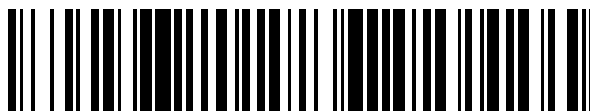


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 521 615**

51 Int. Cl.:

C12N 9/42 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.06.2002 E 02735093 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.08.2014 EP 1399543**

54 Título: **Endo-beta-1,4-gluconasa**

30 Prioridad:

06.06.2001 DK 200100879

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

13.11.2014

73 Titular/es:

**NOVOZYMES A/S (100.0%)
Krogshøjvej 36
2880 Bagsvaerd, DK**

72 Inventor/es:

**OUTTRUP, HELLE;
SCHÜLEIN, MARTIN;
ESKELUND, MAD S BJORN VAD y
GIBSON, KEITH**

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 521 615 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

Endo-beta-1,4-glucanasa.

5 [0001] La presente invención se refiere a una enzima que muestra actividad de endo-beta-1,4-glucanasa, esta enzima es endógena de la cepa de la especie *Bacillus*, DSM 12648, para una molécula de polinucleótido aislado que codifica tal endo-beta-1,4-glucanasa, y al uso de la enzima en la industria del detergente, del papel y la pulpa, de las perforaciones petrolíferas, de la extracción petrolífera, del vino y del zumo, de los ingredientes alimenticios, del pienso para animales o textil.

10

Antecedentes de la invención

15 [0002] La celulosa es un polímero de glucosa enlazado por enlaces beta-1,4-glucosídicos. Las cadenas de celulosa forman numerosos enlaces de hidrógeno intra e intermoleculares, que suponen la formación de micro fibrillas de celulosa insolubles. La hidrólisis microbiana de celulosa a glucosa implica las siguientes tres clases principales de celulasas: (i) endoglucanasas (EC 3.2.1.4) que disocian enlaces beta-1,4-glucosídicos aleatoriamente a lo largo de moléculas de celulosa, también denominadas endo-beta-1,4-glucanasas, (ii) celobiohidrolasas (EC 3.2.1.91) que asimilan celulosa a partir del extremo no reducido, liberando celobiosa y (iii) beta-glucosidasas (EC 3.2.1.21) que hidrolizan celobiosa y celodextrinas de bajo peso molecular para liberar glucosa.

20

[0003] Los enlaces beta-1,4-glucosídicos están también presentes en otros polímeros de origen natural, por ejemplo en los beta-glucanos de plantas tales como la cebada y la avena. En algunos casos, las endoglucanasas también proporcionan hidrólisis de tales polímeros no celulósicos.

25

[0004] Las celulasas son producidas por muchos microorganismos y frecuentemente están presentes en formas múltiples. El reconocimiento de la importancia económica de la degradación enzimática de celulosa ha favorecido una amplia búsqueda de celulasas microbianas, que se puedan usar industrialmente. Como resultado, las propiedades enzimáticas y las estructuras primarias de un gran número de celulasas se han investigado. Basándose en los resultados de un análisis de agrupamiento hidrofóbico de la secuencia de aminoácidos del dominio catalítico, estas celulasas se han colocado en familias diferentes de glicosil hidrolasas. Las glicosil hidrolasas bacterianas y fúngicas se han reagrupado en 35 familias (Henrissat, B.: A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* 280 (1991), 309-316 . Henrissat, B., and Bairoch, A.: New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* 293 (1993), 781-788.). La mayoría de las celulasas consisten en un dominio de unión a la celulosa (CBD) y un dominio catalítico (CAD) separado por un enlazador que puede ser rico en prolina y residuos de hidroxiaminoácidos. Otra clasificación de celulasas se ha establecido basándose en la similitud de sus CBDs (Gilkes *et al.* (1991)) dando cinco familias de glicosil hidrolasas (I-V).

30

[0005] Las celulasas son sintetizadas por un gran número de microorganismos que incluyen hongos, actinomicetos, mixobacterias y bacterias reales, pero también por plantas. Especialmente endo-beta-1,4-glucanasas de una amplia variedad de especificidades se han identificado. Muchas endoglucanasas bacterianas se han descrito (Gilbert, H.J. and Hazlewood, G.P. (1993) *J. Gen. Microbiol.* 139:187-194 . Henrissat, B., and Bairoch, A.: New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* 293 (1993), 781-788.).

35

[0006] Un uso industrial importante de enzimas celulolíticas es para el tratamiento de la pasta de papel, por ejemplo para mejorar el drenaje o para destintar el papel reciclado. Otro uso industrial importante de las enzimas celulolíticas es para el tratamiento de tejidos o textiles celulósicos, por ejemplo, como ingredientes en composiciones detergentes o composiciones de suavizantes textiles, para el biopulido de telas nuevas (acabado de las prendas) y para obtener un aspecto de "lavado a la piedra" del tejido que contiene celulosa, especialmente tela vaquera, y diferentes métodos para este tipo de tratamiento se han sugerido, por ejemplo en las GB-A-1 368 599, EP-A-0 307 564 y EP-A-0 435 876, WO 91/17243, WO 91/10732, WO 91/17244, WO 95/24471 y WO 95/26398. La solicitud de patente japonesa nº 13049/1999 divulga una celulasa alcalina resistente al calor derivada de la especie *Bacillus* KSM-S237 (depositada como FERM-P-16067) adecuada para detergentes.

40

[0007] Existe una constante necesidad de proporcionar enzimas de celulasa nuevas o preparaciones enzimáticas que se puedan usar para aplicaciones donde la actividad de celulasa, preferiblemente una endo-beta-1,4-glucanasa, (EC 3,2,1,4) sea deseable.

45

[0008] El objetivo de la presente invención es proporcionar enzimas nuevas y composiciones enzimáticas que tengan actividad sustancial de beta-1,4-glucanasa bajo condiciones de ligeramente ácidas a alcalinas y rendimiento mejorado en el tratamiento de la pasta de papel, tratamiento textil, procesos de lavandería, procesos de extracción o el pienso para animales; preferiblemente tales nuevas endoglucanasas que tienen buenos rendimientos se pueden producir o se producen usando técnicas recombinantes en altos rendimientos.

50

55

Resumen de la invención

[0009] Los inventores han encontrado una enzima nueva que tiene actividad sustancial de endo-beta-1,4-glucanasa (clasificada según la nomenclatura enzimática como EC 3.2.1.4), esta enzima es endógena de una cepa de la especie *Bacillus* AA349 (DSM 12648), y los inventores han conseguido con éxito la clonación y la expresión de una secuencia de ADN que codifica tal enzima. La endo-beta-1,4-glucanasa de la invención tiene propiedades de estabilidad y actividad que la hacen excepcionalmente adecuada para usarla en aplicaciones que implican soluciones alcalinas acuosas que contienen surfactantes y/o blanqueantes. Tales condiciones de aplicación se encuentra de forma muy común, tanto en detergentes domésticos como industriales, tratamientos de acabado textil y en la producción o reciclaje de pulpas celulósicas.

[0010] Debido a que la beta-1,4-glucanasa de la invención mantiene su actividad hasta un grado excepcional bajo tales condiciones de aplicación pertinentes, se contempla que será más útil que otras enzimas conocidas, por ejemplo, cuando se usa en detergentes, para el procesamiento de papel/pulpa o para tratamientos textiles.

[0011] También cabe destacar que la beta-1,4-glucanasa de la invención no es significativamente inactivada por iones de Fe(II). Una sensibilidad de la actividad enzimática a la presencia de iones ferrosos podrían plantear restricciones en la aplicabilidad de la enzima, tal como en procesos que tengan lugar en contenedores metálicos.

[0012] Por consiguiente, en su primer aspecto, la presente invención se refiere a una enzima que muestra actividad de endo-beta-1,4-glucanasa (EC 3.2.1.4), que se selecciona de uno de (a) un polipéptido codificado por la secuencia de ADN de las posiciones 1 a 2.322 de SEC ID nº 1, (b) un polipéptido producido por expresión de la secuencia de SEC ID nº: 1 por una célula huésped cultivada bajo condiciones que permitan la producción de la enzima o (c) una enzima de endo-beta-1,4-glucanasa que tiene una secuencia de al menos 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de la posición 1 a la posición 773 de SEC ID nº: 2, cuando la identidad se determina por GAP provisto en el paquete de programa GCG que utiliza una penalización de creación de GAP de 3,0 y una penalización de extensión de GAP de 0,1. (a) En su segundo aspecto, la invención se refiere a una molécula de polinucleótido aislado, preferiblemente una molécula de ADN, que codifica el dominio catalíticamente activo de una enzima que muestra actividad de endo-beta-1,4-glucanasa cuya molécula se selecciona del grupo que consiste en (a) moléculas de polinucleótidos que comprenden una secuencia de nucleótidos como se muestra en SEC ID nº: 1 desde el nucleótido 1 hasta el nucleótido 2.322, (b) moléculas de polinucleótidos que codifican un polipéptido que es al menos 99% idéntico a la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 2 del residuo de aminoácido 1 hasta el residuo de aminoácido 773 cuando la identidad se determina por GAP proporcionado en el paquete de programa GCG utilizando una penalización de creación de GAP de 3,0 y una penalización de extensión de GAP de 0,1, (c) moléculas complementarias de (a) o (b) y (d) secuencias de nucleótidos degeneradas de (a) o (b).

[0013] En su tercer, cuarto y quinto aspecto la invención proporciona un vector de expresión que comprende un segmento de ADN que es, por ejemplo, una molécula de polinucleótido de la invención, una célula que comprende el segmento de ADN o el vector de expresión y un método para producir una enzima que muestra actividad de endoglucanasa, este método comprende el cultivo de la célula bajo condiciones que permitan la producción de la enzima y recuperación de la enzima del cultivo.

[0014] En otro aspecto la invención proporciona una enzima aislada que muestra actividad de endo-beta-1,4-glucanasa, caracterizada por el hecho de que (i) está libre de impurezas homólogas y (ii) la enzima se produce por el método anteriormente descrito.

[0015] En una forma de realización preferida de la presente invención, la endoglucanasa muestra actividad a un pH en el rango de 5-11, preferiblemente con un pH óptimo en 6-10,5 y a temperaturas de 20 a 60°C.

[0016] La endoglucanasa comprende un dominio catalíticamente activo que pertenece a la familia 5 de las glicosil hidrolasas (este dominio corresponde a aproximadamente de la posición 1 a la posición 340 de SEC ID nº: 2), y un dominio de unión a la celulasa (CBD) que pertenece a la familia 17 (este dominio corresponde a aproximadamente de la posición 341 a aproximadamente la posición 540 de SEC ID nº: 2). El resto de la SEC ID nº: 2 son dominios de función desconocida.

[0017] La endoglucanasa de la invención es ventajosa en varias aplicaciones industriales, especialmente en composiciones detergentes debido a los efectos de antireposición y detergencia mejorados, y en el tratamiento de textiles.

60 Descripción detallada de la invención

[0018] La cepa de la especie *Bacillus* AA349, que se ha aislado a partir de una muestra de suelo originaria de Grecia, fue depositada por los inventores según el tratado de Budapest en el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos a los fines del Procedimiento en materia de Patentes en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1 b, D-38124 Braunschweig, República Federal Alemana, el 25 enero 1999 bajo el número de depósito DSM 12648.

5 [0019] El término "propiedades enzimáticas funcionales", como se utiliza en este caso, se refiere a propiedades físicas y químicas de un polipéptido que muestra una o más actividades catalíticas. Ejemplos de propiedades enzimáticas funcionales son la actividad enzimática, la actividad enzimática específica, la actividad enzimática relativa para la actividad máxima (medida como una función de pH o de temperatura), estabilidad (degradación de actividad enzimática a lo largo del tiempo), temperatura de fusión de DSC, secuencia de aminoácidos N-terminal, peso molecular (normalmente medido en SDS-PAGE), punto isoeléctrico (pI).

10 [0020] En el presente contexto el término "vector de expresión" denota una molécula de ADN, lineal o circular, que comprende un segmento que codifica un polipéptido de interés operativamente enlazado a segmentos adicionales que proporcionan su transcripción. Tales segmentos adicionales pueden incluir secuencias promotoras y terminadoras y puede opcionalmente incluir uno o más orígenes de replicación, uno o más marcadores seleccionables, un potenciador, una señal de poliadenilación y similares. Los vectores de expresión se derivan generalmente a partir de ADN plásmido o vírico, o puede contener elementos de ambos. El vector de expresión de la invención puede ser cualquier vector de expresión que se someta convenientemente a procedimientos de ADN recombinante, y la elección del vector dependerá frecuentemente de la célula huésped en la que el vector se vaya a introducir. Así, el vector puede ser un vector de replicación autónoma, es decir un vector que exista como una entidad extracromosómica, cuya replicación sea independiente de la replicación cromosómica, por ejemplo un plásmido. Alternativamente, el vector puede ser un vector que, cuando se introduce en una célula huésped, se integre en el genoma de la célula huésped y se replique junto con el cromosoma(s) en el que se ha integrado.

25 [0021] El término "expresado recombinante" o "expresado de forma recombinante" usado aquí en relación con la expresión de un polipéptido o proteína se define según la definición estándar de la técnica. La expresión recombinante de una proteína se realiza generalmente usando un vector de expresión como se describe inmediatamente por encima.

30 [0022] El término "aislado", cuando se aplica a una molécula de polinucleótidos, denota que el polinucleótido se ha retirado de su ambiente genético natural y está de este modo libre de otras secuencias de codificación indeseadas o extrañas, y está en una forma adecuada para uso dentro de sistemas de producción de proteínas genéticamente modificadas. Tales moléculas aisladas son las que están separadas de su entorno natural e incluyen clones genómicos y de ADNc. Las moléculas de ADN aisladas de la presente invención están libres de otros genes con los que están habitualmente asociadas, pero pueden incluir las regiones no traducidas 5' y 3' de origen natural tales como promotores y terminadores. La identificación de regiones asociadas será evidente para un experto en la materia (véase, por ejemplo, Dynan and Tijan, Nature 316:774-78, 1985). El término "un polinucleótido aislado" se puede denominar alternativamente "un polinucleótido clonado".

35 [0023] Cuando se aplica a una proteína/polipéptido, el término "aislado" indica que la proteína se encuentra en una condición diferente de su entorno nativo. En una forma preferida, la proteína aislada está sustancialmente libre de otras proteínas, particularmente otras proteínas homólogas (es decir, "impurezas homólogas" (véase más adelante)). Se prefiere proporcionar la proteína en una forma superior al 40% pura, más preferiblemente forma superior al 60% pura.

40 [0024] Incluso más preferiblemente se prefiere proporcionar la proteína en una forma altamente purificada, es decir, más de 80% pura, más preferiblemente superior al 95% pura, e incluso más preferiblemente superior al 99% pura, según se determinó por SDS-PAGE.

45 [0025] El término "proteína/polipéptido aislado" se puede denominar de forma alternativa "proteína/polipéptido purificado".

50 [0026] El término "impurezas homólogas" se refiere a cualquier impureza (p. ej. un polipéptido diferente del polipéptido de la invención), que se origine a partir de la célula homóloga de la que el polipéptido de la invención se obtiene originalmente.

55 [0027] El término "obtenido a partir de", como se utiliza en este caso en relación con una fuente microbiana específica, significa que el polinucleótido y/o polipéptido es producido por la fuente específica, o por una célula en la que un gen de la fuente se ha insertado.

[0028] El término "operativamente enlazado", cuando se refiere a segmentos de ADN, denota que los segmentos están dispuestos de modo que funcionen de concierto para sus fines previstos, por ejemplo la transcripción se inicia en el promotor y procede a través del segmento de codificación al terminador.

60 [0029] El término "polinucleótido" denota un polímero mono o bicatenario de bases desoxirribonucleótidas o ribonucleótidas leído desde el extremo 5' al 3'. Polinucleótidos incluyen ARN y ADN, y se pueden aislar a partir de fuentes naturales, sintetizados *in vitro*, o preparadas a partir de una combinación de moléculas sintéticas y naturales.

65 [0030] El término "complementos de moléculas de polinucleótidos" denota moléculas de polinucleótidos que tienen una secuencia de base complementaria y orientación inversa en comparación con una secuencia de referencia. Por ejemplo, la secuencia 5' ATGCACGGG 3' es complementaria de 5' CCCGTGCAT 3'.

[0031] El término "secuencia de nucleótidos degenerada" denota una secuencia de nucleótidos que incluye uno o más codones degenerados (en comparación con una molécula de polinucleótido de referencia que codifica un polipéptido). Los codones degenerados contienen tripletes diferentes de nucleótidos, pero codifican el mismo residuo de aminoácido (es decir, los tripletes GAU y GAC codifican cada uno Asp).

[0032] El término "promotor" denota una parte de un gen que contiene secuencias de ADN que proporciona la unión de ARN-polimerasa y la iniciación de la transcripción. Secuencias promotoras se encuentran habitualmente, pero no siempre, en las regiones no codificantes de genes 5'.

[0033] El término "secuencia de señal secretora" denota una secuencia de ADN que codifica un polipéptido (un "péptido secretor") que, como componente de un polipéptido mayor, dirige el polipéptido mayor a través de una vía secretora de una célula en la que es sintetizado. El péptido mayor se divide comúnmente para eliminar el péptido secretor durante el tránsito a través de la vía secretora.

Polinucleótidos:

[0034] Entre las formas de realización preferidas de la invención, un polinucleótido aislado de la invención hibridará a regiones de tamaños similares de SEC ID n°: 1 o una secuencia complementaria de la misma, bajo al menos condiciones de astringencia medias.

[0035] En particular, polinucleótidos de la invención hibridarán a una sonda de ADN bicatenaria desnaturalizada que comprende bien la secuencia completa que codifica el dominio catalítico de la enzima cuya secuencia se muestra en las posiciones 1- 2.322 de SEC ID n°: 1 o cualquier sonda que comprenda una subsecuencia de SEC ID n°: 1 que tenga una longitud de al menos aproximadamente 100 pares de bases bajo al menos condiciones de astringencia medias, pero preferiblemente en condiciones de astringencia altas como se describe en detalle más adelante. Condiciones experimentales adecuadas para determinar la hibridación a astringencia media o alta entre una sonda de nucleótidos y una secuencia de ARN o ADN homólogo implica el prelavado del filtro que contiene los fragmentos de ADN o ARN para hibridar en 5 x SSC (cloruro de sodio/citrato de sodio, Sambrook *et al.* (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*, Cold Spring Harbor lab., Cold Spring Harbor, NY) durante 10 min, y prehibridación del filtro en una solución de 5 x SSC, 5 x solución de Denhardt (Sambrook *et al.* 1989), 0,5% de SDS y 100 µg/ml de ADN de esperma del salmón desnaturalizado y sometido a un baño de ultrasonido (Sambrook *et al.* 1989), seguido de hibridación en la misma solución que contiene una concentración de 10ng/ml de una sonda cebada de forma aleatoria (Feinberg, A.P. and Vogelstein, B. (1983) *Anal. Biochem.* 132:6-13), etiquetada 32P-dCTP (actividad específica superior a 1 x 10⁹ CPM/micro g) durante 12 horas a aprox. 45°C. El filtro se lava luego dos veces durante 30 minutos en 2 x SSC, 0,5% de SDS a al menos 60°C (astringencia media), de forma aún más preferible a al menos 65°C (astringencia media/alta), incluso más preferiblemente a al menos 70°C (astringencia alta), e incluso más preferiblemente a al menos 75°C (astringencia muy alta).

[0036] Las moléculas a las que la sonda de oligonucleótidos hibridiza bajo estas condiciones se detectan utilizando una película de rayos x.

[0037] Como se ha mencionado previamente, los polinucleótidos aislados de la presente invención incluyen ADN y ARN. Métodos para el aislamiento de ADN y ARN se conocen en la técnica. ADN y ARN que codifican genes de interés se pueden clonar en los bancos de genes o bibliotecas de ADN a través de los métodos conocidos en la técnica.

[0038] Polipéptidos que codifican polinucleótidos que tienen actividad de endoglucanasa de la invención se identifican luego y se aíslan, por ejemplo, mediante hibridación o PCR.

[0039] La presente invención proporciona además polipéptidos y polinucleótidos equivalentes de distintas cepas bacterianas (ortólogos o parálogos). De interés particular son los polipéptidos de endoglucanasa de cepas alcalofílicas gram-positivas, incluyendo las especies de *Bacillus*.

[0040] Especies homólogas de un polipéptido con actividad de endoglucanasa de la invención se pueden clonar utilizando información y composiciones proporcionadas por la presente invención en combinación con técnicas de clonación convencionales. Por ejemplo, una secuencia de ADN de la presente invención se puede clonar utilizando ADN cromosómico obtenido a partir de un tipo célula que exprese la proteína. Fuentes adecuadas de ADN se pueden identificar mediante el sondeo de transferencias de Northern con sondas diseñadas a partir de las secuencias descritas aquí. Luego se prepara una biblioteca a partir de ADN cromosómico de una línea celular positiva. Una secuencia de ADN de la invención que codifica un polipéptido que tiene actividad de endoglucanasa se puede aislar después mediante una variedad de métodos, tales como mediante el sondeo con sondas diseñadas a partir de las secuencias descritas en la presente especificación y reivindicaciones o con uno o más conjuntos de sondas degeneradas basadas en las secuencias descritas. Una secuencia de ADN de la invención se puede clonar también utilizando la reacción en cadena de polimerasa, o PCR (Mullis, Patente EEUU 4,683,202), utilizando cebadores diseñados a partir de las secuencias descritas aquí. En un método adicional, la biblioteca de ADN se puede utilizar para transformar o transfectar células huésped, y la expresión del ADN de interés se puede detectar con un anticuerpo (monoclonal o policlonal)

dirigido contra la endoglucanasa clonada de la especie de *B.*, DSM 12648, expresada y purificada como se describe en Materiales y Métodos y en los ejemplos 1 y 2, o por una prueba de actividad de un polipéptido que tiene actividad de endoglucanasa.

5 [0041] La parte codificante de la endoglucanasa de la secuencia de ADN mostrada en la SEC ID nº: 1 y/o una secuencia de ADN análoga de la invención se puede clonar a partir de una cepa de la especie *Bacillus* de especies bacterianas, preferiblemente la cepa DSM12648, produciendo la enzima con actividad de endoglucanasa, u otro organismo u organismo relacionado como se describe en la presente.

10 [0042] Cómo usar una secuencia de la invención para obtener otras secuencias relacionadas: la información de secuencia descrita aquí sobre una secuencia polinucleótida que codifica un endo-beta-1,4-glucanasa de la invención se pueden usar como herramienta para identificar otras endoglucanasas homólogas. Por ejemplo, la reacción en cadena de polimerasa (PCR) se puede utilizar para amplificar las secuencias que codifican otras endoglucanasas homólogas de una variedad de fuentes microbianas, en particular de diferentes especies de *Bacillus*.

15 Polipéptidos:

[0043] La secuencia de aminoácidos de la posición 1 a la posición 773 de SEC ID nº: 2 es una secuencia de endoglucanasa madura con un peso molecular calculado de 86 kDa. Se cree que las posiciones 1 a aproximadamente 340 de SEC ID nº: 2 son el dominio catalíticamente activo de la presente enzima de endoglucanasa. También se cree que las posiciones de aproximadamente 340 a aproximadamente 540 son el dominio de enlace a la celulosa de la presente enzima de endoglucanasa. La función del resto de la secuencia, es decir, desde aproximadamente la posición 540 a la posición 773, se desconoce actualmente.

25 [0044] La presente invención proporciona una enzima de endoglucanasa que comprende (i) la secuencia de aminoácidos de la posición 1 a la posición 773 de SEC ID nº: 2 o un fragmento de la misma que tiene actividad de endoglucanasa.

[0045] Un fragmento de la posición 1 a la posición 773 de SEC ID nº: 2 es un polipéptido, que tiene uno o más aminoácidos eliminados del amino y/o carboxi terminal de esta secuencia de aminoácidos. En una forma de realización, la presente invención proporciona una enzima de endoglucanasa que comprende (ii) la secuencia de aminoácidos de las posiciones 1 a aproximadamente 340 de SEC ID nº: 2, ya que se contempla que tal endoglucanasa mono dominio sea también útil en las aplicaciones industriales descritas aquí. En otra forma de realización, la presente invención proporciona una enzima de endoglucanasa que comprende (iii) la secuencia de aminoácidos de las posiciones 1 a desde aproximadamente entre 540 y 773 de SEC ID nº: 2, que se contempla que tal endoglucanasa que comprende el dominio catalíticamente activo y el dominio de unión a la celulosa sea también útil en las aplicaciones industriales descritas aquí. En una forma de realización preferida tal fragmento es un polipéptido que consiste de la posición 1 a la posición 663 ±50 aminoácidos, preferiblemente 1 a 663 ± 25 aminoácidos.

40 [0046] La presente invención también proporciona polipéptidos de endoglucanasa que son sustancialmente homólogos al polipéptido de (i), (ii) o (iii) anteriores y homólogos de especies (parálogos u ortólogos) de los mismos. El término "sustancialmente homólogo" se utiliza en este caso para indicar polipéptidos que son al menos 97%, preferiblemente 98%, de forma más preferida 98,5% idénticos, y de la forma más preferida 99% o más idénticos a la secuencia mostrada en los aminoácidos número 1-773 de SEC ID nº: 2, o un fragmento de los mismos que tenga actividad de endoglucanasa, o sus ortólogos o parálogos. El porcentaje de identidad de secuencia se determina por métodos convencionales, mediante programas informáticos conocidos en la técnica tales como GAP, del paquete de programa GCG (Program Manual for the Wisconsin Package, Version 8, August 1994, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711) como se describe en Needleman, S.B. y Wunsch, C.D., (1970), Journal of Molecular Biology, 48, 443-453. GAP se usa con los siguientes ajustes para comparación de secuencias polipeptídicas: penalización de creación de GAP de 3,0 y penalización de extensión de GAP de 0,1.

50 [0047] La identidad de secuencia de las moléculas de polinucleótidos se determina por métodos similares utilizando GAP con los siguientes ajustes para comparación de secuencias de ADN: penalización de creación de GAP de 5,0 y penalización de extensión de GAP de 0,3.

55 [0048] Proteínas y polipéptidos sustancialmente homólogos se caracterizan por tener una o más sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos. Estos cambios son preferiblemente de poca importancia, es decir, sustituciones de aminoácidos conservadoras (véase la tabla 2) y otras sustituciones que no afectan significativamente al plegado o la actividad de la proteína o polipéptido, pequeñas deleciones, típicamente de uno a aproximadamente 30 aminoácidos y pequeñas extensiones de amino- o carboxi-terminal, tales como un residuo de metionina aminoterminal, un péptido enlazador pequeño de hasta aproximadamente 20-25 residuos, o una extensión pequeña que facilita la purificación (una etiqueta de afinidad), tal como un tracto de polihistidina, proteína A (Nilsson *et al.*, EMBO J. 4:1075, 1985 ; Nilsson *et al.*, Methods Enzymol. 198:3, 1991. Véase, en general Ford *et al.*, Protein Expression and Purification 2: 95-107, 1991). ADNs que codifican etiquetas de afinidad están comercialmente disponibles a través de proveedores comerciales (p. ej., Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ; New England Biolabs, Beverly, MA).

[0049] No obstante, aunque los cambios descritos anteriormente preferiblemente son de poca importancia, tales cambios puede ser también de mayor importancia, tales como la fusión de polipéptidos mayores de hasta 300 aminoácidos o más como extensiones tanto amino- como carboxi-terminales para un polipéptido de la invención que tiene actividad de endoglucanasa.

5

Tabla 1

Sustituciones de aminoácidos conservadoras

Básica:	arginina lisina histidina
Acídica:	ácido glutámico ácido aspártico
Polar:	glutamina asparagina
Hidrofóbica:	leucina isoleucina valina
Aromática:	fenilalanina triptófano tirosina
Pequeña:	glicina alanina serina treonina metionina

10

[0050] Además de los 20 aminoácidos estándar, se pueden sustituir aminoácidos no estándar (tales como 4-hidroxiprolina, 6-*N*-metil lisina, ácido 2-aminoisobutírico, isovalina y α -metil serina) para residuos de aminoácidos de un polipéptido según la invención. Un número limitado de aminoácidos no conservadores, aminoácidos que no están codificados por el código genético, y aminoácidos no naturales se puede sustituir por residuos de aminoácidos. Los "aminoácidos no naturales" se han modificado después de la síntesis de proteína, y/o tienen una estructura química en cualquier cadena lateral que no sea la de los aminoácidos estándar. Los aminoácidos no naturales se pueden sintetizar químicamente, o preferiblemente, están comercialmente disponibles, e incluyen ácido pipercolico, ácido carboxílico de tiazolidina, dehidroprolina, 3- y 4-metilprolina y 3,3-dimetilprolina.

15

20

[0051] Los aminoácidos esenciales de los polipéptidos de endoglucanasa de la presente invención se pueden identificar según procedimientos conocidos en la técnica, tales como mutagénesis dirigida al sitio o mutagénesis de escaneado de alanina (Cunningham and Wells, Science 244: 1081-1085, 1989). En esta técnica, mutaciones de alanina únicas se introducen en cada residuo de la molécula y las moléculas mutantes resultantes se evalúan para actividad biológica (es decir, actividad de endoglucanasa) para identificar residuos de aminoácidos que sean críticos para la actividad de la molécula. Véase también, Hilton *et al.*, J. Biol. Chem. 271:4699-4708, 1996. El sitio activo de la enzima u otra interacción biológica se puede determinar también por análisis físico de estructura, según se determinó por tales técnicas como resonancia magnética nuclear, cristalografía, difracción de electrones o marcaje por fotoafinidad, conjuntamente con la mutación de aminoácidos de sitio de contacto putativo. Véase, por ejemplo, e Vos *et al.*, Science 255:306-312, 1992 ; Smith *et al.*, J. Mol. Biol. 224:899-904, 1992 ; Wlodaver *et al.*, FEBS Lett. 309:59-64, 1992. Las identidades de los aminoácidos esenciales se pueden inferir también a partir de análisis de homologías con polipéptidos que están relacionados con un polipéptido según la invención.

25

30

35

[0052] Se pueden hacer y evaluar sustituciones de aminoácidos múltiples usando métodos conocidos de mutagénesis, recombinación y/o redistribución seguidos de un procedimiento de selección pertinente, tales como los descritos por Reidhaar-Olson y Sauer (Science 241:53-57, 1988), Bowie and Sauer (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:2152-2156, 1989), WO95/17413 o WO 95/22625. En resumen, estos autores revelan métodos para simultáneamente aleatorizar dos o más posiciones en un polipéptido o recombinar/redistribuir diferentes mutaciones (WO95/17413, WO95/22625), seguido de selección para un polipéptido funcional y luego secuenciación de los polipéptidos mutagenizados para determinar el espectro de sustituciones admisibles en cada posición. Otros métodos que se pueden usar incluyen la presentación en

fagos (p. ej., Lowman *et al.*, Biochem. 30: 10832-10837, 1991 ; Ladner *et al.*, U.S. Patent No. 5,223,409 ; Huse, WIPO Publication WO 92/06204) y mutagénesis dirigida a la región (Derbyshire *et al.*, Gene 46:145, 1986 ; Ner *et al.*, DNA 7:127, 1988).

5 [0053] Métodos de mutagénesis/redistribución como se han descrito anteriormente se pueden combinar con métodos de selección automatizados de alto rendimiento para detectar actividad de polipéptidos mutagenizados clonados en células huésped.

Moléculas de ADN mutagenizadas que codifican polipéptidos activos se pueden recuperar de las células huésped y se pueden secuenciar de forma rápida utilizando equipamiento moderno. Estos métodos permiten la determinación rápida de la importancia de residuos de aminoácidos individuales en un polipéptido de interés y se pueden aplicar a polipéptidos de estructura desconocida.

10 [0054] Usando los métodos mencionados anteriormente, un técnico en la materia puede identificar y/o preparar una variedad de polipéptidos que sean sustancialmente homólogos a los polipéptidos de (I), (II) o (III) que aparecen por encima y retener la actividad de endoglucanasa de la proteína de tipo salvaje.

15 [0055] La enzima de endoglucanasa de la invención puede comprender, además del núcleo enzimático, el dominio catalíticamente activo, es decir posiciones de 1 a aproximadamente 340 de SEC ID n°: 2, también comprender un dominio de enlace a la celulosa (CBD), el dominio de enlace a la celulosa y el dominio catalíticamente activo están operativamente enlazados. El dominio de unión a la celulosa (CBD) puede existir como una parte integral de la enzima codificada tal y como se ha descrito anteriormente y en la SEC ID n°: 2 anexa, o ser un CBD de otro origen, introducido en la endoglucanasa creando así un híbrido enzimático. En este contexto, el término "dominio de unión a la celulosa" se pretende que se entienda tal y como está definido por Peter Tomme *et al.* "Cellulose-Binding Domains: Classification and Properties" in "Enzymatic Degradation of Insoluble Carbohydrates", John N. Saddler and Michael H. Penner (Eds.), ACS Symposium Series, No. 618, 1996. Esta definición clasifica más que 120 dominios de unión a la celulosa en 10 familias (I-X), y demuestra que los CBDs se encuentran en varias enzimas tales como las celulasas (endoglucanasas), xilanasas, mananasas, arabinofuranosidasas, acetil esterases y quitinasas. Los CBDs también se han encontrado en algas, por ejemplo el alga roja *Porphyra purpurea* como una proteína de unión al polisacárido no hidrolítica, véase Tomme *et al.*, op.cit. No obstante, la mayor parte de los CBDs son de celulasas y xilanasas, los CBDs se encuentran en los N y C terminales de proteínas o son internos. Híbridos enzimáticos se conocen en la técnica, véase, por ejemplo, la WO 90/00609 y la WO 95/16782, y se pueden preparar por transformación en una célula huésped de un constructo de ADN que comprende al menos un fragmento de ADN que codifica el dominio de unión a la celulosa ligado, con o sin un enlazador, a una secuencia de ADN que codifica la endoglucanasa y que hace crecer la célula huésped para expresar el gen fusionado. Híbridos enzimáticos se pueden describir mediante la siguiente fórmula:

CBD - MR - X

donde CBD es la región N-terminal o C-terminal de una secuencia de aminoácidos que se corresponde con al menos el dominio de unión a la celulosa; el MR es la región media (el enlazador), y puede ser un enlace, o un grupo de enlace corto preferiblemente de aproximadamente 2 a aproximadamente 100 átomos de carbono, más preferiblemente de 2 a 40 átomos de carbono, o es preferiblemente de aproximadamente 2 a aproximadamente 100 aminoácidos, más preferiblemente de 2 a 40 aminoácidos y X es una región N-terminal o C-terminal de un polipéptido que se corresponde con al menos el dominio catalíticamente activo codificado por la secuencia de ADN de la invención.

45 [0056] De manera similar, el dominio de unión a la celulosa que se corresponde con de aproximadamente la posición 340 a aproximadamente la posición 540 de SEC ID n°: 2 puede utilizarse para formar híbridos con endoglucanasas a partir de fuentes que no sean de la especie *Bacillus* AA349 y con otras proteínas. Ejemplos de endoglucanasas de otras fuentes que reemplazan la endoglucanasa de las posiciones 1 a aproximadamente 340 de SEC ID n°: 2 incluyen endoglucanasas de: (a) *Bacillus lautus*, por ejemplo NCIMB 40250 de *Bacillus lautus* descrita en la WO9110732, (b) DSM1800 de *Humicola insolens* descrita en la WO9117243, (c) DSM2672 de *Fusarium oxysporium* descrita en la WO9117243 y (d) AC13 NCIMB 40482 de la especie *Bacillus* descrita en la EP0651785.

Reactividad cruzada inmunológica

55 [0057] Anticuerpos policlonales, anticuerpos policlonales especialmente mono específicos, para su uso en la determinación de la reactividad cruzada inmunológica se pueden preparar usando una enzima celulolítica purificada. Más específicamente, antisuero contra la endoglucanasa de la invención se puede elevar mediante la inmunización de conejos (u otros roedores) según el procedimiento descrito por N. Axelsen *et al.* en: A Manual of Quantitative Immuno-electrophoresis, Blackwell Scientific Publications, 1973, Chapter 23 , o A. Johnstone y R. Thorpe, Immunochemistry in Practice, Blackwell Scientific Publications, 1982 (más específicamente p. 27-31). Inmunoglobulinas purificadas se pueden obtener a partir de los antisueros, por ejemplo por precipitación de sales ((NH₄)₂SO₄), seguida de diálisis y cromatografía de intercambio de iones, por ejemplo en DEAE-Sephadex. La caracterización inmunoquímica de las proteínas se puede realizar bien por análisis de doble difusión de Ouchterlony (O. Ouchterlony en: Handbook of Experimental Immunology (D.M. Weir, Ed.), Blackwell Scientific Publications, 1967, pp. 655-706), por

inmunolectroforesis de cohete o por inmunolectroforesis cruzada (N. Axelsen *et al.* in: A Manual of Quantitative Immunolectrophoresis, Blackwell Scientific Publications, 1973, Chapters 2, 3 and 4).

Fuentes microbianas

5

[0058] Para el propósito de la presente invención, el término "obtenido a partir de" u "obtenible a partir de", como se utiliza en este caso en relación con una fuente específica, significa que la enzima se produce o se puede producir mediante la fuente específica o mediante una célula en la que un gen de la fuente se haya insertado.

10

[0059] Actualmente se contempla que la endoglucanasa de la invención se pueda obtener a partir de una bacteria gram-positiva perteneciente a una cepa del género *Bacillus*, en particular una cepa de la especie *Bacillus* AA349.

15

[0060] En una forma de realización preferida, la endoglucanasa de la invención se obtiene de la cepa AA349 de la especie *Bacillus*, DSM 12648. Actualmente se contempla que una secuencia de ADN que codifica una enzima homóloga de la enzima de la invención se puede obtener a partir de otras cepas que pertenecen al género *Bacillus*.

[0061] La cepa AA349 de la especie *Bacillus* de la que se ha clonado la endoglucanasa de la invención se ha depositado bajo el número de depósito DSM 12648.

20

Constructo de ADN

[0062] En un aspecto, la presente invención se refiere a un constructo de ADN para su uso en la integración del polinucleótido de la invención en el genoma de la célula huésped. El constructo debe comprender el polinucleótido de la invención flanqueado por dos secuencias de polinucleótidos, una primera y una segunda secuencia de ADN, estas secuencias flanqueantes deben comprender cada una al menos una subsecuencia de homología suficiente a una región del genoma de la célula huésped para que se produzca recombinación eficaz.

25

Vectores de expresión recombinantes

30

[0063] Un vector recombinante que comprende un constructo de ADN que codifica la enzima de la invención puede ser cualquier vector, que puede ser sometido de forma conveniente a procedimientos de ADN recombinante, y la elección del vector frecuentemente dependerá de la célula huésped en la que se va a introducir. Así, el vector puede ser un vector de replicación autónoma, es decir un vector que existe como una entidad extracromosómica, cuya replicación es independiente de la replicación cromosómica, por ejemplo un plásmido. Alternativamente, el vector puede ser un vector que, cuando se introduce en una célula huésped, se integre en el genoma de la célula huésped en parte o en su totalidad y se replica junto con el cromosoma o cromosomas en los que se ha integrado.

35

[0064] El vector es preferiblemente un vector de expresión en el que la secuencia de ADN que codifica la enzima de la invención está operativamente enlazada a segmentos adicionales requeridos para la transcripción del ADN. En general, el vector de expresión se deriva de ADN plásmido o vírico o puede contener elementos de ambos. El término "operativamente enlazado" indica que los segmentos están dispuestos de modo que funcionen en concierto para sus fines previstos, por ejemplo la transcripción se inicia en un promotor y procede a través de la secuencia de ADN que codifica para la enzima.

40

45

[0065] El promotor puede ser cualquier secuencia de ADN que muestre actividad transcripcional en la célula huésped de elección y se puede derivar de genes que codifican proteínas ya sean homólogas o heterólogas de la célula huésped.

50

[0066] Ejemplos de promotores adecuados para su uso en células huésped bacterianas incluyen el promotor del gen de amilasa maltogénica de *Bacillus stearothermophilus*, el gen de alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis*, el gen de alfa-amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens*, el gen de proteasa alcalina de *Bacillus subtilis*, o el gen de xilosidasa de *Bacillus pumilus*, o los promotores P_R o P_L del fago Lambda o los promotores lac, trp o tac de *E. coli*.

55

[0067] La secuencia de ADN que codifica la enzima de la invención puede también, si es necesario, estar operativamente conectada a un terminador adecuado.

[0068] El vector recombinante de la invención puede comprender además una secuencia de ADN que permita al vector replicarse en la célula huésped en cuestión.

60

[0069] El vector también puede comprender un marcador seleccionable, por ejemplo un gen cuyo producto complemente un defecto de la célula huésped o un gen que codifique la resistencia a, por ejemplo, antibióticos tales como canamicina, cloranfenicol, eritromicina, tetraciclina, espectinomicina o similares, o resistencia a metales pesados o herbicidas.

65

[0070] Para dirigir una enzima de la presente invención en la vía secretora de las células huésped, una secuencia señal secretora (también conocida como una secuencia líder, prepro secuencia o pre secuencia) se puede proporcionar en el vector recombinante. La secuencia señal secretora se une a la secuencia de ADN que codifica la enzima en el marco de

lectura correcto. Las secuencias señal secretoras se posicionan habitualmente en 5' para la secuencia de ADN que codifica la enzima. La secuencia señal secretora puede ser la normalmente asociada a la enzima o puede ser de un gen que codifica otra proteína segregada.

5 [0071] Los procedimientos usados para enlazar las secuencias de ADN que codifican para la presente enzima, el promotor y opcionalmente el terminador y/o la secuencia señal secretora, respectivamente, o para ensamblar estas secuencias mediante esquemas de amplificación de PCR adecuados, y para insertarlas en vectores adecuados que contengan la información necesaria para la replicación o integración, son conocidos por las personas expertas en la técnica (cf., por ejemplo, Sambrook *et al.* (1989) Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor lab., Cold Spring Harbor, NY).

Células huésped

15 [0072] La molécula de ADN clonada introducida en la célula huésped puede ser bien homóloga o heteróloga del huésped en cuestión. Si es homóloga de la célula huésped, es decir es producida por la célula huésped de forma natural, estará típicamente operativamente enlazada con otra secuencia promotora o, si procede, otra secuencia señal secretora y/o secuencia terminadora que en su entorno natural. El término "homólogo" pretende incluir una secuencia de ADN que codifique una enzima nativa del organismo huésped en cuestión. El término "heterólogo" pretende incluir una secuencia de ADN no expresada por la célula huésped de forma natural. Así, la secuencia de ADN puede ser de otro organismo o puede ser una secuencia sintética.

20 [0073] La célula huésped en la que la molécula de ADN clonada o el vector recombinante de la invención se introduce puede ser cualquier célula que sea capaz de producir la enzima deseada e incluye células de bacterias, levadura, hongos y células eucarióticas más altas.

25 [0074] Ejemplos de células huésped bacterianas que en el cultivo son capaces de producir la enzima de la invención pueden ser bacterias gram-positivas tales como una cepa de *Bacillus*, en particular *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus brevis*, *Bacillus lautus*, *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus megatherium*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus thuringiensis*, una cepa de *Lactobacillus*, una cepa de *Streptococcus*, una cepa de *Streptomyces*, en particular *Streptomyces lividans* y *Streptomyces murinus*, o la célula huésped puede ser una bacteria gram-negativa tal como una cepa de *Escherichia coli*.

30 [0075] La transformación de las bacterias se pueden efectuar por transformación de protoplasto, electroporación, conjugación o usando células competentes de manera conocida *per se* (cf. por ejemplo Sambrook *et al.* (1989) Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor lab., Cold Spring Harbor, NY).

35 [0076] Cuando se expresa la enzima en una bacteria tal como *Escherichia coli*, la enzima se puede retener en el citoplasma, típicamente como gránulos insolubles (conocidos como cuerpos de inclusión), o se puede dirigir al espacio periplásmico por una secuencia de secreción bacteriana. En el último caso, las células se lisan y los gránulos se recuperan y desnaturalizan, después de lo cual la enzima se repliega diluyendo el agente desnaturalizante. En este último caso, la enzima se puede recuperar del espacio periplásmico por interrupción de las células, por ejemplo, por sonicación o choque osmótico, para liberar los contenidos del espacio periplásmico y recuperar la enzima.

40 [0077] Cuando se expresa la enzima en una bacteria gram-positiva tal como una cepa de *Bacillus* o una cepa de *Streptomyces*, la enzima se puede retener en el citoplasma o se puede dirigir al medio extracelular por una secuencia de secreción bacteriana.

45 [0078] Ejemplo de una célula huésped fúngica que en el cultivo puede ser capaz de producción la enzima de la invención es, por ejemplo, una cepa de *Aspergillus* o *Fusarium*, en particular *Aspergillus awamori*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* y *Fusarium oxysporum*, y una cepa de *Trichoderma*, preferiblemente *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma reesei* y *Trichoderma viride*.

50 [0079] Las células fúngicas se pueden transformar por un proceso que implica la formación de protoplasto y la transformación de los protoplastos seguida de regeneración de la pared celular de manera conocida *per se*. El uso de una cepa de *Aspergillus* como célula huésped se describe en la EP 238.023 (Novozymes A/S).

55 [0080] Ejemplo de una célula huésped de origen de levadura que en el cultivo puede ser capaz de producir la enzima de la invención es, por ejemplo, una cepa de la especie *Hansenula*, una cepa de la especie *Kluyveromyces*, en particular *Kluyveromyces lactis* y *Kluyveromyces marcianus*, una cepa de la especie *Pichia*, una cepa de *Saccharomyces*, en particular *Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces kluyveri* y *Saccharomyces uvarum*, una cepa de la especie *Schizosaccharomyces*, en particular *Schizosaccharomyces pombe*, y una cepa de la especie *Yarrowia*, en particular *Yarrowia lipolytica*.

60 [0081] Ejemplo de una célula huésped de origen vegetal que en el cultivo puede ser capaz de producir la enzima de la invención es, por ejemplo, una célula vegetal de *Solanum tuberosum* o *Nicotiana tabacum*.

Método para producir una enzima de endoglucanasa

5 [0082] La presente invención proporciona un método para producir una enzima aislada según la invención, donde una célula huésped adecuada, que se ha transformado con una secuencia de ADN que codifica la enzima, se cultiva bajo condiciones que permitan la producción de la enzima y la enzima resultante se recupera del cultivo.

10 [0083] Tal y como se define aquí, un polipéptido aislado (p. ej. una enzima) es un polipéptido que está esencialmente libre de otros polipéptidos, por ejemplo, al menos aproximadamente 20% puro, preferiblemente al menos aproximadamente 40% puro, más preferiblemente aproximadamente 60% puro, incluso más preferiblemente aproximadamente 80% puro, de la forma más preferible aproximadamente 90% puro, e incluso de la forma más preferible más del 95% puro, según se determina por SDS-PAGE.

15 [0084] El término "polipéptido aislado" se puede denominar alternativamente "polipéptido purificado".

[0085] Cuando un vector de expresión que comprende una secuencia de ADN que codifica la enzima se transforma en una célula huésped heteróloga es posible permitir la producción recombinante heteróloga de la enzima de la invención.

20 [0086] Así, es posible hacer una composición de endo-beta-1,4-glucanasa altamente purificada o mono componente, caracterizada por estar libre de impurezas homólogas.

[0087] En este contexto, impurezas homólogas se refiere a cualquier impureza (p. ej., otros polipéptidos diferentes de la enzima de la invención) que se origine a partir de la célula homóloga de la que se obtiene la enzima de la invención originalmente.

25 [0088] En la presente invención, la célula huésped homóloga puede ser una cepa AA349 de la especie *Bacillus*.

30 [0089] El medio usado para cultivar las células huésped transformadas pueden ser cualquier medio convencional adecuado para el crecimiento de las células huésped en cuestión. La enzima celulolítica expresada se puede secretar convenientemente en el medio de cultivo y se puede recuperar del mismo por procedimientos bien conocidos, incluyendo separación de las células del medio por centrifugado o filtración, precipitación de componentes proteínicos del medio mediante una sal tal como sulfato de amonio, seguida de procedimientos cromatográficos tales como cromatografía de intercambio de iones, cromatografía de afinidad o similares.

35 Composiciones enzimáticas

[0090] En otro aspecto más, la presente invención se refiere a una composición enzimática que comprende una enzima que muestra actividad de endoglucanasa como se ha descrito anteriormente.

40 [0091] La composición enzimática de la invención puede comprender, además de la endoglucanasa de la invención, uno o más tipos de enzimas diferentes, por ejemplo hemicelulasa tal como xilanasas y mananasas, otros componentes de celulosa o endobeta-1,4-glucanasa, quitinasa, lipasa, esterasa, pectinasa, cutinasa, fitasa, oxidoreductasa (peroxidasa, haloperoxidasa, oxidasa, lacasa), proteasa, amilasa, reductasa, fenoloxidasa, ligninasa, pululanasa, pectato liasa, xiloglucanasa, pectina acetil esterasa, poligalacturonasa, ramnogalacturonasa, pectina liasa, pectina metilesterasa, celobiohidrolasa, transglutaminasa o sus mezclas derivadas.

50 [0092] La composición enzimática se puede preparar conforme a métodos conocidos en la técnica y puede ser en forma de un líquido o una composición seca. Por ejemplo, la composición enzimática puede ser en forma de un granulado o un micro granulado. La enzima que se va a incluir en la composición se puede estabilizar según métodos conocidos en la técnica.

[0093] Las endoglucanasas tienen usos potenciales en una gran cantidad de industrias y aplicaciones diferentes. Más adelante se aportan ejemplos de usos preferidos de la composición enzimática de la invención. La dosificación de la composición enzimática de la invención y otras condiciones bajo las que la composición se usa se pueden determinar basándose en métodos conocidos en la técnica.

[0094] La composición enzimática según la invención puede ser útil para al menos uno de los siguientes fines.

60 Usos

Degradación de biomasa

[0095] La enzima o la composición enzimática según la invención se puede aplicar ventajosamente por ejemplo de la siguiente manera:

65

- para descortezado, es decir pretratamiento con enzimas hidrolíticas que pueden degradar parcialmente la capa de cambium rica en pectina antes del descortezado en tambores mecánicos dando como resultado ventajoso ahorro de energía.

5 - para desfibrado (refinación o batida), es decir tratamiento de material que contiene fibras celulósicas con enzimas hidrolíticas antes de la refinación o la batida lo que produce la reducción del consumo de energía debido al efecto de hidrolización de las enzimas en las superficies de las fibras.

10 - para modificación de la fibra, es decir, mejoramiento de las propiedades de la fibra donde se necesita hidrólisis parcial a través de la pared de la fibra lo que requiere enzimas de penetración más profunda (p. ej., para hacer fibras gruesas más flexibles).

15 - para drenaje: la drenabilidad de pulpas para la fabricación de papel se puede mejorar mediante el tratamiento de la pulpa con enzimas de hidrolización. El uso de la enzima o de la composición enzimática de la invención puede ser más eficaz, por ejemplo, dar como resultado un grado más alto de haces de aflojamiento de microfibrillas fuertemente hidratadas en la fracción más fina que limita el índice de drenaje bloqueando los espacios huecos entre las fibras y en la malla metálica de la máquina de papel.

20 [0096] El tratamiento de la pulpa lignocelulósica se puede realizar, por ejemplo, como se describe en la WO 93/08275, la WO 91/02839 y la WO 92/03608.

Lavandería

25 [0097] La enzima o composición enzimática de la invención puede ser útil en una composición de detergente para lavado doméstico o industrial de tejidos y prendas, y en un proceso para el tratamiento de lavado a máquina de tejidos que comprende el tratamiento de los tejidos durante uno o más ciclos de lavado de un proceso de lavado a máquina con una solución de lavado que contiene la enzima o preparación enzimática de la invención.

30 [0098] Típicamente, la composición de detergente usada en el proceso de lavado comprende ingredientes convencionales tales como surfactantes, (aniónicos, no iónicos, zwitteriónicos, anfotéricos), constructores, blanqueantes (perboratos, percarbonatos o peróxido de hidrógeno) y otros ingredientes, por ejemplo, como se describe en la WO 97/01629.

35 [0099] La endo-beta-1,4-glucanasa de la invención proporciona ventajas tales como la eliminación de manchas mejorada y la reposición de suciedad reducida. Ciertas manchas, por ejemplo ciertas manchas de alimentos, contienen beta-glucanos que dificultan la eliminación completa de la mancha. También, las fibras celulósicas de los tejidos puede poseer, particularmente en las regiones de superficie y "no cristalinas", polímeros de beta-glucano que son degradados por esta enzima. La hidrólisis de tales beta-glucanos, bien en la mancha o en el tejido, durante el proceso de lavado reduce la unión de suciedad sobre los tejidos.

40 [0100] Los procesos de lavandería doméstica se realizan bajo un abanico de condiciones. Comúnmente, el tiempo de lavado es de 5 a 60 minutos y la temperatura de lavado está en el rango de 15 a 60°C, más frecuentemente de 20 a 40°C. La solución de lavado es normalmente neutra o alcalina, más frecuentemente con pH 7-10,5. Los blanqueantes se usan normalmente, de forma particular para el lavado de tejidos blancos. Estos blanqueantes son comúnmente blanqueantes de peróxido, tales como perborato sódico, percarbonato sódico o peróxido de hidrógeno.

Aplicaciones textiles

50 [0101] En otra forma de realización, la presente invención se refiere al uso de la endoglucanasa de la invención en procesos de acabado textil, tales como el biopulido. El biopulido es un tratamiento específico de la superficie del hilo que mejora la calidad de la tela con respecto al manejo y apariencia sin perder humectabilidad del tejido. Los efectos más importantes de biopulido son menos creación de pelusa y bolas, mayor brillo/lustre, mejor manejo del tejido, mayor suavidad duradera e hidroabsorbancia alterada. El biopulido normalmente tiene lugar en el tratamiento húmedo durante la producción de telas de punto y tejidas. El tratamiento húmedo comprende pasos tales como por ejemplo desencolado, descrudado, blanqueo, lavado, tinte/impresión y acabado. Durante cada uno de estos pasos, el tejido es sometido en mayor o menor medida a acción mecánica. En general, después de que los tejidos se han tricotados o tejido, el tejido pasa a una fase de desencolado opcional, seguida de una fase de descrudado, etc. El desencolado es el acto de eliminación del almidón de los tejidos. Antes de tejer en telares mecánicos, las madejas de urdimbre a menudo se recubren con almidón que consiste en almidón o derivados de almidón para aumentar su resistencia a la tracción. Después de tejer, el recubrimiento de almidón se debe eliminar antes de seguir procesando el tejido para asegurar un resultado homogéneo y a prueba de lavados. En el proceso de descrudado se eliminan las impurezas del tejido. La endoglucanasa de la invención se puede usar ventajosamente en el descrudado de tejidos de algodón y celulósicos, así como de las fibras de corteza y puede mejorar la eficacia de eliminación de impurezas.

65 [0102] Uno de los métodos que se usan más frecuentemente para aportar presión duradera a los tejidos celulósicos es a través del acabado con química de reticulación de celulosa. La reticulación inmoviliza la celulosa a un nivel molecular y

5 reduce sustancialmente el encogimiento y el arrugado de las prendas celulósicas. El tratamiento de tejidos celulósicos tratados con presión durable con la endoglucanasa de la invención puede suponer un relajación selectiva de regiones estresadas para minimizar la abrasión de bordes. Adicionalmente, la endoglucanasa de la invención se puede utilizar para eliminar eficazmente el exceso de pasta de impresión a base de carboxi metil celulosa del textil y el equipamiento usado en el procedimiento de impresión.

10 [0103] Se sabe que para conseguir los efectos de biopulido, se necesita una combinación de acción mecánica y celulolítica. También se sabe que la "súper suavidad" se puede conseguir cuando el tratamiento con una celulasa se combina con un tratamiento convencional con agentes suavizantes. Se contempla que el uso de la endoglucanasa de la invención y de combinaciones de esta enzima con otras enzimas para el biopulido de materiales celulósicos (materiales celulósicos, tejidos, prendas, madejas y fibras fabricados y naturales) es ventajoso, por ejemplo, se puede conseguir un pulido más completo. Se cree que el biopulido se puede obtener aplicando el método descrito por ejemplo en la WO 93/20278. Además, se contempla que la endoglucanasa de la invención se pueda aplicar a procesos húmedos textiles simultáneos o secuenciales, incluyendo combinaciones diferentes de desengolado, descrudado, blanqueo, biopulido, 15 tintura y acabado.

Lavado a la piedra

20 [0104] Se conoce que un aspecto del "lavado a la piedra" (abrasión localizada del color) en el tejido teñido, especialmente en el tejido denim o vaquero, se puede obtener bien mediante lavado de la tela denim o los vaqueros hechos de dicha tela en presencia de piedras pómez para proporcionar el aclarado localizado deseado del color del tejido o por tratamiento del tejido enzimáticamente, en particular con enzimas celulíticas. El tratamiento con una endoglucanasa de la presente invención, sola o en combinación con otras enzimas, se puede llevar a cabo bien solo, tal como se describe en la US 4,832,864, junto con una cantidad menor de pómez que la requerida en el proceso 25 tradicional, o junto con perlita, tal como se describe en la WO 95/09225. El tratamiento del tejido denim con la endoglucanasa de la invención puede reducir el contraste en comparación con métodos convencionales.

Materiales y métodos

30 Cepas y organismo donante

[0105] La DSM 12648 de la especie *Bacillus* mencionada anteriormente comprende el endo-beta-1,4-glucanasa que codifica la secuencia de ADN mostrada en la SEC ID n°: 1.

35 [0106] PL2306 de *B. subtilis*: esta cepa es la DN1885 de *B. subtilis* con los genes npr y apr interrumpidos (Diderichsen, B., Wedsted, U., Hedegaard, L., Jensen, B. R., Sjøholm, C. (1990) Cloning of aldB, which encodes alpha-acetolactate decarboxylase, an exoenzyme from *Bacillus brevis*. J. Bacteriol., 172, 4315-4321), interrumpidos en la unidad transcripcional del conocido gen de celulasa de *Bacillus subtilis*, dando como resultado células negativas de celulasa. La interrupción se realizó esencialmente como se describe en Eds. A.L. Sonenshein, J.A. Hoch y Richard Losick (1993) *Bacillus subtilis* and other Gram- Positive Bacteria, American Society for microbiology, p. 618. 40

[0107] Se prepararon células competentes y se transformaron como se describe por Yasbin, R.E., Wilson, G.A. y Young, F.E. (1975) Transformation and transfection in lysogenic strains of *Bacillus subtilis*: evidence for selective induction of prophage in competent cells. J. Bacteriol, 121:296-304. 45

Métodos de biología molecular generales

50 [0108] A menos que se especifique lo contrario, todas las manipulaciones y transformaciones de ADN se realizaron utilizando métodos estándar de biología molecular (Sambrook *et al.* (1989) Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor lab., Cold Spring Harbor, NY ; Ausubel, F. M. *et al.* (eds.) "Current protocols in Molecular Biology". John Wiley and Sons, 1995 ; Harwood, C. R., and Cutting, S. M. (eds.) "Molecular Biological Methods for *Bacillus*". John Wiley and Sons, 1990).

55 [0109] Se usaron enzimas para manipulaciones de ADN según las instrucciones del fabricante (p. ej. ligasas, endonucleasas de restricción, etc. se pueden obtener de New England Biolabs, Inc.).

Plásmidos

60 [0110] pMOL944. Este plásmido es un derivado de pUB110 que contiene esencialmente elementos que hacen que el plásmido se propague en el gen de resistencia a la canamicina de *Bacillus subtilis* y que tiene un promotor fuerte y péptido señal clonado del gen amyL de ATCC14580 de *B. licheniformis*. El péptido señal contiene un sitio SacII que lo hace apropiado para clonar el ADN que codifica la parte madura de una proteína en fusión con el péptido señal. Esto da como resultado la expresión de una preproteína que se dirige hacia el exterior de la célula.

65 [0111] El plásmido se construyó mediante ingeniería genética ordinaria y se resume brevemente a continuación.

Construcción de pMOL944:

5 [0112] El plásmido pUB110 (McKenzie, T. *et al.*, 1986, Plasmid 15:93-103) fue digerido con la enzima de restricción única NciI. Un fragmento de PCR amplificado a partir del promotor amyL codificado en el plásmido pDN1981 (P.L. Jorgensen *et al.*, 1990, Gene, 96, p37-41.) fue digerido con NciI e insertado en el NciI digerido pUB110 para dar el plásmido pSJ2624.

[0113] Los dos cebadores de PCR usados tienen las siguientes secuencias:

LWN5494 (SEC ID N°: 3)

5'-GTCGCCGGGGCGGCCGCTATCAATTGGTAACTGTATCTCAGC -3'

LWN5495 (SEC ID N°: 4)

5'-GTCGCCCGGGAGCTCTGATCAGGTACCAAGCTTGTGACCTGCAGAA
TGAGGCAGCAAGAAGAT -3'

10

[0114] El cebador#LWN5494 inserta un sitio NotI en el plásmido.

15 [0115] El plásmido pSJ2624 fue luego digerido con SacI y NotI y un fragmento de PCR nuevo amplificado en el promotor amyL codificado en pDN1981 fue digerido con SacI y NotI y este fragmento de ADN fue insertado en pSJ2624 digerido por NotI de SacI para dar el plásmido pSJ2670.

[0116] Esta clonación reemplaza el primer promotor amyL que clona con el mismo promotor pero en la dirección opuesta. Los dos cebadores usados para la amplificación de PCR tienen las siguientes secuencias:

#LWN5938 (SEC ID N°: 5)

5'-GTCGGCGGCCGCTGATCACGTACCAAGCTTGTGACCTGCAGAATG
AGGCAGCAAGAAGAT -3'

#LWN5939 (SEC ID N°: 6)

5'-GTCGGAGCTCTATCAATTGGTAACTGTATCTCAGC -3'

20

[0117] El plásmido pSJ2670 fue digerido con las enzimas de restricción PstI y BclI y un fragmento de PCR amplificado a partir de una secuencia de ADN clonada que codifica la amilasa alcalina SP722 (patente n°: WO9526397-A1) fue digerida con PstI y BclI e insertada para dar el plásmido pMOL944. Los dos cebadores usados para amplificación de PCR tienen la siguiente secuencia: #LWN7864 (SEC ID n°: 7)

5' -AACAGCTGATCAGACTGATCTTTTAGCTTGGCAC-3'

#LWN7901 (SEC ID N°: 8)

25

5' -AACTGCAGCCGCGGCACATCATAATGGGACAAATGGG -3'

[0118] El cebador #LWN7901 inserta un sitio SacII en el plásmido.

30

Preparación de ADN genómico

[0119] La cepa DSM 12648 fue propagada en el medio líquido 2xTY que contenía 1% de carboximetil-celulosa + (0,1M Na₂CO₃ + 0,1M NaHCO₃ separadamente sometido a autoclave y adicionado aseptícamente tras el enfriamiento a

temperatura ambiente). Después de 16 horas de incubación a 30°C y 300 r.p.m., las células se cosecharon y se aisló ADN genómico por el método descrito por Pitcher *et al.* [Pitcher, D. G., Saunders, N. A., Owen, R. J; Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate; Lett Appl Microbiol 1989, 8:151-156].

5 Medios

[0120]

TY (como se describe en Ausubel, F. M. *et al.* (eds.): "Current protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, 1995).

2xTY (como se describe en Ausubel, F.M. *et al.* (eds.): "Current protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, 1995).

Agar de LB (como se describe en Ausubel, F. M. *et al.* (eds.): "Current protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, 1995).

15 LBPG es agar de LB suplementado con 0,5% de glucosa y 0,05 M de fosfato potásico, pH 7,0
AZCL-HE-celulosa se añade a LBPG-agar a 0,5% AZCL-HE-celulosa es de Megazyme, Australia.

Medios BPX se describen en la EP 0 506 780 (WO 91/09129).

Medios cal 18-2 se describen en la solicitud de patente WO 00/75344 A1).

20 Determinación de actividad de endo-beta-1,4-glucanasa

Método ECU

25 [0121] En el método ECU se determina la capacidad de la muestra enzimática para reducir la viscosidad de una solución de carboximetil-celulosa (CMC) y el resultado se da en ECU. La reducción en la viscosidad es proporcional a la actividad de la endo-celulasa. Condiciones: 7LFD de Hercules tipo CMC, pH 7,5 en 0,1M de tampón de fosfato, concentración CMC 31,1 g por litro reacción a 40°C durante 30 minutos. Se utiliza un viscosímetro por vibración tal como MIVI 3000, Sofraser, Francia para medir la viscosidad.

30 Método de Cellazyme C

[0122] Cellazyme C es un sustrato de ensayo de endoglucanasa, suministrado en forma de tableta por Megazyme International Ireland Ltd. Se hace referencia a folleto de Megazyme CZC 7/99 que establece: "El sustrato se prepara por tinción y reticulación de HE-celulosa para producir un material que se hidrate en el agua pero que sea hidrosoluble. La hidrólisis por endo-beta-1,4-glucanasa produce fragmentos teñidos hidrosolubles y el índice de liberación de éstos (aumento de la absorbancia a 590 nm) se puede relacionar directamente con actividad enzimática.

40 [0123] La muestra enzimática se añade a 6ml de un tampón adecuado en una probeta, una tableta de Cellazyme C se añade y se dispersa por agitación del tubo, luego el tubo se coloca en un baño maría a 40°C. El contenido se mezcla por agitación breve después de aproximadamente 15, 30, 45 y 60 minutos. Después de 60 minutos, la solución se filtra a través de los filtros Whatman GF/C, 9cm de diámetro. La absorbancia de la solución filtrada se mide en 590nm.

[0124] Los siguientes ejemplos ilustran la invención.

45 Ejemplo 1

Clonación y expresión del gen de endo-beta-1,4-glucanasa de la especie *Bacillus sp.*

Subclonación y expresión de endoglucanasa madura en *B. subtilis*.

50 [0125] La secuencia de ADN codificante de la endoglucanasa de la invención se amplificó por PCR utilizando el conjunto de cebador de PCR que consistía en estos dos oligonucleótidos:

168684 (SEC ID n°: 9)

55 5'-CAT TCT GCA GCC GCG GCA GCA GAA GGA AAC ACT CGT GAA GAC-3'

168685 (SEC ID n°: 10)

5'-GCG TTG AGA CGC GCG GCC GCT TAC TCT TCT TTC TCT TTC TC-3'

60 [0126] Los sitios de restricción SacII y NotI están subrayados.

[0127] Los oligonucleótidos se usaron en una reacción de PCR en el tampón de PCR HiFidelity™ (Boehringer Mannheim, Alemania) suplementado con 200 µM de cada dNTP, 2,6 unidades de mezcla enzimática HiFidelity™ Expand y 200 pmol de cada cebador. Se usó como modelo ADN cromosómico aislado de DSM12648 de la especie *Bacillus*, como se ha descrito anteriormente.

5 [0128] La reacción por PCR se realizó utilizando un ciclador térmico de ADN (Landgraf, Alemania). Una incubación a 94°C durante 1 min seguida de diez ciclos de PCR realizados utilizando un perfil de ciclo de desnaturalización a 94°C durante 15 seg, recocimiento a 60°C durante 60 seg y extensión a 72°C durante 120sec, seguido de veinte ciclos de desnaturalización a 94°C durante 15 seg, 60°C durante 60 seg y 72°C durante 120 seg (en este paso de alargamiento se añadieron 20 seg en cada ciclo). 5 µl de partes alícuotas del producto de amplificación se analizaron por electrofóresis en 0,7% de geles de agarosa (NuSieve, FMC). La aparición de un fragmento de ADN tamaño 2,4 kb indicó amplificación apropiada del segmento de gen.

10 Subclonación de fragmento de PCR:

15 [0129] 45 µl de partes alícuotas de los productos de PCR generados como se ha descrito anteriormente se purificaron utilizando el equipo de purificación por PCR QIAquick (Qiagen, EEUU) según las instrucciones del fabricante. El ADN purificado se eluyó en 50 µl de 10 mM de Tris-HCl, pH 8,5. 5 µg de pMOL944 y 25 µl del fragmento de PCR purificado se digirió con SacII y NotI, sometido a electrofóresis en 0,7% de geles de agarosa (NuSieve, FMC), los fragmentos importantes se extirparon de los geles y se purificaron utilizando el equipo de extracción de gel QIAquick (Qiagen, EEUU) según las instrucciones del fabricante. El fragmento de ADN de la PCR aislado se ligó luego a pMOL944 digerido y purificado por SacII-NotI. El ligamiento se realizó durante toda la noche a 16°C usando 0,5 µg de cada fragmento de ADN, 1 U de tampón de T4 DNA-ligasa y T4 ligasa (Boehringer Mannheim, Alemania).

20 [0130] La mezcla de libación se usó para transformar PL2306 competente de *B. subtilis*. Las células transformadas se colocaron en placas sobre LBPG-10 µg/ml de placas de canamicina-agar. Después de 18 horas de incubación a 37°C, se vieron colonias en las placas. Se analizaron varios clones por aislamiento de ADN plásmido de caldos de cultivo de una noche.

25 [0131] Un tal clon positivo fue reestriado varias veces en placas de agar como se usó anteriormente. Este clon se denominó MB1181-7. El clon MB1181-7 se cultivó durante toda la noche en TY-10µg/ml de canamicina a 37°C, y al día siguiente 1 ml de células se usaron para aislar un plásmido de las células utilizando el equipo Qiaprep Spin Plasmid Miniprep #27106 según las recomendaciones de los fabricantes para preparaciones de plásmido de *B. subtilis*. Este ADN se secuenció y reveló una secuencia de ADN idéntica al gen de endoglucanasa de la SEC ID n°: 1 de par de bases 1- 2322 que codifica la endoglucanasa madura. La secuencia de proteína derivada se representa en SEC ID n°: 2.

30 Ejemplo 2

35 Expresión y recuperación de la endoglucanasa de la especie *Bacillus sp.* DSM 12648

40 [0132] MB1181-7 obtenido como se describe en el ejemplo 1 se cultivó en 15 x 200 ml de medio Cal-18-2 con 10 µg/ml de canamicina, en dos matraces de agitación con deflectores de 500 ml, durante 4 días a 37°C a 300 r.p.m., por lo que se obtuvo aproximadamente 2.500 ml de caldo de cultivo. El fluido de cultivo fue floculado añadiendo 50% de CaCl₂ (10 ml por litro de caldo de cultivo) junto con 11% de aluminato de sodio (10 ml por litro de caldo de cultivo), manteniendo el pH entre 7,0 y 7,5 añadiendo 20% de ácido fórmico. El agente catiónico Superfloc C521 (25 ml de una dilución del 10% v/v por litro de caldo de cultivo) y el agente aniónico Superfloc A130 (75 ml de una dilución del 0,1% p/v en agua por litro de caldo de cultivo) se añadieron durante la agitación para completar la floculación. El material floculado se separó por centrifugado utilizando un centrifugador Sorval RC 3B a 10.000 r.p.m. durante 30 min a 6°C. El sobrenadante resultante contenía la actividad de endoglucanasa.

45 [0133] El sobrenadante fue clarificado utilizando los filtros de vidrio de Whatman GF/D y C. Luego se usó ultrafiltración para concentrar y reducir la fuerza iónica de la solución. La membrana de ultrafiltración fue Filtron UF con un corte de 10 kDa. Después de la ultrafiltración, la solución tenía conductividad < 3mS/cm. El pH se ajustó a pH 8,0.

50 [0134] Se usó luego cromatografía de intercambio aniónico en Q-Sefarosa para purificación adicional. La solución de la ultrafiltración se aplicó a una columna de 300 ml que contenía Q-Sefarosa (Pharmacia) equilibrada con un tampón de 25 mmol de Tris, pH 8,0. La endoglucanasa se ligó a la Q-Sefarosa y luego se eluyó utilizando un gradiente de 0,5 M de NaCl. Las fracciones con alta actividad de endoglucanasa fueron agrupadas. La actividad de endoglucanasa de la solución de endoglucanasa agrupada final fue de aproximadamente 1.000 ECU por ml.

55 Ejemplo 3

Caracterización de la endoglucanasa de la invención

60 [0135] Una muestra de la endoglucanasa del ejemplo 2 se aplicó a una columna de cromatografía de tamaño, usando una columna Superdex 200 de 100 ml equilibrada en 0,1 M de tampón de acetato sódico pH 6,0. La endoglucanasa se eluyó como un valor máximo único. Esta solución enzimática purificada se usó para caracterización adicional, como aparece más adelante.

[0136] La enzima de purificación de cromatografía de tamaño dio una única banda en SDS-PAGE en una posición que corresponde a un peso molecular de aproximadamente 70 a 80 kDa, estimado como 73 kDa. El punto isoeléctrico de la endoglucanasa purificada fue de aproximadamente 4,2.

5 [0137] La secuencia N-terminal fue determinada. El resultado fue:

XEGNTRE (SEC ID nº: 11)

10 La X fue la inyección, y podrían ser A como se encontró en la secuencia basada en la secuencia de ADN. Así, esta secuencia N-terminal coincide con la secuencia N-terminal de SEC ID nº: 2.

[0138] La concentración de proteína se determinó usando un coeficiente de extinción molar de 145800 (basado en la composición de aminoácidos deducida de la secuencia).

15 [0139] Suero monoespecífico policlonal de conejo se cultivó contra la enzima purificada utilizando técnicas convencionales. El suero formó un único precipitado en geles de agarosa con la endoglucanasa de la invención.

Ejemplo 4

20 Estabilidad a 40°C en solución que contiene un detergente y blanqueador

[0140] La estabilidad de la endoglucanasa del ejemplo 2 se evaluó bajo las siguientes condiciones.

25 [0141] Se preparó una solución de un detergente en polvo con blanqueador. El detergente en polvo fue detergente IEC-A, suministrado por wfk Testgewebe GmbH, D-41379, Alemania. Este es un detergente base de referencia para lavadora IEC 60456, tipo A. El blanqueador fue IEC 60456 perborato sódico tetrahidrato, tipo SPB, también suministrado por wfk Testgewebe.

Concentraciones:

30

[0142]

Detergente en polvo, IEC-A:	4,0 g por litro
Perborato sódico tetrahidrato:	1,0 g por litro
Bicarbonato sódico:	0,5 g por litro
Dureza del agua:	15°dH (añadiendo una solución de cloruro de calcio más cloruro de magnesio)
PH de la solución:	10,0

35 [0143] 5ml de partes alícuotas de la solución detergente fueron transferidas a tubos de ensayo y éstos se precalentaron en un baño maría a 40°C durante 10 minutos.

[0144] Una solución de la enzima, con actividad 2,4 ECU/ml fue preparada por dilución de la muestra del ejemplo 2 con agua.

40 [0145] 100 µl de la dilución enzimática se añadió a cada uno de los tubos de ensayo precalentados y se mezcló. Las soluciones se mantuvieron a 40°C durante el tiempo especificado, luego se enfriaron rápidamente en agua helada, luego se almacenaron en congelación.

45 [0146] Se prepararon muestras de referencia añadiendo 0, 50, 100, 150 µl de la misma solución enzimática en 5 ml de muestras de la solución detergente a temperatura ambiente, luego se enfrió y se congeló.

50 [0147] La actividad en las muestras termotrataadas y de referencia se determinó luego. Las soluciones fueron descongeladas y luego 1 ml de tampón pH 9,5 (véase más adelante) se añadió, dando un volumen total de 6 ml. La actividad fue evaluada utilizando el método de tableta de Cellazyme C, como se describe en la sección materiales y métodos situada por encima.

[0148] El tampón de pH 9,5 se preparó mediante mezclando a) y b) para dar pH 9,5:

55 a) 0,25 M de tampón de fosfato pH 7,0 (obtenido a partir de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y NaOH), que contenía 5,0 g/l de Berol 537 (surfactante no iónico de Akzo Nobel)

b) 0,25 M de carbonato sódico, que contenía 5,0 g/l de Berol 537 (surfactante no iónico de Akzo Nobel)

5 [0149] Las actividades de las muestras calentadas se expresaron como % de la actividad encontrada en los estándares no calentados. Los resultados fueron de la siguiente manera:

Tiempo a 40°C, minutos	% actividad
0	99
15	96
30	92
45	91
60	90

10 Sólo aproximadamente 10% de la actividad se perdió después de una hora a 40°C en esta solución de detergente con blanqueante.

Ejemplo 5

Estabilidad a 50°C en solución alcalina con blanqueador

15 [0150] La estabilidad de la endoglucanasa obtenida en el ejemplo 2 fue evaluada bajo las siguientes condiciones.

[0151] Se preparó una solución de blanqueador de perborato sódico (perborato sódico, tetrahidrato tipo SPB de wfk Testgewebe). Concentraciones:

Perborato sódico, tetrahidrato:	1,25 g por litro
Tampón de glicina, pH 9:	0,1M

20 [0152] 5 ml de partes alícuotas de esta solución se transfirieron a tubos de ensayo y éstos se precalentaron en un baño maría a 50°C durante 10 minutos. Una solución de la enzima, con actividad 2,5 ECU/ml se preparó por dilución de la muestra del ejemplo 2 con agua.

25 [0153] 100µl de la dilución enzimática se añadió a cada uno de los tubos de ensayo precalentados y la solución se mezcló. Las soluciones se mantuvieron a 50°C durante el tiempo especificado, luego se enfriaron en agua helada y luego se almacenaron congeladas.

30 [0154] Se prepararon muestras de referencia añadiendo 0, 50, 100, 150 µl de la misma solución enzimática en 5ml de muestras de la solución de blanqueador a temperatura ambiente, luego se enfriaron y congelaron.

[0155] La actividad de las muestras termotratadas y de referencia se determinó siguiendo el mismo procedimiento que en el ejemplo 4.

35 [0156] Las actividades de las muestras calentadas se expresaron como % de la actividad encontrada en los estándares no calentados. Los resultados fueron de la siguiente manera:

Tiempo a 50°C, minutos	% actividad
0	101
15	76
30	69
45	53
60	44

40 [0157] Menos de 50% de la actividad se perdió después de 30 minutos a 50°C en esta solución de blanqueador alcalino.

Ejemplo 6

Prueba para la inhibición por iones de Fe(II)

45 [0158] Inactivación de la endoglucanasa del ejemplo 2 por iones de Fe(II) se evaluó de la siguiente manera.

[0159] Una solución de 1 mM de sulfato de Fe(II) se preparó por disolución de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck, p.a.) en 0,1 M de tampón de glicina, pH 9.

5 [0160] Dos soluciones de la enzima, con actividad calculada en 2,6 ECU/ml, se prepararon por dilución de la muestra del ejemplo 2 con a) 0,1 M de tampón de glicina y b) 0,1 M de tampón de glicina con 1 mM de Fe(II). Estas dos soluciones se agitaron durante 30 minutos en alrededor de 25°C.

10 [0161] Muestras de 0, 50, 100, 150 μl de estas dos soluciones se diluyeron luego en 6 ml de tampón (5 ml de agua más 1 ml del tampón pH 9,5 descrito en el ejemplo 4) y la actividad se determinó por el método de la tableta de Cellazyme C.

[0162] No hubo ninguna diferencia de actividad significativa entre las muestras preparadas en tampón de glicina y las muestras correspondientes preparadas en tampón de glicina más $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

15 [0163] La enzima no se inactiva por tratamiento con 1 mM de iones de Fe(II).

Ejemplo 7

Prueba de rendimiento de lavado

20 [0164] Esta prueba demuestra los efectos de eliminación de mancha y de antireposición de la endoglucanasa obtenida en el ejemplo 2. Adicionalmente esta prueba demuestra que el rendimiento enzimático permanece esencialmente invariado cuando se incluye blanqueador de perborato sódico.

25 [0165] Muestras de algodón se manchan con beta-glucano (de cebada) más negro de carbono. Las muestras sucias se lavan junto con muestras limpias. Después del lavado, las muestras se aclaran y se secan. La eliminación de suciedad de las muestras sucias y la reposición de suciedad sobre las muestras limpias se determina por mediciones de reflectancia. La eliminación de suciedad y la reposición de suciedad después del lavado sin o con adición de la endoglucanasa se comparan.

30 [0166] Muestras: corte de 100% de tejido de algodón, tipo #2003 (Tanigashira, Osaka, Japón), prelavado a 40°C como precaución para eliminar cualquier contaminación soluble en agua, tamaño 5 x 5 cm, peso aproximadamente 0,3 g.

35 [0167] Equipamiento de lavado: vasos de precipitados agitados, volumen de vaso de precipitado 250 ml, con control de temperatura por calentamiento de baño maría. El equipamiento es una lavadora agitadora de multi vaso de precipitados en miniatura.

[0168] Solución detergente: preparada añadiendo lo siguiente en agua desionizada.

40 Carbonato sódico, 0,5 g por litro
 Bicarbonato sódico, 0,7 g por litro
 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$, para dar dureza de agua 12° dH
 Surfactante aniónico, Surfac SDBS80 (sulfonato de alquilbenceno de sodio), 0,5 g por litro
 Surfactante no iónico, Berol 537 (Akzo Nobel), 1,0 g por litro
 Perborato sódico, tipo SPB de wfk Testgewebe, bien 0 o 1,0 g por litro
 45 El pH de la solución es de aproximadamente 9,5.

50 [0169] Procedimiento de lavado: 100 ml de solución detergente se añade a cada vaso de precipitado. La temperatura del baño maría es de 40°C. Los agitadores mecánicos se accionan a aproximadamente 125 r.p.m. Las soluciones de detergente se precalientan durante 10 minutos y luego se agregan la endoglucanasa y las muestras. En cada caso tres muestras sucias (preparadas como se describe más adelante) y tres muestras limpias se agregan a cada vaso de precipitado. Después de lavado durante 30 minutos, las muestras se retiran de la solución de detergente, se aclaran bajo agua corriente del grifo durante 5 minutos, se extienden en plano sobre papel absorbente y se dejan secar.

55 [0170] Mediciones de reflectancia: hechas utilizando un espectrofotómetro de reflectancia Macbeth 7000 Color Eye. En el caso de las muestras sucias, cada muestra se mide una vez en el centro del área sucia, luego se calcula el valor medio. En el caso de las muestras limpias, cada muestra se mide una vez en cada lado, luego se calcula el valor medio. Las mediciones de reflectancia se hacen todas a 500 nm.

60 [0171] Muestras sucias: las muestras sucias se hacen usando beta-glucano (de cebada) y negro de carbono ("carbono para pruebas de detergencia" suministrado por Sentaku Kagaku Kiokai, Tokio, Japón). Disolver aproximadamente 0,67 g de beta-glucano en 100 ml de agua del grifo por agitación y calentamiento a >50°C. Añadir 0,33 g de negro de carbono. Mezclar con una mezcladora UltraTurrax T25, velocidad 4.000 r.p.m. durante 2 minutos. Aplicar 250 μl del beta-glucano/carbono sobre el centro de cada muestra. Dejar secar durante toda la noche a temperatura ambiente.

65 [0172] Las muestras usadas en este ejemplo tienen un valor de reflectancia media de 93,5 antes de la aplicación de suciedad y 17,5 después de manchar.

[0173] Adición de endoglucanasa: la endoglucanasa del ejemplo 2 se adicionó para dar una concentración de actividad de 0,20 o 100 ECU por litro de solución de detergente.

5 [0174] Resultados: detergente sin blanqueador (promedio de mediciones de reflectancia después del lavado)

Endoglucanasa adicionadas	Muestras sucias	Muestras limpias
0	25,1	33,5
20 ECU por litro	35,7	46,7
100 ECU por litro	40,2	
59,1		

[0175] Resultados: detergente con blanqueador (promedio de mediciones de reflectancia después del lavado)

Endoglucanasa adicionadas	Muestras sucias	Muestras limpias
0	24,6	27,7
20 ECU por litro	36,8	52,6
100 ECU por litro	39,3	
63,2		

10

[0176] La endoglucanasa aumentó la eliminación de la suciedad del tejido, como se ha visto por aumento del valor de reflectancia de las muestras manchadas después del lavado con endoglucanasa en comparación con el resultado después del lavado sin endoglucanasa. La endoglucanasa también reduce la reposición de suciedad, como se ha visto por el aumento del valor de reflectancia de las muestras limpias después del lavado con endoglucanasa. Las mejoras de eliminación de suciedad y de antireposición proporcionadas por la endoglucanasa se ven esencialmente invariadas por la adición del blanqueador.

15

Ejemplo 8

20 Prueba de rendimiento de lavado

[0177] Se lava el tejido de algodón limpio junto con el tejido de algodón sucio en una solución de un detergente doméstico. El lavado se realiza en un Terg-O-Tometer. Durante el lavado, la suciedad se libera del tejido sucio en la solución de detergente. Esta suciedad se puede luego redepositar sobre el algodón limpio. Después del lavado, los tejidos de algodón se aclaran y se seca, y luego se miden con un espectrofotómetro de reflectancia para detectar el grado de reposición de suciedad.

25

Detergente: detergente doméstico en polvo, Asian.

Concentración de detergente: 0,67 g/l en agua con dureza 4° dH.

30

1000 ml de solución de detergente por vaso de precipitado de T-O-T.

Tejido de algodón: Total de 33 g de tejido por vaso de precipitado de T-O-T, que comprende piezas adecuadamente dimensionadas de:

35

algodón tejido blanco, #2003 (Tanigashira, Osaka, Japón), peso total 11 g

malla de algodón blanco, peso total 13 g

tela de algodón sucio, tipo EMPA101 (EMPA, Suiza), peso total 9 g.

Lavado: temperatura 25°C, tiempo de lavado 40 minutos, a 125 r.p.m. Después lavado, el algodón #2003 se aclara bajo agua corriente del grifo durante 10 minutos, luego se seca.

40

Mediciones de reflectancia. Las piezas de algodón tejido #2003 se miden, en ambos lados, usando un espectrofotómetro de reflectancia Macbet 7000, 500 nm. El resultado medio para mediciones de cada vaso de precipitado T-O-M se calcula.

Adición de enzima: en esta prueba, la endoglucanasa preparada como se describe en el ejemplo 2 se añadió a la solución de detergente antes del inicio del paso de lavado.

45

Resultados:

[0178]

Endoglucanasa adicionada, ECU por litro	Reflectancia de #2003, a 500nm
0	76,67
0	76,05
1	81,86
5	84,30
20	84,85
50	85,99

5 [0179] A partir de los resultados se puede concluir que la adición de la endoglucanasa de la invención reduce la reposición de suciedad.

Ejemplo 9

10 Actividad de endoglucanasa como función de pH y de temperatura

[0180] La actividad de la endoglucanasa del ejemplo 2 se midió en un rango de valores de pH de solución, usando una temperatura de reacción de 40°C.

15 [0181] La enzima se diluyó primero con agua para dar una solución con actividad de aproximadamente 0,07 ECU/ml.

[0182] 750µl de solución CMC (Hercules, tipo 7LFD, concentración 2% p/p disuelta en agua) y 1000 µl de una solución tamponada se mezclaron en tubos de ensayo y se precalentaron a 40°C. Los tampones usados se describen más adelante. Luego, 250µl de los 0,07 ECU/ml de solución enzimática se añadió y la mezcla se incubó a 40°C durante 20 minutos. Luego 1000µl de reactivo PHBAH, descrito más adelante, se añadió y los tubos se calentaron en agua hirviendo durante 10 minutos. Finalmente, las soluciones se enfriaron en agua helada y la absorbancia a 410 nm se midió con un espectrofotómetro. Se sustrajeron valores de absorbancia en blanco, determinados añadiendo el reactivo PHBAH antes de añadir la solución enzimática.

25 [0183] El reactivo PHBAH se preparó de la siguiente manera: disolver 1,5 g hidrácida de ácido hidroxibenzoico y 5,0 g tartrato de sodio de potasio en 100 ml de 2% p/p de hidróxido sódico en agua.

[0184] Se usaron los siguientes tampones. En todos los casos la concentración de tampón fue de 0,1 M.

30 Tampones de acetato, pH 4,0, 4,5, 5,0, 5,5.
 Tampones MES, pH 6,0 (MES es ácido (2-[N-Morfolino]etano sulfónico)
 Tampón MOPS, pH 6,5, 7,0, 7,5 (MOPS es ácido 3-[N-morfolino]propano sulfónico)
 Tampones de barbiturato, pH 8,0, 8,5
 Tampones de glicina, pH 9,0, 9,5, 10,0, 10,5

35 [0185] La absorbancia a 410 nm (menos el valor en blanco) es una medida de la actividad de la enzima. Los resultados fueron de la siguiente manera:

pH durante incubación (medido)	Absorbancia, 410nm (blanco sustraído)
4,2	0,0
4,6	0,0
5,1	0,1
5,7	0,2
6,1	0,3
6,5	0,4
7,1	0,6
7,5	0,8
8,1	0,9
8,5	1,0

ES 2 521 615 T3

9,2	0,9
9,6	1,0
10,0	1,0
10,5	0,9

[0186] Los resultados muestran que la enzima tiene actividad máxima a pH alcalino. La enzima tiene aproximadamente 90% o más de la actividad máxima en el rango de pH de 8,1 a 10,5.

5 [0187] La actividad de la endoglucanasa del ejemplo 2 se midió en un rango de temperaturas, usando un pH de reacción de 10,0.

[0188] La enzima se diluyó primero con agua para dar una solución con actividad de aproximadamente 0,07 ECU/ml.

10 [0189] 750 µl de solución CMC (Hercules, tipo 7LFD, concentración 2% p/p disuelta en el agua) y 1000µl de una solución tamponada de glicina de 0,1 M pH 10,0 se mezclaron en tubos de ensayo y se precalentaron a la temperatura especificada. Luego 250µl del 0.07 ECU/ml de solución enzimática se añadió y la mezcla se incubó durante 20 minutos a la temperatura especificada. Luego 1000µl de reactivo PHBAH, anteriormente descrito, se añadió y los tubos se calentaron en agua hirviendo durante 10 minutos. Finalmente, las soluciones se enfriaron en agua helada y la absorbancia a 410 nm se midió con un espectrofotómetro. Se sustrajeron valores de absorbancia en blanco, determinados por adición del reactivo PHBAH antes de añadir la solución enzimática.

15

[0190] La absorbancia a 410nm (menos el valor en blanco) es una medida de la actividad de la enzima.

20 [0191] Los resultados fueron de la siguiente manera:

Temperatura de incubación, °C	Absorbancia, 410nm (blanco sustraído)
20	0,26
30	0,52
40	0,78
50	0,82
60	0,23
70	<0,05

[0192] La enzima tiene alta actividad a temperaturas de 20 a 60°C, temperatura máxima alrededor de 40 - 50°C.

25 **Ejemplo 10**

Biopulido utilizando la endoglucanasa de la invención en un equipo continuo.

30 [0193] El tejido usado es Knitted Fabric 460 (Test Fabrics Inc.), que es malla blanqueada de algodón 100%. El tejido se corta en piezas de 20 x 30 cm de un peso aproximado de 12,5 g cada una. El peso de cada muestra es determinada después de la preparación durante al menos 24 horas a 65±2% de humedad relativa y 21±2°C (70±3°F).

[0194] La endoglucanasa de la invención obtenida en el ejemplo 2 se formula en 15 mM de fosfato sódico. La prueba se hace con concentraciones de enzima variables y a diferentes pH.

35

[0195] Las muestras se ponen en contacto con soluciones enzimáticas durante menos de 45 segundos y luego se acolchan a través de una almohadilla, después de lo cual se pesan y se cuelgan inmediatamente en un rango de vapor Mathis (tipo PSA-HTF) (Werner Mathis USA Inc. Concord, NC). Se determina el porcentaje de solución sobre el tejido (% captación de humedad) y la proporción de actividad de endoglucanasa para el tejido. Muestras de tejido se tratan a 90°C y 100% de humedad relativa durante 90 minutos. Todas las muestras se transfieren luego y se aclaran en agua desionizada durante al menos 5 minutos, después de ello se secan al aire. Finalmente, las muestras se acondicionan a 65±2% de humedad relativa y 21±2°C (70±3°F) de temperatura durante al menos 24 horas antes de la evaluación.

40

[0196] La resistencia del tejido se mide en el modelo de pruebas C de Mullen Burst según ASTM D3786 - 87: método de prueba estándar para resistencia al estallado hidráulico de productos de tejido de punto y método de prueba de resistencia al estallado de diafragma de tejidos no tejidos y se determina la pérdida de resistencia. La nota de creación de bolas se mide según ASTM D 4970 -89: método de prueba estándar para resistencia a la creación de bolas y otros cambios en la superficie relacionados de telas tejidas (método de prueba de presión de Martindale). Tras 500 revoluciones, la creación de bolas en el tejido se evalúa visualmente con respecto a una escala estándar de 1 a 5, donde 1 indica creación de bolas muy severa y 5 indica ninguna creación de bolas.

50

Ejemplo 11

Biopulido utilizando la endoglucanasa de la invención en un equipo continuo.

5

[0197] El biopulido se realiza esencialmente como se describe en el ejemplo 10, excepto que el tampón consiste en 9,53 g de tetraborato de sodio decahidrato disuelto en 2,5 l de agua desionizada y está ajustado a pH 9,2.

10

[0198] Las muestras se acolchan y se tratan como se describe en el ejemplo 10. La concentración de humedad en el tejido es del 94%. El tejido se trata durante 90 min a pH 9,2, 90°C y humedad relativa del 100%. Los procesos de aclarado, secado y evaluación son los mismos que en el ejemplo 10.

Ejemplo 12

15

Tratamientos de combinación

[0199] El siguiente experimento se realizó para evaluar el efecto de la endoglucanasa obtenida en el ejemplo 2 en descrudado y biopulido combinados.

20

[0200] El tejido usado es Fabric 4600, que es una tela de algodón 100% sin crudar y sin blanquear. La preparación de la tela y el tampón son los mismos que los descritos en el ejemplo 11 anterior.

25

[0201] La solución en masa contiene: (a) la endoglucanasa del ejemplo 2 en un tampón como se describe en el ejemplo 2 anterior, a una concentración de 6,12 CMCU/ml y 4,9 CMCU/g de tejido y (b) pectato liasa termoestable a una concentración de 1,93 mv-mol/ml/min. Las muestras se acolchan y se tratan como se describe en el ejemplo 10. La concentración de humedad de la tela es del 80%. Las condiciones de tratamiento son pH 9,2, 90°C, humedad relativa (RH) del 100% y el tratamiento es durante 90 min.

30

[0202] Los procesos de aclarado, secado y evaluación son los mismos que se describen en el ejemplo 10 anterior. La velocidad de humidificación se evalúa según el método estándar de prueba 79-1995 "Absorbencia de Textiles Blanqueados" de la AATCC (American Association of Textile Chemists and Colorists). Se permite una caída de agua desde una bureta de 1 cm de alto para que caiga a una superficie tensa de muestra de tejido. El tiempo de desaparición del agua en la superficie de la tela se registra como tiempo de humidificación.

35

Ejemplo 13

Abrasión de la tela vaquera

40

[0203] El siguiente ejemplo ilustra el uso de la endoglucanasa de la invención obtenida en el ejemplo 2 para tratar vaqueros u otras prendas de tela denim y para producir prendas de tela denim con una variación de color uniformemente localizada (abrasión de denim). La abrasión se refiere al color desgastado de la tela vaquera de urdimbre teñida debido a los efectos combinados de tratamiento de celulasa y la acción mecánica. El efecto resultante es una apariencia de tela similar a la de a tela vaquera lavada a la piedra conseguida con piedras pómez.

45

[0204] Ensayos de lavado se realizan bajo las siguientes condiciones:

Textil

50

[0205] Tela vaquera azul DAKOTA, 14½ oz, 100 % algodón. La tela vaquera se corta y se cose en "patas" de aproximadamente 37,5 x 100 cm (aproximadamente 375 g cada una).

Enzimas

55

[0206]

Amilasa: AQUAZYM™ ULTRA 1200L (de Novozymes A/S)

Endoglucanasa de la invención.

60

Protocolo de abrasión de tela vaquera

[0207]

Equipamiento: lavadora de lavado/tintura/lavado a la piedra Tonello G1 30 (Tonello S.r.l., Via della Fisica, 1/3, Sarcedo (VI) - Italia).

65

ES 2 521 615 T3

- Carga textil: 8 kg de "patas" de tela vaquera
Paso de desengomado: 0,2% de AQUAZYM™ ULTRA (% por peso de tejido)
0,05% de Tergitol 15-S-9 (% por peso de tejido)
10 min
75°C
LR (relación de baño) 10:1
- 5
- Paso de aclarado: 3 min, 60°C, LR 15:1
- 10
- Paso de abrasión: 10 ECU/g de endoglucanasa de tela vaquera
60 min
50°C
LR 8:1
- 15
- Paso de inactivación: 2% de carbonato de sodio (% en peso de tejido)
80°C
20 min
LR 10:1
- 20
- Pasos de aclarado: 2 x 3 min, LR 15:1
- 25
- Paso de extracción: 5 min en 110 g
- Secar en secadora las muestras de tela vaquera. Acondicionar las muestras durante 24 horas a 20°C, 65% de humedad relativa antes de la evaluación.
- 30
- Pruebas/análisis
- Abrasión de la tela vaquera y pérdida de contraste
- [0208] Medir la reflectancia de las muestras de tela vaquera para determinar el nivel de abrasión y la pérdida de contraste. La abrasión de la tela vaquera se mide como L* media (L* más alta corresponde a más abrasión) y la pérdida de contraste se mide como b* media (b*más negativa, "más azul", corresponde a más pérdida de contraste) en un espectrofotómetro HunterLab Labscan XE (Hunter Associates Laboratory, Inc., Reston, VA 20190 EEUU).
- 35
- Evaluación visual de abrasión de tela vaquera y pérdida de contraste
- [0209] Se pide a 5 personas expertas en la técnica de evaluación de tela vaquera que clasifiquen las piernas de tela vaquera y asignen una clasificación del 1 (efecto bajo) al 5 (alto efecto).
- 40
- Pérdida de peso
- [0210] Peso de las muestras antes y después del tratamiento para determinar la pérdida de peso.
- 45
- Resistencia al desgarro
- [0211] La resistencia al desgarro de las muestras de tela vaquera se determina utilizando un probador de desgarro de Elmendorf según ASTM D 1424-83 "Standard Test Method for Tear Resistance of Woven Fabrics by Falling Pendulum (Elmendorf) Apparatus."
- 50
- Listado de secuencias
- [0212]
- <110> Novozymes A/S
- 55
- <120> Endo-beta-1,4-glucanasas
- 60
- <130> 10184
- <160> 11
- 65
- <170> Versión de patentIn 3.1

ES 2 521 615 T3

<210> 1
 <211> 2322
 <212> ADN
 5 <213> Especie *Bacillus*.

<220>
 <221> CDS
 10 <222> (1)..(2322)
 <223>

<400> 1

gca	gaa	gga	aac	act	cgt	gaa	gac	aat	ttt	aaa	cat	tta	tta	ggt	aat	48
Ala	Glu	Gly	Asn	Thr	Arg	Glu	Asp	Asn	Phe	Lys	His	Leu	Leu	Gly	Asn	
1				5					10					15		
gac	aat	ggt	aaa	cgc	cct	tct	gag	gct	ggc	gca	tta	caa	tta	caa	gaa	96
Asp	Asn	Val	Lys	Arg	Pro	Ser	Glu	Ala	Gly	Ala	Leu	Gln	Leu	Gln	Glu	
			20					25					30			
gtc	gat	gga	caa	atg	aca	tta	gta	gat	caa	cat	gga	gaa	aaa	att	caa	144
Val	Asp	Gly	Gln	Met	Thr	Leu	Val	Asp	Gln	His	Gly	Glu	Lys	Ile	Gln	
		35					40					45				
tta	cgt	gga	atg	agt	aca	cac	gga	tta	caa	tgg	ttt	cct	gar	atc	ttg	192
Leu	Arg	Gly	Met	Ser	Thr	His	Gly	Leu	Gln	Trp	Phe	Pro	Glu	Ile	Leu	
	50					55					60					
aat	gat	aac	gca	tac	aaa	gct	ctt	gct	aac	gat	tgg	gaa	tca	aat	atg	240
Asn	Asp	Asn	Ala	Tyr	Lys	Ala	Leu	Ala	Asn	Asp	Trp	Glu	Ser	Asn	Met	
65					70					75					80	
att	cgt	cta	gct	atg	tat	gtc	ggt	gaa	aat	ggc	tat	gct	tca	aat	cca	288
Ile	Arg	Leu	Ala	Met	Tyr	Val	Gly	Glu	Asn	Gly	Tyr	Ala	Ser	Asn	Pro	
				85					90					95		

ES 2 521 615 T3

gag Glu	tta Leu	att Ile	aaa Lys 100	agc Ser	aga Arg	gtc Val	att Ile	aaa Lys 105	gga Gly	ata Ile	gat Asp	ctt Leu	gct Ala 110	att Ile	gaa Glu	336
aat Asn	gac Asp	atg Met 115	tat Tyr	gtt Val	att Ile	gtt Val	gat Asp 120	tgg Trp	cat His	gta Val	cat His	gca Ala 125	cct Pro	ggt Gly	gat Asp	384
cct Pro	aga Arg 130	gat Asp	ccc Pro	gtt Val	tac Tyr	gct Ala 135	gga Gly	gca Ala	gaa Glu	gat Asp	ttc Phe 140	ttt Phe	aga Arg	gat Asp	att Ile	432
gca Ala 145	gca Ala	tta Leu	tat Tyr	cct Pro	aac Asn 150	aat Asn	cca Pro	cac His	att Ile	att Ile 155	tat Tyr	gag Glu	tta Leu	gcg Ala	aat Asn 160	480
gag Glu	cca Pro	agt Ser	agt Ser	aac Asn 165	aat Asn	aat Asn	ggt Gly	gga Gly	gct Ala 170	ggg Gly	att Ile	cca Pro	aat Asn	aat Asn 175	gaa Glu	528
gaa Glu	ggt Gly	tgg Trp	aat Asn 180	gcg Ala	gta Val	aaa Lys	gaa Glu	tac Tyr 185	gct Ala	gat Asp	cca Pro	att Ile	gta Val 190	gaa Glu	atg Met	576
tta Leu	cg Arg	gat Asp 195	agc Ser	ggg Gly	aac Asn	gca Ala	gat Asp 200	gac Asp	aat Asn	atc Ile	atc Ile	att Ile 205	gtg Val	ggt Gly	agt Ser	624
cca Pro	aac Asn 210	tgg Trp	agt Ser	cag Gln	cg Arg	cct Pro 215	gac Asp	tta Leu	gca Ala	gct Ala	gat Asp 220	aat Asn	cca Pro	att Ile	aat Asn	672
gat Asp 225	cac His	cat His	aca Thr	atg Met	tat Tyr 230	act Thr	gtt Val	cac His	ttc Phe	tac Tyr 235	act Thr	ggt Gly	tca Ser	cat His	gct Ala 240	720
gct Ala	tca Ser	act Thr	gag Glu	agc Ser 245	tat Tyr	ccg Pro	cct Pro	gaa Glu	act Thr 250	cct Pro	aac Asn	tct Ser	gaa Glu	aga Arg 255	gga Gly	768
aac Asn	gta Val	atg Met	agt Ser 260	aac Asn	act Thr	cg Arg	tat Tyr	gcg Ala 265	tta Leu	gaa Glu	aac Asn	gga Gly	gta Val 270	gcg Ala	gta Val	816
ttt Phe	gcg Ala	aca Thr 275	gaa Glu	tgg Trp	gga Gly	aca Thr	agt Ser 280	caa Gln	gca Ala	aat Asn	gga Gly	gat Asp 285	ggt Gly	ggt Gly	cct Pro	864
tat Tyr	ttt Phe 290	gat Asp	gaa Glu	gca Ala	gat Asp	gta Val 295	tgg Trp	att Ile	gag Glu	ttt Phe	tta Leu 300	aat Asn	gaa Glu	aac Asn	aac Asn	912
att Ile 305	agt Ser	tgg Trp	gct Ala	aac Asn	tgg Trp 310	tct Ser	tta Leu	acg Thr	aat Asn	aaa Lys 315	aat Asn	gaa Glu	gtg Val	tct Ser	ggt Gly 320	960
gca Ala	ttt Phe	aca Thr	cca Pro	ttc Phe 325	gag Glu	tta Leu	ggt Gly	aag Lys	tct Ser 330	aac Asn	gca Ala	acc Thr	aat Asn	ctt Leu 335	gac Asp	1008
cca Pro	ggt Gly	cca Pro	gat Asp 340	cat His	gtg Val	tgg Trp	gca Ala	cca Pro 345	gaa Glu	gag Glu	tta Leu	agt Ser	ctt Leu 350	tcg Ser	gga Gly	1056
gaa Glu	tat Tyr	gta Val 355	cg Arg	gct Ala	cg Arg	att Ile	aaa Lys 360	ggt Gly	gtg Val	aac Asn	tat Tyr	gag Glu 365	cca Pro	atc Ile	gac Asp	1104

ES 2 521 615 T3

cgt Arg	aca Thr 370	aaa Lys	tac Tyr	acg Thr	aaa Lys	gta Val 375	ctt Leu	tgg Trp	gac Asp	ttt Phe	aat Asn 380	gat Asp	gga Gly	acg Thr	aag Lys	1152
caa Gln 385	gga Gly	ttt Phe	gga Gly	gtg Val	aat Asn 390	tcg Ser	gat Asp	tct Ser	cca Pro	aat Asn 395	aaa Lys	gaa Glu	ctt Leu	att Ile	gca Ala 400	1200
gtt Val	gat Asp	aat Asn	gaa Glu	aac Asn 405	aac Asn	act Thr	ttg Leu	aaa Lys	gtt Val 410	tcg Ser	gga Gly	tta Leu	gat Asp	gta Val 415	agt Ser	1248
aac Asn	gat Asp	ggt Val	tca Ser 420	gat Asp	ggc Gly	aac Asn	ttc Phe	tgg Trp 425	gct Ala	aat Asn	gct Ala	cgt Arg	ctt Leu 430	tct Ser	gcc Ala	1296
gac Asp	ggt Gly	tgg Trp 435	gga Gly	aaa Lys	agt Ser	gtt Val	gat Asp 440	att Ile	tta Leu	ggt Gly	gct Ala	gag Glu 445	aag Lys	ctt Leu	aca Thr	1344
atg Met 450	gat Asp	ggt Val	att Ile	gtt Val	gat Asp	gaa Glu 455	cca Pro	acg Thr	acg Thr	gta Val 460	gct Ala	att Ile	gcg Ala	gcg Ala	att Ile	1392
cca Pro 465	caa Gln	agt Ser	agt Ser	aaa Lys	agt Ser 470	gga Gly	tgg Trp	gca Ala	aat Asn	cca Pro 475	gag Glu	cgt Arg	gct Ala	gtt Val	cga Arg 480	1440
gtg Val	aac Asn	gcg Ala	gaa Glu	gat Asp 485	ttt Phe	gtt Val	cag Gln	caa Gln	acg Thr 490	gac Asp	ggt Gly	aag Lys	tat Tyr	aaa Lys 495	gct Ala	1488
gga Gly	tta Leu	aca Thr	att Ile 500	aca Thr	gga Gly	gaa Glu	gat Asp	gct Ala 505	cct Pro	aac Asn	cta Leu	aaa Lys	aat Asn 510	atc Ile	gct Ala	1536
ttt Phe	cat His	gaa Glu 515	gaa Glu	gat Asp	aac Asn	aat Asn	atg Met 520	aac Asn	aac Asn	atc Ile	att Ile	ctg Leu 525	ttc Phe	gtg Val	gga Gly	1584
act Thr	gat Asp 530	gca Ala	gct Ala	gac Asp	gtt Val	att Ile 535	tac Tyr	tta Leu	gat Asp	aac Asn	att Ile 540	aaa Lys	gta Val	att Ile	gga Gly	1632
aca Thr 545	gaa Glu	ggt Val	gaa Glu	att Ile	cca Pro 550	gtt Val	gtt Val	cat His	gat Asp	cca Pro 555	aaa Lys	gga Gly	gaa Glu	gct Ala	gtt Val 560	1680
ctt Leu	cct Pro	tct Ser	gtt Val	ttt Phe 565	gaa Glu	gac Asp	ggt Gly	aca Thr	cgt Arg 570	caa Gln	ggt Gly	tgg Trp	gac Asp	tgg Trp 575	gct Ala	1728
gga Gly	gag Glu	tct Ser	ggt Gly 580	gtg Val	aaa Lys	aca Thr	gct Ala	tta Leu 585	aca Thr	att Ile	gaa Glu	gaa Glu	gca Ala 590	aac Asn	ggt Gly	1776
tct Ser	aac Asn	gcg Ala 595	tta Leu	tca Ser	tgg Trp	gaa Glu	ttt Phe 600	gga Gly	tat Tyr	cca Pro	gaa Glu	gta Val 605	aaa Lys	cct Pro	agt Ser	1824
gat Asp	aac Asn 610	tgg Trp	gca Ala	aca Thr	gct Ala	cca Pro 615	cgt Arg	tta Leu	gat Asp	ttc Phe	tgg Trp 620	aaa Lys	tct Ser	gac Asp	ttg Leu	1872
gtt Val 625	cgc Arg	ggt Gly	gag Glu	aat Asn	gat Asp 630	tat Tyr	gta Val	gct Ala	ttt Phe	gat Asp 635	ttc Phe	tat Tyr	cta Leu	gat Asp	cca Pro 640	1920

ggt cgt gca aca gaa ggc gca atg aat atc aat tta gta ttc cag cca 1968
 Val Arg Ala Thr Glu Gly Ala Met Asn Ile Asn Leu Val Phe Gln Pro 655

cct act aac ggg tat tgg gta caa gca cca aaa acg tat acg att aac 2016
 Pro Thr Asn Gly Tyr Trp Val Gln Ala Pro Lys Thr Tyr Thr Ile Asn 660 670

ttt gat gaa tta gag gaa gcg aat caa gta aat ggt tta tat cac tat 2064
 Phe Asp Glu Leu Glu Glu Ala Asn Gln Val Asn Gly Leu Tyr His Tyr 675 680 685

gaa gtg aaa att aac gta aga gat att aca aac att caa gat gac acg 2112
 Glu Val Lys Ile Asn Val Arg Asp Ile Thr Asn Ile Gln Asp Asp Thr 690 695 700

tta cta cgt aac atg atg atc att ttt gca gat gta gaa agt gac ttt 2160
 Leu Leu Arg Asn Met Met Ile Ile Phe Ala Asp Val Glu Ser Asp Phe 705 710 715 720

gca ggg aga gtc ttt gta gat aat gtt cgt ttt gag ggg gct gct act 2208
 Ala Gly Arg Val Phe Val Asp Asn Val Arg Phe Glu Gly Ala Ala Thr 725 730 735

act gag ccg gtt gaa cca gag cca gtt gat cct ggc gaa gag acg cca 2256
 Thr Glu Pro Val Glu Pro Glu Pro Val Asp Pro Gly Glu Glu Thr Pro 740 745 750

cct gtc gat gag aag gaa gcg aaa aaa gaa caa aaa gaa gca gag aaa 2304
 Pro Val Asp Glu Lys Glu Ala Lys Lys Glu Gln Lys Glu Ala Glu Lys 755 760 765

gaa gag aaa gaa gag taa 2322
 Glu Glu Lys Glu Glu 770

<210> 2
 <211> 773
 <212> PRT
 <213> Especie *Bacillus*.

5

<400> 2

Ala Glu Gly Asn Thr Arg Glu Asp Asn Phe Lys His Leu Leu Gly Asn
 1 5 10 15

Asp Asn Val Lys Arg Pro Ser Glu Ala Gly Ala Leu Gln Leu Gln Glu
 20 25 30

Val Asp Gly Gln Met Thr Leu Val Asp Gln His Gly Glu Lys Ile Gln
 35 40 45

Leu Arg Gly Met Ser Thr His Gly Leu Gln Trp Phe Pro Glu Ile Leu
 50 55 60

Asn Asp Asn Ala Tyr Lys Ala Leu Ala Asn Asp Trp Glu Ser Asn Met
 65 70 75 80

ES 2 521 615 T3

Ile Arg Leu Ala Met Tyr Val Gly Glu Asn Gly Tyr Ala Ser Asn Pro
85 90 95

Glu Leu Ile Lys Ser Arg Val Ile Lys Gly Ile Asp Leu Ala Ile Glu
100 105 110

Asn Asp Met Tyr Val Ile Val Asp Trp His Val His Ala Pro Gly Asp
115 120 125

Pro Arg Asp Pro Val Tyr Ala Gly Ala Glu Asp Phe Phe Arg Asp Ile
130 135 140

Ala Ala Leu Tyr Pro Asn Asn Pro His Ile Ile Tyr Glu Leu Ala Asn
145 150 155 160

Glu Pro Ser Ser Asn Asn Asn Gly Gly Ala Gly Ile Pro Asn Asn Glu
165 170 175

Glu Gly Trp Asn Ala Val Lys Glu Tyr Ala Asp Pro Ile Val Glu Met
180 185 190

Leu Arg Asp Ser Gly Asn Ala Asp Asp Asn Ile Ile Ile Val Gly Ser
195 200 205

Pro Asn Trp Ser Gln Arg Pro Asp Leu Ala Ala Asp Asn Pro Ile Asn
210 215 220

Asp His His Thr Met Tyr Thr Val His Phe Tyr Thr Gly Ser His Ala
225 230 235 240

Ala Ser Thr Glu Ser Tyr Pro Pro Glu Thr Pro Asn Ser Glu Arg Gly
245 250 255

Asn Val Met Ser Asn Thr Arg Tyr Ala Leu Glu Asn Gly Val Ala Val
260 265 270

Phe Ala Thr Glu Trp Gly Thr Ser Gln Ala Asn Gly Asp Gly Gly Pro
275 280 285

Tyr Phe Asp Glu Ala Asp Val Trp Ile Glu Phe Leu Asn Glu Asn Asn
290 295 300

Ile Ser Trp Ala Asn Trp Ser Leu Thr Asn Lys Asn Glu Val Ser Gly
305 310 315 320

Ala Phe Thr Pro Phe Glu Leu Gly Lys Ser Asn Ala Thr Asn Leu Asp
325 330 335

Pro Gly Pro Asp His Val Trp Ala Pro Glu Glu Leu Ser Leu Ser Gly
340 345 350

Glu Tyr Val Arg Ala Arg Ile Lys Gly Val Asn Tyr Glu Pro Ile Asp
 355 360 365

Arg Thr Lys Tyr Thr Lys Val Leu Trp Asp Phe Asn Asp Gly Thr Lys
 370 375 380

Gln Gly Phe Gly Val Asn Ser Asp Ser Pro Asn Lys Glu Leu Ile Ala
 385 390 400

Val Asp Asn Glu Asn Asn Thr Leu Lys Val Ser Gly Leu Asp Val Ser
 405 410 415

Asn Asp Val Ser Asp Gly Asn Phe Trp Ala Asn Ala Arg Leu Ser Ala
 420 425 430

Asp Gly Trp Gly Lys Ser Val Asp Ile Leu Gly Ala Glu Lys Leu Thr
 435 440 445

Met Asp Val Ile Val Asp Glu Pro Thr Thr Val Ala Ile Ala Ala Ile
 450 455 460

Pro Gln Ser Ser Lys Ser Gly Trp Ala Asn Pro Glu Arg Ala Val Arg
 465 470 475 480

Val Asn Ala Glu Asp Phe Val Gln Gln Thr Asp Gly Lys Tyr Lys Ala
 485 490 495

Gly Leu Thr Ile Thr Gly Glu Asp Ala Pro Asn Leu Lys Asn Ile Ala
 500 505 510

Phe His Glu Glu Asp Asn Asn Met Asn Asn Ile Ile Leu Phe Val Gly
 515 520 525

Thr Asp Ala Ala Asp Val Ile Tyr Leu Asp Asn Ile Lys Val Ile Gly
 530 535 540

Thr Glu Val Glu Ile Pro Val Val His Asp Pro Lys Gly Glu Ala Val
 545 550 555 560

Leu Pro Ser Val Phe Glu Asp Gly Thr Arg Gln Gly Trp Asp Trp Ala
 565 570 575

Gly Glu Ser Gly Val Lys Thr Ala Leu Thr Ile Glu Glu Ala Asn Gly
 580 585 590

Ser Asn Ala Leu Ser Trp Glu Phe Gly Tyr Pro Glu Val Lys Pro Ser
 595 600 605

Asp Asn Trp Ala Thr Ala Pro Arg Leu Asp Phe Trp Lys Ser Asp Leu
 610 615 620

Val Arg Gly Glu Asn Asp Tyr Val Ala Phe Asp Phe Tyr Leu Asp Pro
625 630 635 640

Val Arg Ala Thr Glu Gly Ala Met Asn Ile Asn Leu Val Phe Gln Pro
645 650 655

Pro Thr Asn Gly Tyr Trp Val Gln Ala Pro Lys Thr Tyr Thr Ile Asn
660 665 670

Phe Asp Glu Leu Glu Glu Ala Asn Gln Val Asn Gly Leu Tyr His Tyr
675 680 685

Glu Val Lys Ile Asn Val Arg Asp Ile Thr Asn Ile Gln Asp Asp Thr
690 695 700

Leu Leu Arg Asn Met Met Ile Ile Phe Ala Asp Val Glu Ser Asp Phe
705 710 715 720

Ala Gly Arg Val Phe Val Asp Asn Val Arg Phe Glu Gly Ala Ala Thr
725 730 735

Thr Glu Pro Val Glu Pro Glu Pro Val Asp Pro Gly Glu Glu Thr Pro
740 745 750

Pro Val Asp Glu Lys Glu Ala Lys Lys Glu Gln Lys Glu Ala Glu Lys
755 760 765

Glu Glu Lys Glu Glu
770

<210> 3

<211> 42

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<221> misc_feature

10 <222> (1)..(42)

<223> Cebador LWN5494

<400> 3

gtgccgggg cggccgctat caattgtaa ctgtatctca gc 42

15

<210> 4

<211> 64

<212> ADN

<213> Artificial

20

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(64)

<223> Cebador LWN5495

<400> 4

gtcgcgccggg agctctgatc aggtaccaag cttgtcgacc tgcagaatga ggcagcaaga 60

agat 64

5

<210> 5
 <211> 61
 <212> ADN
 <213> Artificial

10

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(61)
 <223> Cebador LWN5938

15

<400> 5-

gtcggcgcc gctgatcacg taccaagctt gtcgacctgc agaatgaggc agcaagaaga 60

t 61

20

<210> 6
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Artificial

25

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(35)
 <223> Cebador LWN5939

30

<400> 6
 gtcggagctc tatcaattgg taactgtatc tcagc 35

35

<210> 7
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Artificial

40

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(35)
 <223> Cebador LWN7864

45

<400> 7
 aacagctgat cagactgat ctttagctt ggcac 35

50

<210> 8
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Artificial

55

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(37)
 <223> Cebador LWN7901

60

<400> 8
 aactgcagcc gcggcacatc ataatgggac aatggg 37

60

<210> 9
 <211> 42

ES 2 521 615 T3

<212> ADN
<213> Artificial

<220>
5 <221> misc_feature
<222> (1)..(42)
<223> Cebador 168684

<400> 9
10 cattctgcag ccgcggcagc agaaggaaac actcgtgaag ac 42

<210> 10
<211> 44
<212> ADN
15 <213> Artificial

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(44)
20 <223> Cebador 168685

<400> 10
gcggtgagac gcgcggccgc ttactcttct ttctcttct tctc 44

<210> 11
<211> 7
<212> PRT
<213> Especie *Bacillus*.

<220>
30 <221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(7)
<223> N-TERMINAL, DONDE X=A

<400> 11

Xaa Glu Gly Asn Thr Arg Glu
1 5

REIVINDICACIONES

1. Enzima que muestra actividad de endo-beta-1,4-glucanasa (EC 3.2.1.4), que se selecciona de uno de:
- 5 (a) un polipéptido codificado por la secuencia de ADN de las posiciones 1 a 2.322 de SEC ID nº: 1;
 (b) un polipéptido producido por la expresión de la secuencia de SEC ID nº: 1 por una célula huésped cultivada bajo condiciones que permiten la producción de la enzima;
 (c) una enzima de endo-beta-1,4-glucanasa que tiene una secuencia de al menos 99% de identidad con la
 10 secuencia de aminoácidos de la posición 1 a la posición 773 de SEC ID nº: 2, cuando la identidad se determina por GAP proporcionado en el paquete del programa GCG que utiliza una penalización de creación de GAP de 3,0 y penalización de extensión de GAP de 0,1.
2. Enzima según la reivindicación 1, esta enzima es un polipéptido endógeno de la especie *Bacillus sp.*, DSM 12648.
- 15 3. Molécula de polinucleótido aislada que codifica un polipéptido que tiene actividad de endo-beta-1,4-endo-glucanasa seleccionada del grupo que consiste en:
- (a) moléculas de polinucleótidos que comprenden una secuencia de nucleótidos como se muestra en SEC ID nº: 1 del nucleótido 1 al nucleótido 2.322;
 20 (b) moléculas de polinucleótidos que codifican un polipéptido que es al menos 99% idéntico a la secuencia de aminoácidos de la posición 1 a la posición 773 de SEC ID nº: 2, cuando la identidad se determina por GAP proporcionado en el paquete de programa GCG que utiliza una penalización de creación de GAP de 3,0 y una penalización de extensión de GAP de 0,1.
 (c) moléculas complementarias de (a) o (b); y
 25 (d) secuencias de nucleótidos degeneradas de (a) o (b).
4. Molécula de polinucleótido aislado según la reivindicación 3, donde el polinucleótido es ADN.
5. Constructo de polinucleótido que comprende la molécula de polinucleótido según las reivindicaciones 3 o 4.
- 30 6. Vector de expresión que comprende los siguientes elementos operativamente enlazados: un promotor de transcripción, un segmento de ADN seleccionado del grupo que consiste en:
- (a) moléculas de polinucleótidos que codifican un polipéptido que tiene actividad de endo-beta-1,4-glucanasa que comprende una secuencia de nucleótidos como se muestra en SEC ID nº: 1 del nucleótido 1 al nucleótido 2.322,
 35 (b) moléculas de polinucleótidos que codifican un polipéptido que tiene actividad de endo-beta-1,4-glucanasa que es al menos 99% idéntico a la secuencia de aminoácidos de la posición 1 a la posición 773 de SEC ID nº: 2, cuando la identidad se determina por GAP proporcionado en el paquete del programa GCG que utiliza una penalización de creación de GAP de 3,0 y penalización de extensión de GAP de 0,1, y
 40 (c) secuencias de nucleótidos degeneradas de (a) o (b); y un terminador de transcripción.
7. Célula cultivada en la que se ha introducido un vector de expresión según la reivindicación 6, donde dicha célula expresa el polipéptido codificado por el segmento de ADN.
- 45 8. Célula según la reivindicación 7, que es una célula procariótica, en particular una célula bacteriana.
9. Célula según la reivindicación 8, donde la célula pertenece a una cepa de *Bacillus*, preferiblemente una cepa de *Bacillus subtilis* o *Bacillus lentus*.
- 50 10. Célula según la reivindicación 8, donde la célula pertenece a una cepa de *Bacillus licheniformis*, preferiblemente *Bacillus licheniformis*, ATCC 14580.
11. Célula según la reivindicación 8, donde la célula pertenece a una cepa de *Pseudomonas*, preferiblemente una cepa de *Pseudomonas fluorescens* o *Pseudomonas mendocina*.
- 55 12. Célula según la reivindicación 8, donde la célula pertenece a una cepa de *Streptomyces*.
13. Célula según la reivindicación 7 donde la célula pertenece a una cepa de *Saccharomyces*, preferiblemente una cepa de *Saccharomyces cerevisiae*.
- 60 14. Método para producir un polipéptido con actividad de endo-beta-1,4-glucanasa que comprende el cultivo de una célula en la que se ha introducido un vector de expresión según la reivindicación 6, de tal manera que dicha célula expresa un polipéptido codificado por el segmento de ADN y la recuperación del polipéptido.
- 65 15. Composición enzimática que comprende la enzima según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2.

- 5 16. Composición según la reivindicación 15 que comprende además una o más enzimas seleccionadas del grupo que consiste en proteasas, celulasas (endoglucanasas), beta-glucanasas, hemicelulasas, lipasas, peroxidasas, lacasas, alfa-amilasas, glucoamilasas, cutinasas, pectinasas, reductasas, oxidasas, fenoloxidasas, ligninasas, pululanasas, pectato liasas, xiloglucanasas, xilanasas, pectina acetil esterases, poligalacturonasas, ramnogalacturonasas, pectina liasas, otras mananasas, pectina metil-esterases, celobiohidrolasas, transglutaminasas o sus mezclas derivadas.
- 10 17. Composición enzimática según la reivindicación 15, que incluye una enzima aislada que tiene actividad de endo-beta-1,4-glucanasa, donde la enzima (i) está libre de impurezas homólogas y (ii) es producida por el método según la reivindicación 14.
- 15 18. Método para la degradación de biomasa que contiene celulosa, donde la biomasa se trata con una cantidad eficaz de la enzima según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 o de la composición enzimática según cualquiera de las reivindicaciones 15-17.
- 20 19. Composición de detergente que comprende una endo-beta-1,4-glucanasa según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2.
- 20 20. Uso de una endo-beta-1,4-glucanasa según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 en una composición de detergente.
21. Uso de una endo-beta-1,4-glucanasa según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 en procesos de acabado textil.