Glu
 145 150 155 160
 Pro Leu Lys Pro Gly Cys Gln Trp Arg Phe Asp Trp Phe Gln Asn Ala
 165 170 175
 Asp Asn Pro Ser Phe Thr Phe Glu Arg Val Gln Cys Pro Glu Glu Leu
 180 185 190
 Val Ala Arg Thr Gly Cys Arg Arg His Asp Asp Gly Gly Phe Ala Phe
 195 200 205

10

<210> 38
 <211> 207
 <212> PRT
 <213> Melanocarpus albomyces

15

<400> 38

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

<210> 39
<211> 208
<212> PRT
<213> Melanocarpus albomyces

<400> 39

Ala Asn Gly Gln Ser Thr Arg Tyr Trp Asp Cys Cys Lys Pro Ser Cys
1 5 10 15

Gly Trp Ala Gly Lys Gly Pro Val Asn Gln Pro Val Tyr Ser Cys Asp
20 25 30

Ala Asn Phe Gln Arg Ile His Asp Phe Asp Ala Val Ser Gly Cys Glu
35 40 45

Gly Gly Pro Ala Phe Ser Cys Ala Asp His Ser Pro Trp Ala Ile Asn
50 55 60

Asp Asn Leu Ser Tyr Gly Phe Ala Ala Thr Ala Leu Ser Gly Gln Thr
65 70 75 80

Glu Glu Ser Trp Cys Cys Ala Cys Tyr Ala Leu Thr Phe Thr Ser Gly
85 90 95

Pro Val Ala Gly Lys Thr Met Val Val Gln Ser Thr Ser Thr Gly Gly
100 105 110

Asp Leu Gly Ser Asn His Phe Asp Leu Asn Ile Pro Gly Gly Gly Val
115 120 125

Gly Leu Phe Asp Gly Cys Thr Pro Gln Phe Gly Gly Leu Pro Gly Ala
130 135 140

Arg Tyr Gly Gly Ile Ser Ser Arg Gln Glu Cys Asp Ser Phe Pro Glu
145 150 155 160

Pro Leu Lys Pro Gly Cys Gln Trp Arg Phe Asp Trp Phe Gln Asn Ala
165 170 175

Asp Asn Pro Ser Phe Thr Phe Glu Arg Val Gln Cys Pro Glu Glu Leu
180 185 190

Val Ala Arg Thr Gly Cys Arg Arg His Asp Asp Gly Gly Phe Pro Ala
195 200 205

<210> 40

<211> 208

<212> PRT

<213> Melanocarpus albomyces

<400> 40

ES 2 458 301 T3

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

<210> 41

<211> 388

5 <212> PRT

<213> Melanocarpus albomyces

<400> 41

ES 2 458 301 T3

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

ES 2 458 301 T3

Val Asp Thr Arg Arg Pro Phe Thr Val Val Thr Gln Phe Pro Ala Asp
260 265 270

Ala Glu Gly Arg Leu Glu Ser Ile His Arg Leu Tyr Val Gln Asp Gly
275 280 285

Lys Val Ile Glu Ser Tyr Val Val Asp Ala Pro Gly Leu Pro Arg Thr
290 295 300

Asp Ser Leu Asn Asp Glu Phe Cys Ala Ala Thr Gly Ala Ala Arg Tyr
305 310 315 320

Leu Asp Leu Gly Gly Thr Ala Gly Met Gly Asp Ala Met Thr Arg Gly
325 330 335

Met Val Leu Ala Met Ser Ile Trp Trp Asp Glu Ser Gly Phe Met Asn
340 345 350

Trp Leu Asp Ser Gly Glu Ala Gly Pro Cys Leu Pro Asp Glu Gly Asp
355 360 365

Pro Lys Asn Ile Val Lys Val Glu Pro Ser Pro Glu Val Thr Tyr Ser
370 375 380

Asn Leu Arg Trp
385

<210> 42
<211> 421
5 <212> PRT
<213> Melanocarpus albomyces

<400> 42
Gln Arg Ala Gly Asn Glu Thr Pro Glu Asn His Pro Pro Leu Thr Trp
1 5 10 15

Gln Arg Cys Thr Ala Pro Gly Asn Cys Gln Thr Val Asn Ala Glu Val
20 25 30

Val Ile Asp Ala Asn Trp Arg Trp Leu His Asp Asp Asn Met Gln Asn
35 40 45

Cys Tyr Asp Gly Asn Gln Trp Thr Asn Ala Cys Ser Thr Ala Thr Asp
50 55 60

Cys Ala Glu Lys Cys Met Ile Glu Gly Ala Gly Asp Tyr Leu Gly Thr
65 70 75 80

ES 2 458 301 T3

Tyr Gly Ala Ser Thr Ser Gly Asp Ala Leu Thr Leu Lys Phe Val Thr
 85 90 95
 Lys His Glu Tyr Gly Thr Asn Val Gly Ser Arg Phe Tyr Leu Met Asn
 100 105 110
 Gly Pro Asp Lys Tyr Gln Met Phe Asn Leu Met Gly Asn Glu Leu Ala
 115 120 125
 Phe Asp Val Asp Leu Ser Thr Val Glu Cys Gly Ile Asn Ser Ala Leu
 130 135 140
 Tyr Phe Val Ala Met Glu Glu Asp Gly Gly Met Ala Ser Tyr Pro Ser
 145 150 155 160
 Asn Gln Ala Gly Ala Arg Tyr Gly Thr Gly Tyr Cys Asp Ala Gln Cys
 165 170 175
 Ala Arg Asp Leu Lys Phe Val Gly Gly Lys Ala Asn Ile Glu Gly Trp
 180 185 190
 Lys Ser Ser Thr Ser Asp Pro Asn Ala Gly Val Gly Pro Tyr Gly Ser
 195 200 205
 Cys Cys Ala Glu Ile Asp Val Trp Glu Ser Asn Ala Tyr Ala Phe Ala
 210 215 220
 Phe Thr Pro His Ala Cys Thr Thr Asn Glu Tyr His Val Cys Glu Thr
 225 230 235 240
 Thr Asn Cys Gly Gly Thr Tyr Ser Glu Asp Arg Phe Ala Gly Lys Cys
 245 250 255
 Asp Ala Asn Gly Cys Asp Tyr Asn Pro Tyr Arg Met Gly Asn Pro Asp
 260 265 270
 Phe Tyr Gly Lys Gly Lys Thr Leu Asp Thr Ser Arg Lys Phe Thr Val
 275 280 285
 Val Ser Arg Phe Glu Glu Asn Lys Leu Ser Gln Tyr Phe Ile Gln Asp
 290 295 300
 Gly Arg Lys Ile Glu Ile Pro Pro Pro Thr Trp Glu Gly Met Pro Asn
 305 310 315 320
 Ser Ser Glu Ile Thr Pro Glu Leu Cys Ser Thr Met Phe Asp Val Phe
 325 330 335
 Asn Asp Arg Asn Arg Phe Glu Glu Val Gly Gly Phe Glu Gln Leu Asn
 340 345 350

Asn Ala Leu Arg Val Pro Met Val Leu Val Met Ser Ile Trp Asp Asp
355 360 365

His Tyr Ala Asn Met Leu Trp Leu Asp Ser Ile Tyr Pro Pro Glu Lys
370 375 380

Glu Gly Gln Pro Gly Ala Ala Arg Gly Asp Cys Pro Thr Asp Ser Gly
385 390 395 400

Val Pro Ala Glu Val Glu Ala Gln Phe Pro Asp Ala Gln Val Val Trp
405 410 415

Ser Asn Ile Arg Phe
420

<210> 43

<211> 430

5 <212> PRT

<213> Thermoascus aurantiacus

<400> 43

Gln Gln Ala Gly Thr Val Thr Ala Glu Asn His Pro Ser Leu Thr Trp
1 5 10 15

Gln Gln Cys Ser Ser Gly Gly Ser Cys Thr Thr Gln Asn Gly Lys Val
20 25 30

Val Ile Asp Ala Asn Trp Arg Trp Val His Thr Thr Ser Gly Tyr Thr
35 40 45

Asn Cys Tyr Thr Gly Asn Thr Trp Asp Thr Ser Ile Cys Pro Asp Asp
50 55 60

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

Thr Tyr Gly Val Thr Thr Ser Gly Asn Ala Leu Arg Leu Asn Phe Val
85 90 95

Thr Gln Ser Ser Gly Lys Asn Ile Gly Ser Arg Leu Tyr Leu Leu Gln
100 105 110

Asp Asp Thr Thr Tyr Gln Ile Phe Lys Leu Leu Gly Gln Glu Phe Thr
115 120 125

Phe Asp Val Asp Val Ser Asn Leu Pro Cys Gly Leu Asn Gly Ala Leu
130 135 140

ES 2 458 301 T3

Tyr Phe Val Ala Met Asp Ala Asp Gly Gly Leu Ser Lys Tyr Pro Gly
 145 150 155 160
 Asn Lys Ala Gly Ala Lys Tyr Gly Thr Gly Tyr Cys Asp Ser Gln Cys
 165 170 175
 Pro Arg Asp Leu Lys Phe Ile Asn Gly Gln Ala Asn Val Glu Gly Trp
 180 185 190
 Gln Pro Ser Ala Asn Asp Pro Asn Ala Gly Val Gly Asn His Gly Ser
 195 200 205
 Cys Cys Ala Glu Met Asp Val Trp Glu Ala Asn Ser Ile Ser Thr Ala
 210 215 220
 Val Thr Pro His Pro Cys Asp Thr Pro Gly Gln Thr Met Cys Gln Gly
 225 230 235 240
 Asp Asp Cys Gly Gly Thr Tyr Ser Ser Thr Arg Tyr Ala Gly Thr Cys
 245 250 255
 Asp Pro Asp Gly Cys Asp Phe Asn Pro Tyr Arg Gln Gly Asn His Ser
 260 265 270
 Phe Tyr Gly Pro Gly Gln Ile Val Asp Thr Ser Ser Lys Phe Thr Val
 275 280 285
 Val Thr Gln Phe Ile Thr Asp Asp Gly Thr Pro Ser Gly Thr Leu Thr
 290 295 300
 Glu Ile Lys Arg Phe Tyr Val Gln Asn Gly Lys Val Ile Pro Gln Ser
 305 310 315 320
 Glu Ser Thr Ile Ser Gly Val Thr Gly Asn Ser Ile Thr Thr Glu Tyr
 325 330 335
 Cys Thr Ala Gln Lys Ala Ala Phe Gly Asp Asn Thr Gly Phe Phe Thr
 340 345 350
 His Gly Gly Leu Gln Lys Ile Ser Gln Ala Leu Ala Gln Gly Met Val
 355 360 365
 Leu Val Met Ser Leu Trp Asp Asp His Ala Ala Asn Met Leu Trp Leu
 370 375 380
 Asp Ser Thr Tyr Pro Thr Asp Ala Asp Pro Asp Thr Pro Gly Val Ala
 385 390 395 400
 Arg Gly Thr Cys Pro Thr Thr Ser Gly Val Pro Ala Asp Val Glu Ser
 405 410 415

Gln Tyr Pro Asn Ser Tyr Val Ile Tyr Ser Asn Ile Lys Val
420 425 430

<210> 44
<211> 69
<212> PRT
<213> Trichoderma reesei

<400> 44
Thr Gly Asn Pro Ser Gly Gly Asn Pro Pro Gly Gly Asn Pro Pro Gly
1 5 10 15

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

Pro Thr Gln Ser His Tyr Gly Gln Cys Gly Gly Ile Gly Tyr Ser Gly
35 40 45

Pro Thr Val Cys Ala Ser Gly Thr Thr Cys Gln Val Leu Asn Pro Tyr
50 55 60

Tyr Ser Gln Cys Leu
65

<210> 45
<211> 69
<212> PRT
<213> Trichoderma reesei

<400> 45
Thr Gly Asn Pro Ser Gly Gly Asn Pro Pro Gly Gly Asn Pro Pro Gly
1 5 10 15

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

Pro Thr Gln Ser His Tyr Gly Gln Cys Gly Gly Ile Gly Tyr Ser Gly
35 40 45

Pro Thr Val Cys Ala Ser Gly Thr Thr Cys Gln Val Leu Asn Pro Ala
50 55 60

Tyr Ser Gln Cys Leu
65

<210> 46
<211> 69
<212> PRT
<213> Trichoderma reesei

<400> 46

Thr Gly Asn Pro Ser Gly Gly Asn Pro Pro Gly Gly Asn Pro Pro Gly
1 5 10 15

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

Pro Thr Gln Ser His Tyr Gly Gln Cys Gly Gly Ile Gly Tyr Ser Gly
35 40 45

Pro Thr Val Cys Ala Ser Gly Thr Thr Cys Gln Val Leu Asn Pro Tyr
50 55 60

Ala Ser Gln Cys Leu
65

<210> 47

<211> 69

<212> PRT

<213> Trichoderma reesei

<400> 47

Thr Gly Asn Pro Ser Gly Gly Asn Pro Pro Gly Gly Asn Pro Pro Gly
1 5 10 15

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

Pro Thr Gln Ser His Tyr Gly Gln Cys Gly Gly Ile Gly Tyr Ser Gly
35 40 45

Pro Thr Val Cys Ala Ser Gly Thr Thr Cys Gln Val Leu Asn Pro Trp
50 55 60

Tyr Ser Gln Cys Leu
65

<210> 48

<211> 69

<212> PRT

<213> Trichoderma reesei

<400> 48

Thr Gly Asn Pro Ser Gly Gly Asn Pro Pro Gly Gly Asn Pro Pro Gly
1 5 10 15

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

Pro Thr Gln Ser His Tyr Gly Gln Cys Gly Gly Ile Gly Tyr Ser Gly
35 40 45

Pro Thr Val Cys Ala Ser Gly Thr Thr Cys Gln Val Leu Asn Pro Ala
50 55 60

Ala Ser Gln Cys Leu
65

<210> 49

<211> 58

<212> PRT

<213> Trichoderma reesei

<400> 49

Thr Gly Asn Pro Ser Thr Thr Thr Thr Arg Arg Pro Ala Thr Thr Thr
1 5 10 15

Gly Ser Ser Pro Gly Pro Thr Gln Ser His Tyr Gly Gln Cys Gly Gly
20 25 30

Ile Gly Tyr Ser Gly Pro Thr Val Cys Ala Ser Gly Thr Thr Cys Gln
35 40 45

Val Leu Asn Pro Tyr Tyr Ser Gln Cys Leu
50 55

<210> 50

<211> 42

<212> PRT

<213> Trichoderma reesei

<400> 50

Thr Gly Asn Pro Ser Pro Thr Gln Ser His Tyr Gly Gln Cys Gly Gly
1 5 10 15

Ile Gly Tyr Ser Gly Pro Thr Val Cys Ala Ser Gly Thr Thr Cys Gln
20 25 30

Val Leu Asn Pro Tyr Tyr Ser Gln Cys Leu
35 40

REIVINDICACIONES

1. Una proteína de fusión de celulasa que comprende

una primera secuencia de aminoácidos de un núcleo de celulasa, que es la celulasa 20 K de *Melanocarpus albomyces* de SEC ID N°: 2 o una modificación de la misma seleccionada del grupo que consiste en: la delección de Ala en la posición 207, la delección de Val en la posición 208, la sustitución de Phe209Trp y la inserción de Pro después de la posición 206, y

una segunda secuencia de aminoácidos de un engarce y dominio de unión a celulosa, CBD, que es el engarce y el CBD de la celobiohidrolasa I de *Trichoderma reesei* de SEC ID N°: 4, o una modificación de la misma seleccionada del grupo que consiste en: la sustitución de tirosina en la posición 492, posición 31 del CBD, 493, posición 32 del CBD, de la CBHI madura de *T. reesei* con un aminoácido alifático o aromático, y las delecciones de los aminoácidos 434 a 444 o 434 a 460 de la secuencia de la CBHI madura de *T. reesei*,

en la que dicha primera secuencia de aminoácidos y dicha segunda secuencia de aminoácidos están conectados por una región de unión que tiene la fórmula:

¹Val – ²Gln – ³Ile – ⁴Pro – ⁵Ser – ⁶Ser, o

¹Gly – ²Glu – ³Ile – ⁴Gly – ⁵Ser.

2. La proteína de fusión de celulasa de la reivindicación 1, en la que dicha primera secuencia de aminoácidos es una modificación de la SEC ID N°: 2 seleccionada del grupo que consiste en: la delección de Ala en la posición 207, la delección de Val en la posición 208, la sustitución de Phe209Trp y la inserción de Pro después de la posición 206, y/o dicha segunda secuencia de aminoácidos es una modificación del engarce y del CBD de la SEC ID N°: 4 seleccionada del grupo que consiste en: la sustitución de tirosina en la posición 492, posición 31 del CBD, 493, posición 32 del CBD, de la CBHI madura de *T. reesei*, con un aminoácido alifático o aromático, y las delecciones de los aminoácidos 434 a 444 o 434 a 460 de la secuencia de la CBHI madura de *T. reesei*.

3. La proteína de fusión de celulasa de la reivindicación 2, en la que en dicha segunda secuencia de aminoácidos, el aminoácido tirosina en la posición 492, posición 31 del CBD, y/o 493, posición 32 del CBD, de la CBHI madura de *Trichoderma reesei* está sustituido con alanina y/o con triptófano.

4. La proteína de fusión de celulasa de la reivindicación 3, en la que dicha segunda secuencia de aminoácidos se selecciona de un grupo de SEC ID N°: 45, 46, 47 y 48.

5. La proteína de fusión de celulasa de la reivindicación 2, en la que en dicha segunda secuencia de aminoácidos los aminoácidos 434 a 444 o 434 a 460 de la secuencia de la CBHI madura de *Trichoderma reesei* está delecionada.

6. La proteína de fusión de celulasa de la reivindicación 1, en la que dicha segunda secuencia de aminoácidos se selecciona de un grupo de SEC ID N°: 44, 49 y 50.

7. La proteína de fusión de celulasa de la reivindicación 2, en la que en dicha primera secuencia de aminoácidos el aminoácido valina en la posición 208 de la secuencia de celulasa 20K de *Melanocarpus albomyces* de SEC ID N°: 2 se ha delecionado.

8. La proteína de fusión de celulasa de la reivindicación 2, en la que en dicha primera secuencia de aminoácidos el aminoácido alanina en la posición 207 de la secuencia de celulasa 20K de *Melanocarpus albomyces* de SEC ID N°: 2 se ha delecionado.

9. La proteína de fusión de celulasa de la reivindicación 2, en la que en dicha primera secuencia de aminoácidos el aminoácido fenilalanina en la posición 209 de la secuencia de celulasa 20K de *Melanocarpus albomyces* de SEC ID N°: 2 se ha sustituido con Trp.

10. La proteína de fusión de celulasa de la reivindicación 2, en la que dicha primera secuencia de aminoácidos contiene una prolina insertada después de la posición 206 en la secuencia de celulasa 20K de *Melanocarpus albomyces* de SEC ID N°: 2.

11. La proteína de fusión de celulasa de la reivindicación 2, en la que dicha primera secuencia de aminoácidos se selecciona de un grupo de SEC ID N°: 37, 38, 39 y 40.

12. La proteína de fusión de celulasa de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en la que una preparación que contiene dicha proteína de fusión se ha estabilizado adicionalmente por tratamiento con calor.

13. Un vector de expresión que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica una primera secuencia de aminoácidos de un núcleo de celulasa, que es la celulasa 20K de *Melanocarpus albomyces* de SEC ID N°: 2 o una

modificación de la misma seleccionada del grupo que consiste en: la delección de Ala en la posición 207, la delección de Val en la posición 208, la sustitución de Phe209Trp y la inserción de Pro después de la posición 206, y una secuencia de polinucleótidos que codifica una segunda secuencia de aminoácidos de un engarce y un dominio de unión a celulosa, CBD, que es el engarce y el CBD de la celobiohidrolasa I de *Trichoderma reesei* de SEC ID N°: 4, o una modificación de la misma seleccionada del grupo que consiste en: la sustitución de tirosina en la posición 492, posición 31 del CBD, 493, posición 32 del CBD, de la CBHI madura de *T. reesei*, con un aminoácido alifático o aromático, y las delecciones de los aminoácidos 434 a 444 o 434 a 460 de la secuencia de la CBHI madura de *T. reesei*, y una secuencia de polinucleótidos que codifica una región de unión que conecta dicha primera y segunda secuencia de aminoácidos, teniendo dicha región de unión la fórmula:

¹Val – ²Gln – ³Ile – ⁴Pro – ⁵Ser – ⁶Ser, o

¹Gly – ²Glu – ³Ile – ⁴Gly – ⁵Ser.

14. El vector de expresión de la reivindicación 13, en el que la primera secuencia de aminoácidos está codificada por la SEC ID N°: 1, y la segunda secuencia de aminoácidos está codificada por la SEC ID N°: 3.

15. El vector de expresión de la reivindicación 13 o 14, en el que dicha primera secuencia de aminoácidos es una modificación de la SEC ID N°: 2 seleccionada del grupo que consiste en: la delección de Ala en la posición 207, la delección de Val en la posición 208, la sustitución de Phe209Trp y la inserción de Pro después de la posición 206, y/o dicha secuencia de aminoácidos es una modificación del engarce y CBD de SEC ID N°: 4 seleccionada del grupo que consiste en: la sustitución de tirosina en la posición 492, posición 31 del CBD, 493, posición 32 del CBD de la CBHI madura de *T. reesei* con un aminoácido alifático o aromático y las delecciones 434 a 444 o 434 a 460 de la secuencia de la CBHI madura de *T. reesei*.

16. El vector de expresión de la reivindicación 15, que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica dicha segunda secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de SEC ID N°: 45, 46, 47 y 48.

17. El vector de expresión de la reivindicación 15, que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica dicha segunda secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de SEC ID N°: 49 y 50.

18. El vector de expresión de la reivindicación 15, que comprende un polinucleótido que codifica dicha primera secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de SEC ID N°: 37, 38, 39 y 40.

19. Una célula hospedadora que comprende un vector de expresión como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 18.

20. La célula hospedadora de la reivindicación 19, que es de origen fúngico.

21. La célula hospedadora de la reivindicación 20, que pertenece a hongos filamentosos.

22. La célula hospedadora de la reivindicación 20 o 21, que pertenece al género *Trichoderma* o *Aspergillus*.

23. La célula hospedadora de la reivindicación 22, que es *Trichoderma reesei*.

24. Un proceso para la producción de una proteína de fusión de celulasa como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 que comprende las etapas de cultivar la célula hospedadora de una cualquiera de las reivindicaciones 20 a 23 y recuperar la proteína del medio de cultivo.

25. Una preparación enzimática que comprende una proteína de fusión de celulasa como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.

26. Un proceso de biolavado a la piedra que comprende la etapa de añadir una proteína de fusión de celulasa, como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 o la preparación de la reivindicación 25, a tejidos o prendas que contienen algodón.

27. El proceso de la reivindicación 26, en el que los tejidos o las prendas son de tela vaquera.

28. Un proceso de bioacabado, que comprende la etapa de añadir una proteína de fusión de celulasa, como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 o la preparación de la reivindicación 25, a materiales textiles como tejidos o prendas o hilo.

29. El proceso de la reivindicación 28, en el que los materiales textiles se confeccionan con fibras que contienen celulosa natural o con fibras que contienen celulosa fabricada por el hombre o mezclas de las mismas.

30. El proceso de la reivindicación 28, en el que los materiales textiles son mezclas de fibras sintéticas y fibras que contienen celulosa.

31. Una composición de detergente que comprende una proteína de fusión de celulasa, como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 o la preparación enzimática de la reivindicación 25 y auxiliares, tales como

agentes activos en superficie, tensioactivos, agentes blanqueantes o sintetizantes.

32. Un método de tratamiento de fibra celulósica que contiene material textil, en el que dicho método comprende poner en contacto dicho material textil con la composición de detergente de la reivindicación 31.

5 33. Un método para el tratamiento de pasta o fibra derivada de madera, que comprende la etapa de añadir una proteína de fusión de celulasa, como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 o la preparación de la reivindicación 25, a pasta química o mecánica derivada de madera o a fibra secundaria.

34. Un método para mejorar la calidad de piensos para animales, que comprende tratar un material vegetal con una proteína de fusión de celulasa, como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 o la preparación de la reivindicación 25.

Fig. 1

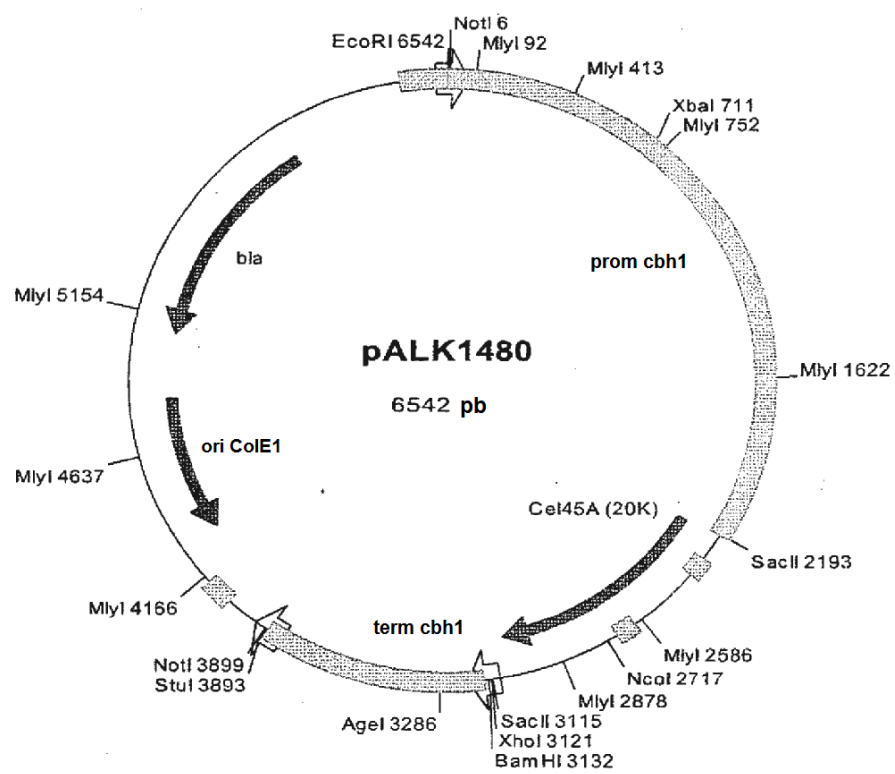


Fig. 2

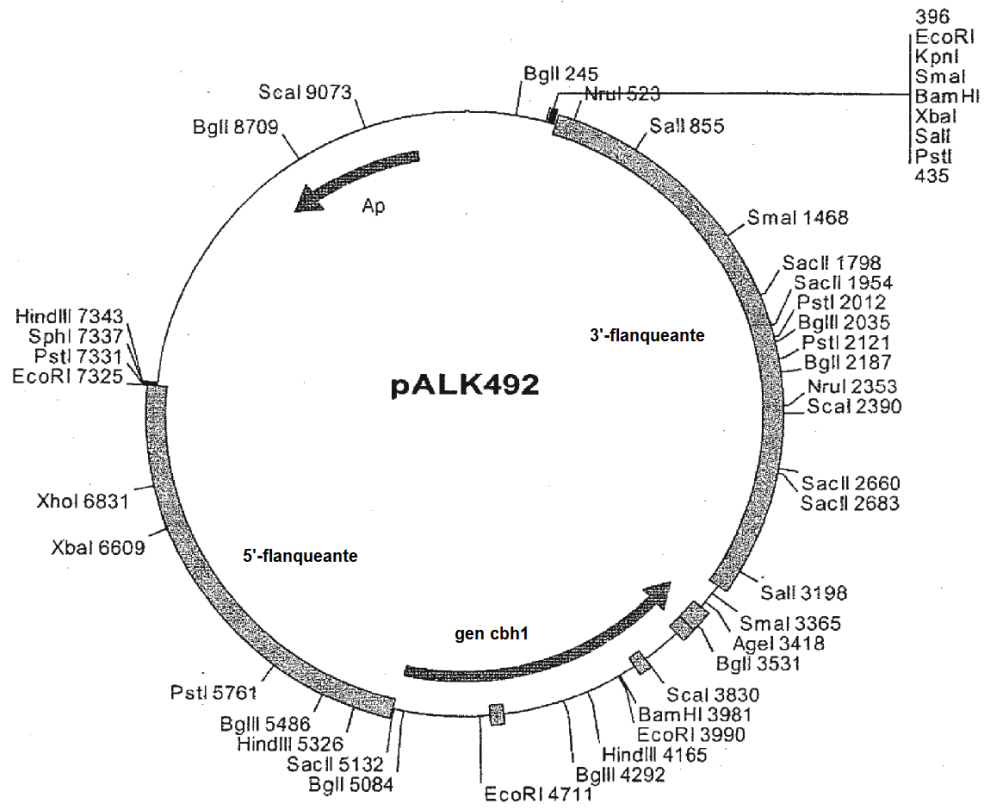


Fig. 3

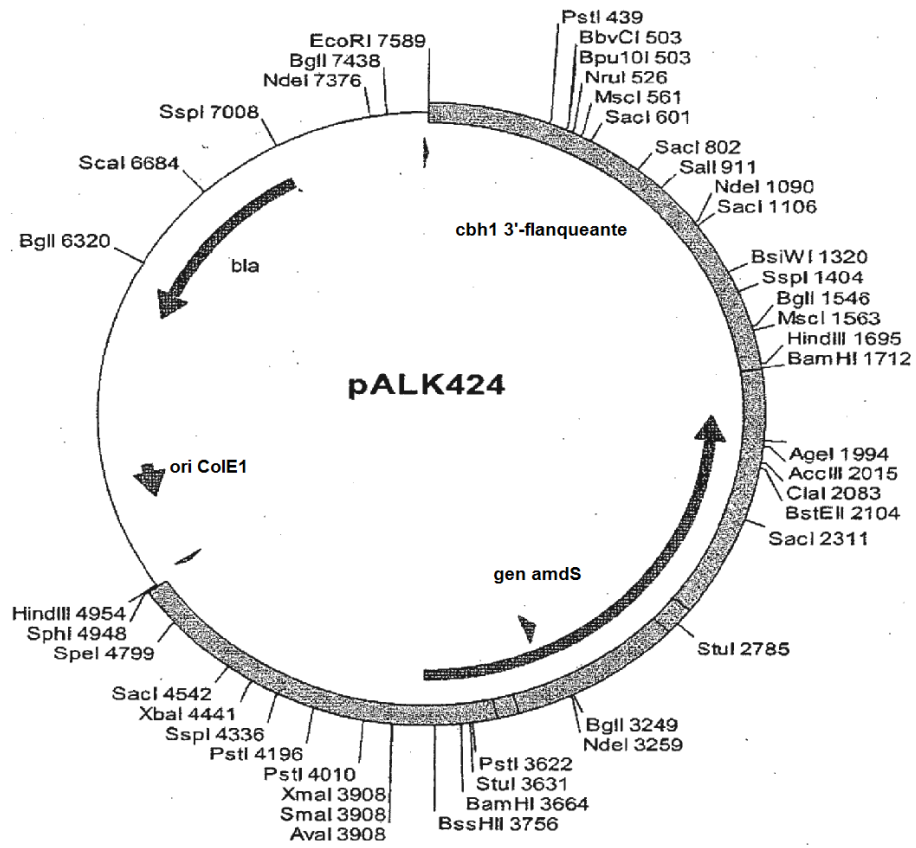


Fig. 4

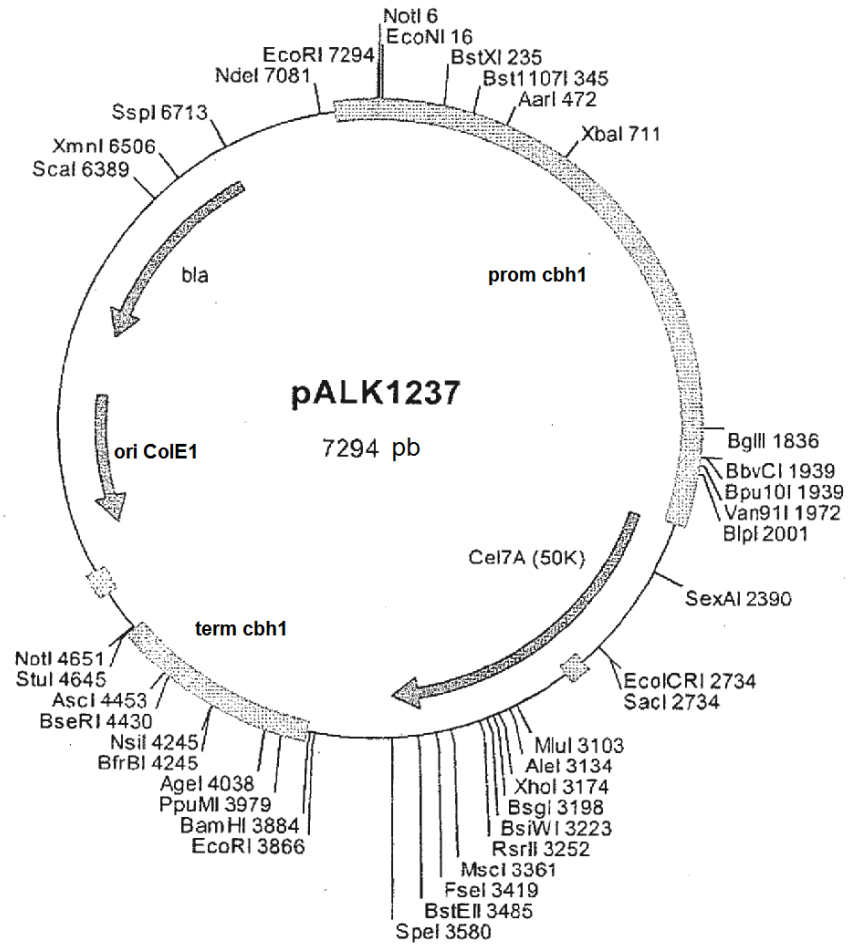


Fig. 5

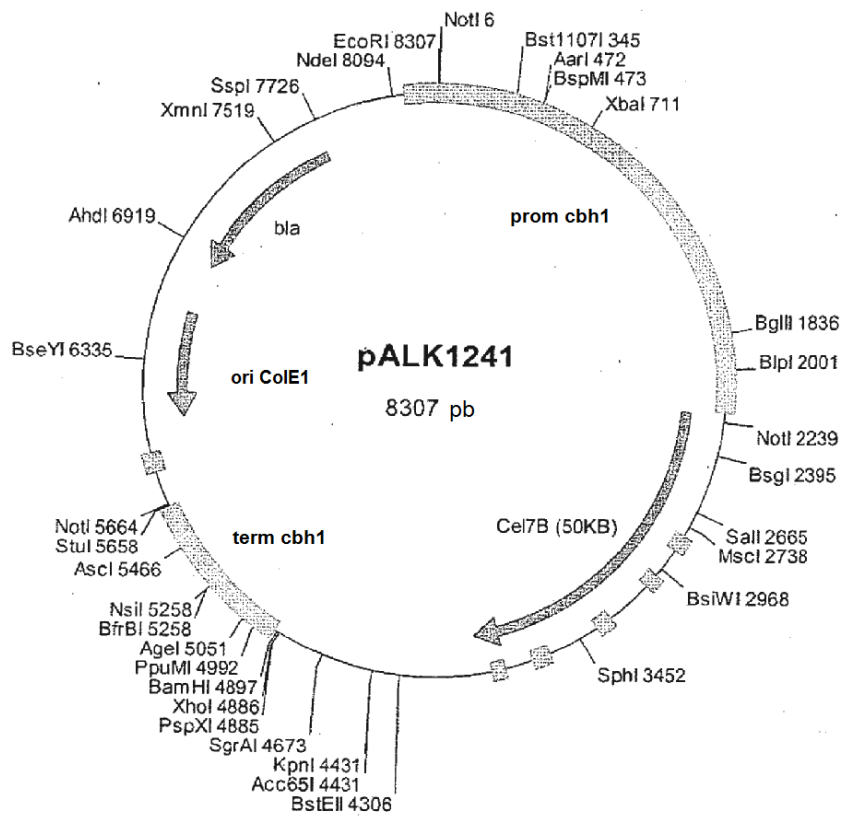


Fig. 6

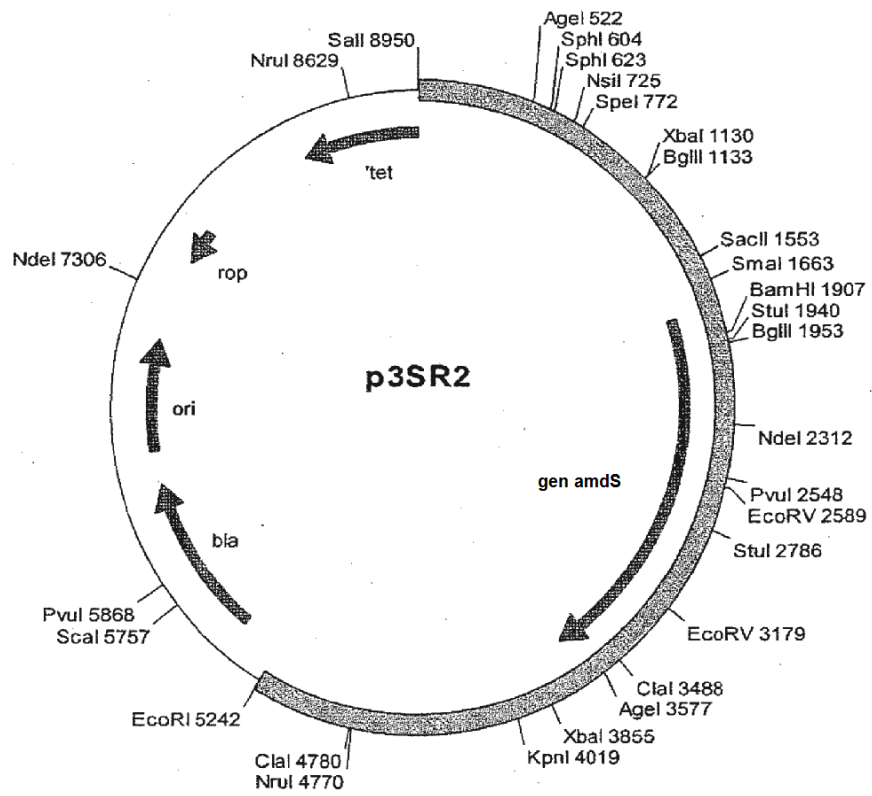


Fig. 7

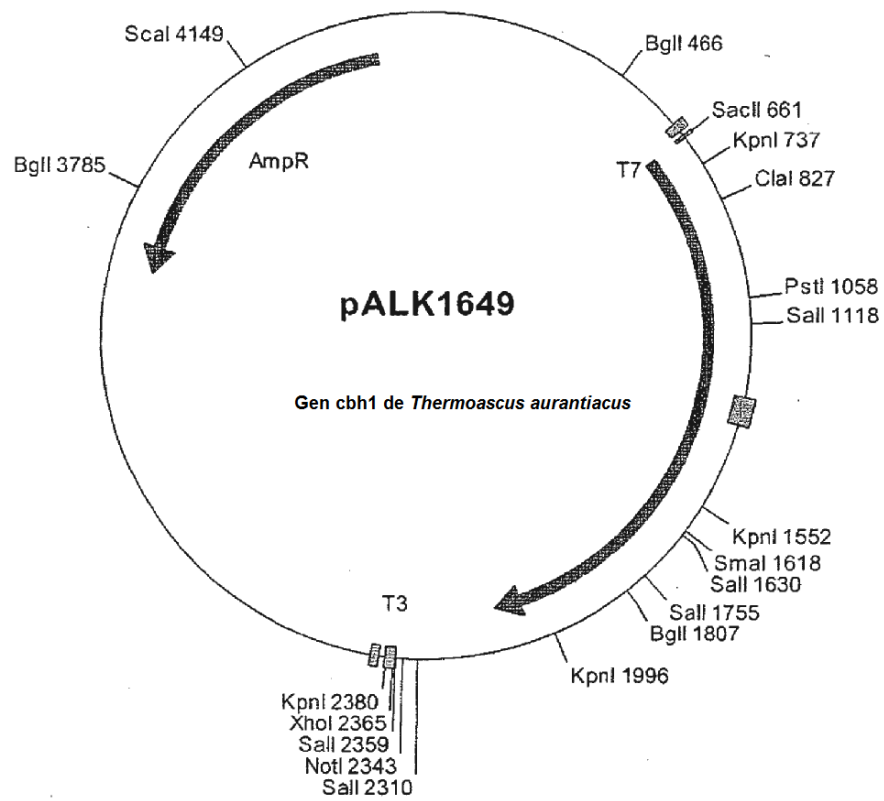


Fig. 8

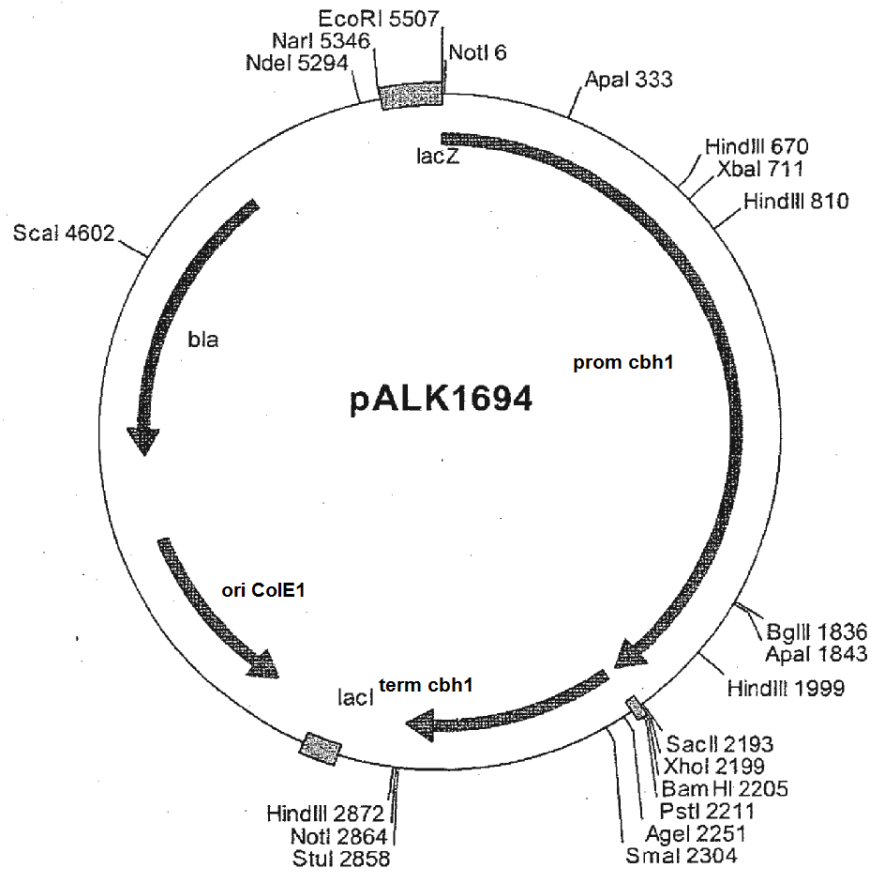
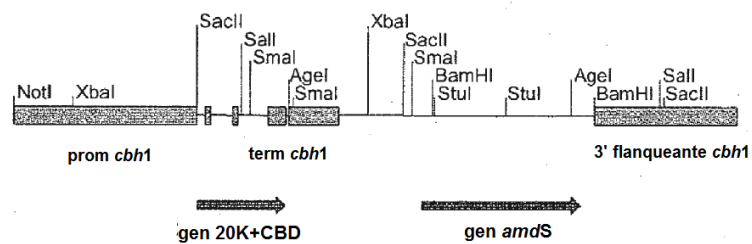


Fig. 9

A)



B)

Proteína de fusión 20K+CBD:

M. albomyces
20K

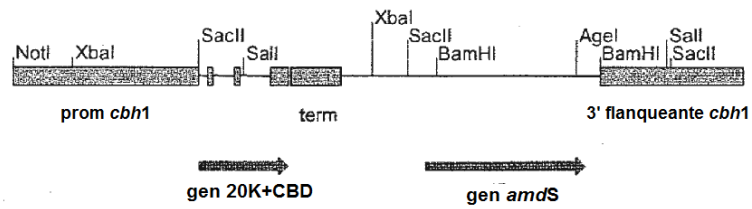
CBHI de *T. reesei*
Engarce CBD

pALK1434: D G G F A V F K A P S G S T G N P S...T¹ Q ... Y Y S Q C L

pALK1435: D G G F A V F K A P S G G N...T¹ Q ... Y Y S Q C L

Fig. 10

A)



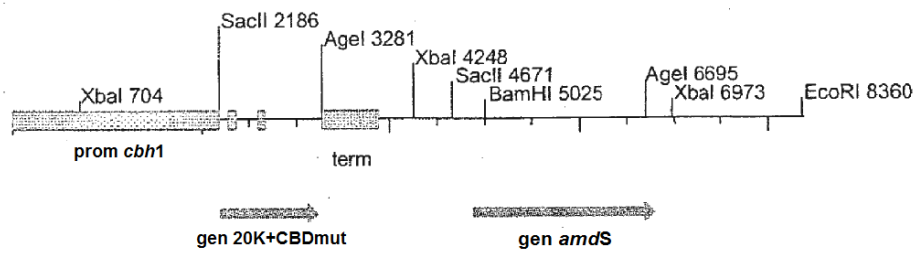
B)

Proteína de fusión 20K+CBD:

<i>M. albomyces</i>		CBHI de <i>T. reesei</i>
20K	Unión	Engarce CBD
pALK1768: D G G F A F G P I G S T G <u>N P S...T¹</u> Q ... Y Y S Q C L		
pALK1769: D G G F W G E I G S T G <u>N P S...T¹</u> Q ... Y Y S Q C L		
pALK1770: D G G F P A V Q I P S S T G <u>N P S...T¹</u> Q ... Y Y S Q C L		
pALK1775: D G G F A W G E I G S T G <u>N P S...T¹</u> Q ... Y Y S Q C L		

Fig. 11

A)



B)

Proteína de fusión 20K+CBD_{mut}:

M. albomyces
20K Unión

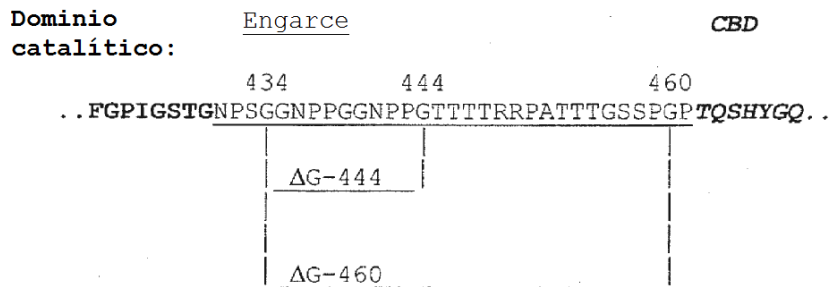
CBHI de *T. reesei*
Engarce CBD

D G G F P A V Q I P S S T G N P S...T¹ Q S H Y...N P Y³¹ Y³² S Q C L

pALK1877: N P A³¹ Y³² S Q C L
pALK1878: N P Y³¹ A³² S Q C L
pALK1879: N P W³¹ Y³² S Q C L
pALK1880: N P A³¹ A³² S Q C L

Fig. 12

A)



B)

Deleciones de engarce 20K+CBD:

<i>M. albomyces</i>		CBHI de <i>T. reesei</i>
20K	Unión	Engarce CBD

pALK1893:DGGF PAVQIPSS TGNPSTTTTTRRPATTTGSSSPGPT¹Q...P Y³¹ Y³² S Q C L

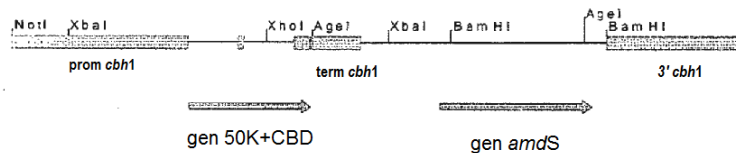
pALK1896:DGGF PAVQIPSS TGNPSP T¹Q...P Y³¹ Y³² S Q C L

pALK1899:DGGF PAVQIPSS TGNPSTTTTTRRPATTTGSSSPGPT¹Q...P A³¹ A³² S Q C L

pALK1952:DGGF PAVQIPSS TGNPSP T¹Q...P A³¹ A³² S Q C L

Fig. 13

A)



B)

Proteína de fusión de 50 K de *Melanocarpus albomyces*:

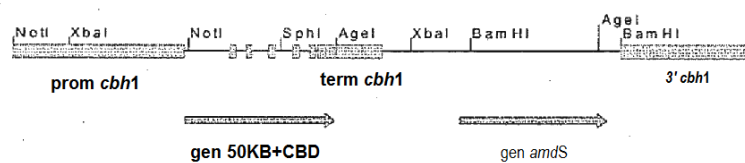
M. albomyces
50K

CBHI de *T. reesei*
Engarce CBD

N L R W G E I G S T G N P S ... T¹ Q S H Y...N P Y Y S Q C L

Fig. 14

A)



B)

Proteína de fusión de 50 KB de *Melanocarpus albomyces*:

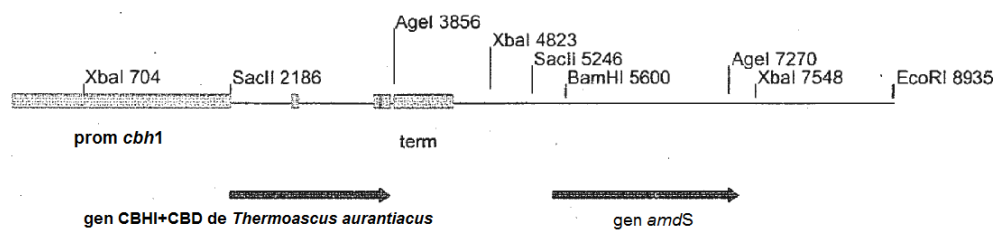
M. albomyces
50KB

CBHI de *T. reesei*
Engarce CBD

N I R F G P I G S T G N P S ... T¹ Q S H Y...N P Y Y S Q C L

Fig. 15

A)



B)

Proteína de fusión CBHI + CBD de *Thermoascus aurantiacus*:

<i>T. aurantiacus</i>		CBHI de <i>T. reesei</i>
CBHI	Unión	<u>Engarce</u> CBD

N I K V G P I G S T G N P S...T¹ Q S H Y...N P Y Y S Q C L

Fig. 16

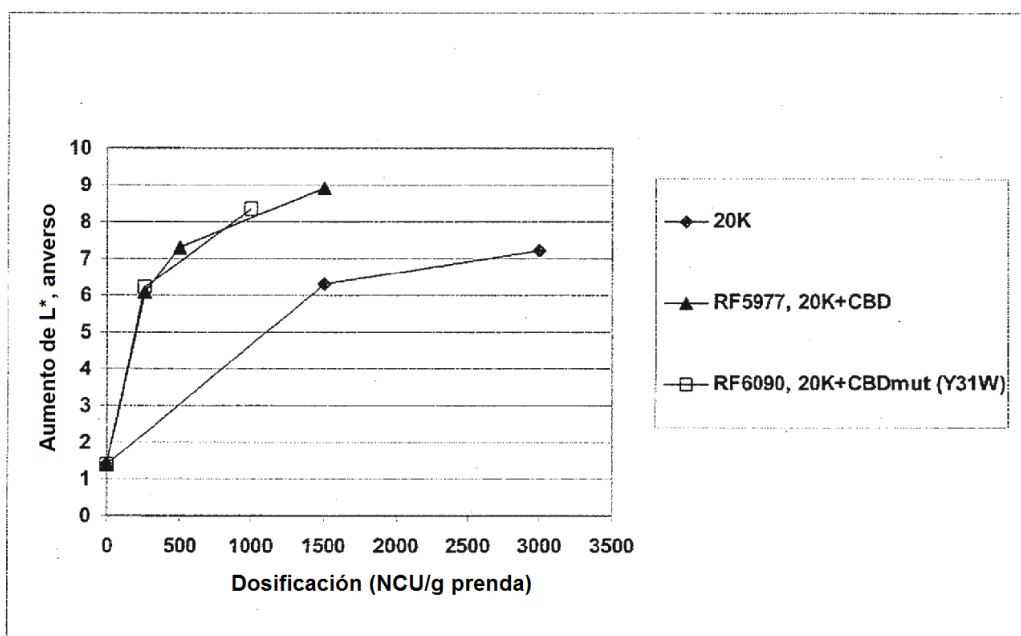
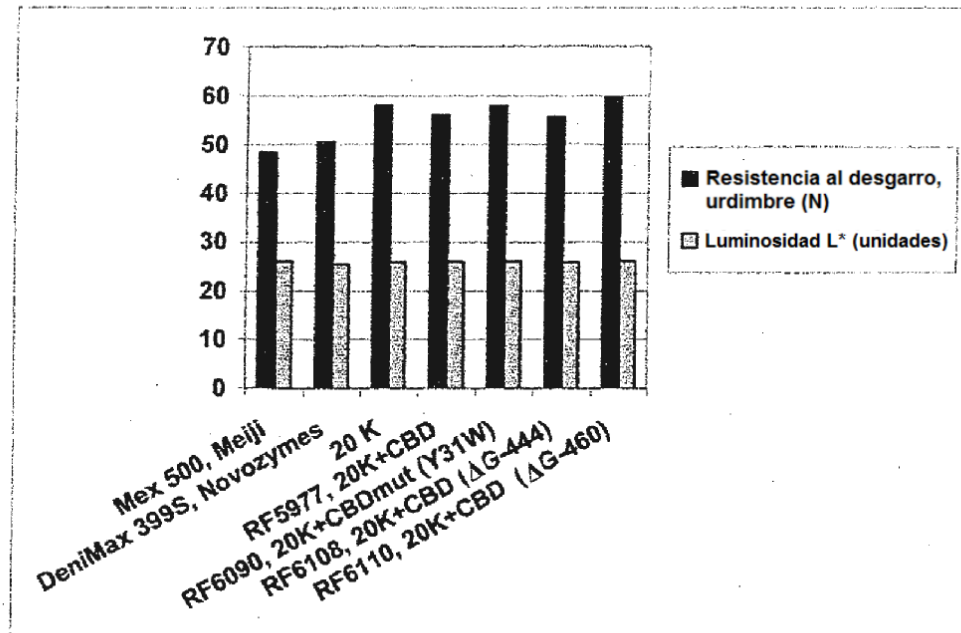


Fig 17
A



B

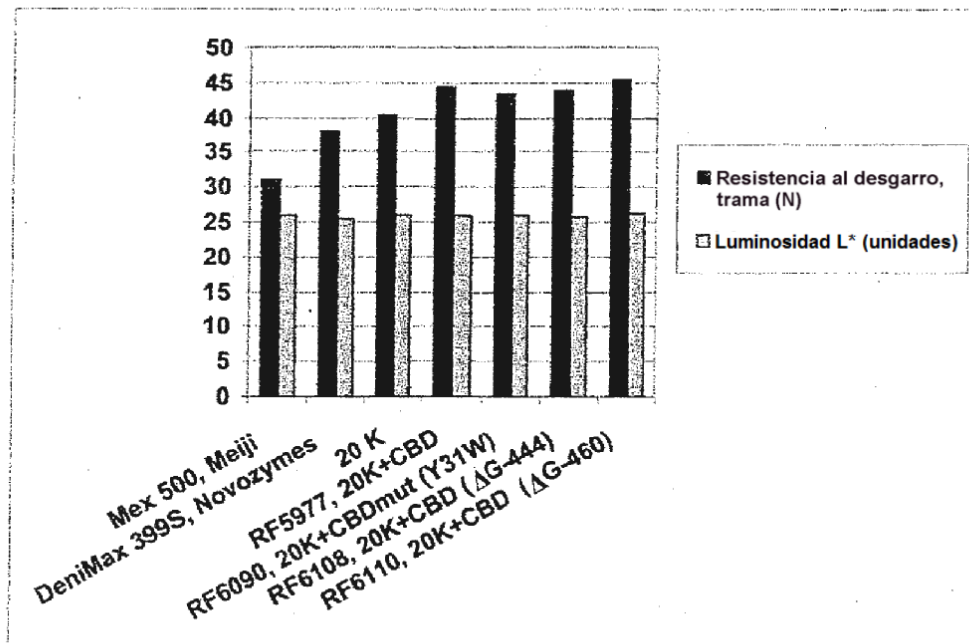


Fig. 18

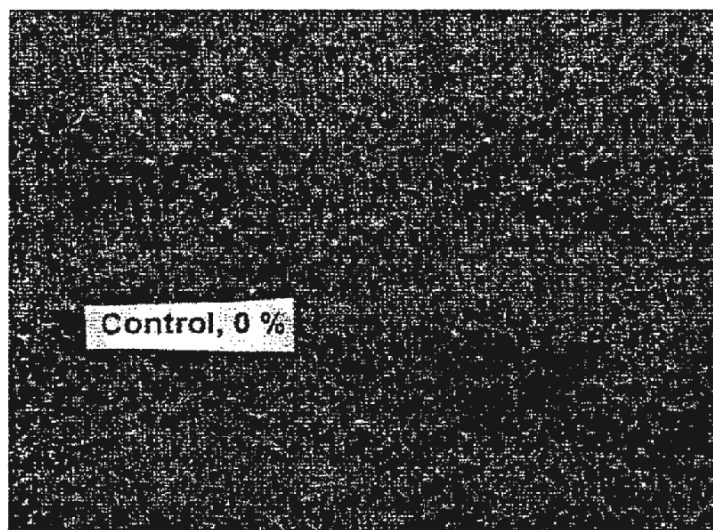
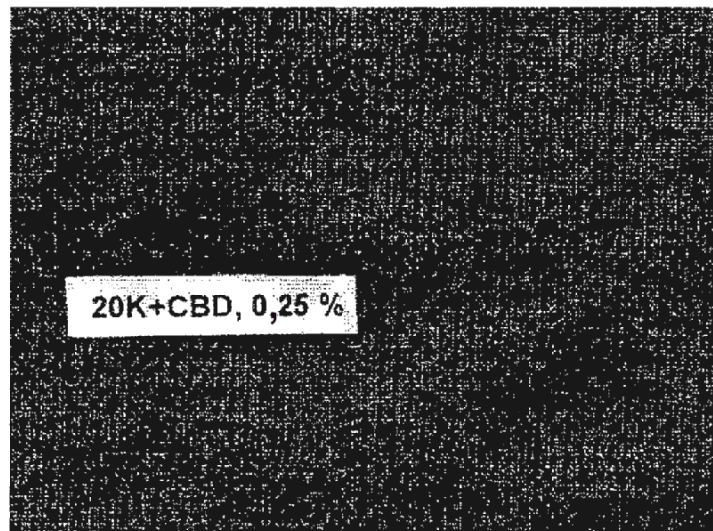


Fig. 19 A

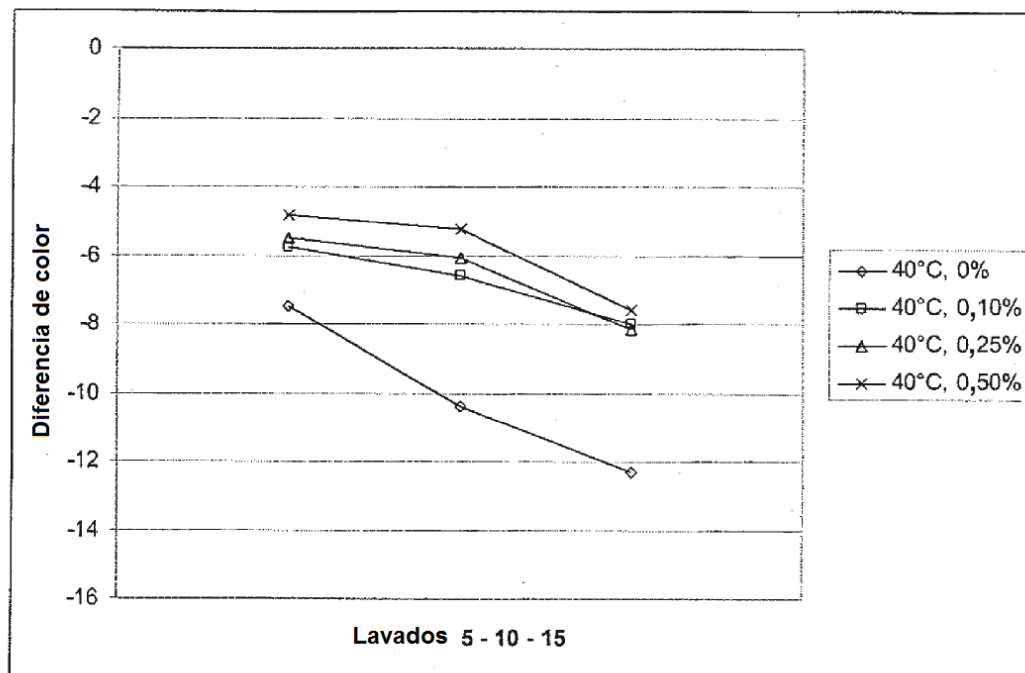


Fig. 19 B

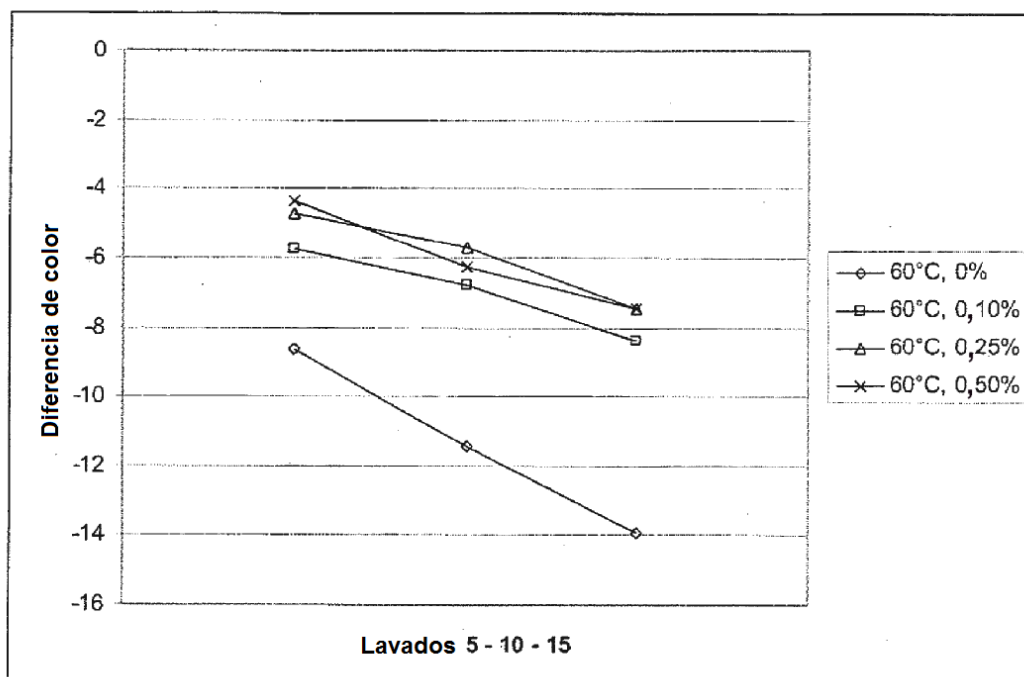


Fig. 20 A

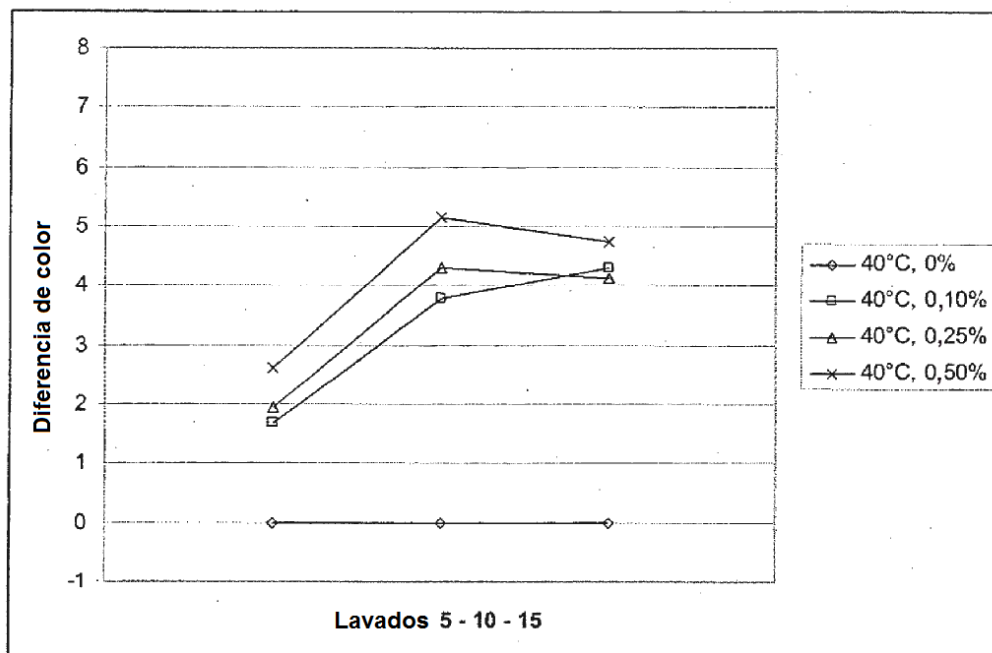


Fig. 20 B

