

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 525 677**

51 Int. Cl.:

C12N 15/56 (2006.01)

C12N 9/42 (2006.01)

C12N 15/80 (2006.01)

C12N 1/15 (2006.01)

C07K 16/40 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

C11D 3/386 (2006.01)

D06M 16/00 (2006.01)

D21C 9/00 (2006.01)

A23K 1/165 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.10.1996 E 96934839 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.09.2014 EP 0857216**

54 Título: **Celulasas, genes que las codifican y usos de las mismas**

30 Prioridad:

17.10.1995 US 605335

04.12.1995 US 607926

28.06.1996 US 620840

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.12.2014

73 Titular/es:

AB ENZYMES OY (100.0%)

TYKKIMÄENTIE 15

05200 RAJAMÄKI, FI

72 Inventor/es:

MIETTINEN-OINONEN, ARJA;

LONDESBOROUGH, JOHN;

VEHMAANPERÄ, JARI;

HAAKANA, HELI;

MÄNTYLÄ, ARJA;

LANTTO, RAIJA;

ELOVAINIO, MINNA;

JOUTSJOKI, VESA;

PALOHEIMO, MARJA y

SUOMINEN, PIRKKO

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 525 677 T3

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

DESCRIPCIÓN

Celulasas, genes que las codifican y usos de las mismas

Antecedentes de la invención**Campo de la invención**

- 5 La presente invención se refiere a una secuencia de nucleótidos aislada que codifica un polipéptido que tiene la actividad enzimática de la celulasa, a un vector que contiene la secuencia de nucleótidos, a una célula hospedadora transformada con el vector y a un proceso de producción de un polipéptido mediante el cultivo de dicha célula hospedadora. Además, la invención se refiere a una preparación enzimática que comprende el polipéptido y al uso del preparado en el biolavado a la piedra de productos textiles o prendas que contienen algodón, para el bioacabado de los materiales textiles, en composiciones detergentes, para el tratamiento de pulpa o fibra derivada de la madera y para mejorar la calidad de piensos animales.

Técnica relacionada

- 15 La celulosa es un polisacárido lineal de restos de glucosa unidos por enlaces β -1,4. En la naturaleza, la celulosa está normalmente asociada con la lignina junto con hemicelulosas tales como xilanos y glucomananos. El uso práctico de las celulasas se ha visto dificultado por la naturaleza de las celulasas conocidas, que a menudo son mezclas de celulasas que tienen una variedad de actividades y especificidades por sustratos. Por esta razón, es deseable identificar las fuentes de las que se pueden obtener las celulasas que solo tienen las actividades deseadas.

- 20 En la técnica, se conoce una amplia variedad de celulasas, la mayoría de las cuales son celulasas ácidas. Sin embargo, también se han identificado algunas celulasas neutras y alcalinas. Celluzyme[®] es un preparado de celulasa disponible en el mercado que procede de *Humicola insolens* (Novo Nordisk, A/S). Los documentos GB 2.075.028 y EP 406.314 describen el uso de una celulasa de *Humicola insolens* como aditivo enzimático en un detergente de lavado para reducir la dureza (rigidez) de los productos textiles que contienen algodón. En los documentos WO 93/11249 y EP 531.372, se describe la clonación de una celulasa que contiene la actividad de endoglucanasa de *Humicola insolens*. El documento EP 510.091 describe una celulasa de *Bacillus* sp. NCIMB 40250 que es útil en las composiciones detergentes. El documento EP 220.016 describe celulasas que son útiles como agentes de aclarado de los tejidos de color. El documento WO 94/07998 describe celulasas modificadas que poseen una actividad alcalina mejorada. El documento WO 95/02675 describe composiciones detergentes que contienen dos celulasas diferentes: una primera de celulasa que es catalíticamente susceptible a la eliminación de la las partículas de suciedad, y una segunda celulasa que es catalíticamente susceptible a al aclarado del color. El documento WO 92/18599 describe un preparado de detergente que contiene tanto una celulasa como una proteasa. Las celulasas también se han usado industrialmente como ayuda para la eliminación de pasta de impresión espesante y el exceso de colorante tras la impresión textil (EP 576 526).

- 35 El documento EP 383 828 describe composiciones detergentes granulares que contienen agente tensioactivo, un material de arcilla suavizante de tejidos y granulados de celulasa que contienen carbonato de calcio. El documento US 5.433.750 describe composiciones detergentes que contienen un agente tensioactivo, un sistema coadyuvante, una arcilla suavizante, un agente floculante de arcilla y una celulasa de alta actividad, preferentemente celulasa de *Humicola insolens*. El documento US 5.520.838 describe composiciones detergentes granulares que comprenden agente tensioactivo, un coadyuvante y una celulasa, preferentemente una celulasa de *Humicola insolens*, estando dichas composiciones en una forma compacta, que tiene una densidad relativamente alta y que contiene una baja cantidad de sal de carga inorgánica.

Las enzimas celulasas se usan en una amplia variedad de industrias, además de la industria textil. Por ejemplo, las celulasas se usan industrialmente para el destintado de periódicos y revistas (EP 521.999), para mejorar el drenaje de la pulpa (WO 91/14822, WO 91/17243) y como tratamiento para piensos animales.

- 45 Las propiedades exclusivas de cada celulasa hacen que algunas sean más adecuadas para determinados fines que otras. Aunque las enzimas difieren en una serie de aspectos, una de las diferencias más importantes es el pH óptimo. Las celulasas neutras tienen actividad celulasa útil en el intervalo de pH de 6-8 y las celulasas alcalinas tienen actividad celulasa útil en el intervalo de pH de 7,5-10. Las celulasas ácidas son activas en el intervalo de pH de 4,5-6, pero tienen una baja actividad celulasa a valores de pH altos.

- 50 Las celulasas neutras y ácidas son especialmente útiles en la industria textil. Klahorst, S. *et al*, "Textile Chemist and Colorist 26:13-18, 1994; Nilsson, T. E., *Aachen Textile Conference, DWI Reports* 114:85-88 (1995); Videbaek, T. *et al.*, "ITB Dyeing/Printing/Finishing", enero de 1994, pág. 25-29; Klahorst, S. *et al*, *AATCC Int. Conf. & Exhibit*, 4-7 de octubre de 1992, pág. 243, Atlanta, GA; Kochavi, D. *et al.*, "Am. Dyestuff Resporter", septiembre de 1990, pág. 26-28; Tyndall, R. Michael, "Textile Chemist and Colorist" 24:23 (1992); Lange, N. K., en "Proc. Second TR1CEL Symp. on *Trichoderma reesei* Cellulases and Other Hydrolases", Espoo, Finlandia, 1993, ed. P. Suominen *et al.*, "Foundation for Biotechnical and Industrial Fermentation Research" vol. 8, 1993, pág. 263-272. Cuando se usan en el tratamiento de productos textiles, las celulasas atacan las cadenas de las moléculas de celulosa que forman las fibras de

algodón, afectando de esta manera a las características del tejido.

5 El documento WO 95/24471 se refiere a variantes de una familia de 7 celulasas que comprenden un núcleo y, opcionalmente, un enlace C-terminal de 10 aminoácidos o menos. Las celulasas muestran una mejor actividad enzimática en el intervalo de pH alcalino, mientras que ejercen una acción celulolítica moderada en el sustrato de celulosa. El documento desvela una secuencia de aminoácidos de una endoglucanasa de una cepa de *Myceliophthora thermophila*. El documento también se refiere al uso de las variantes de celulasa en composiciones detergentes, especialmente para la eliminación de la suciedad o el aclarado del color o la prevención de la retrotinción; en suavizantes de productos textiles; para el biopulido de productos textiles; para mejorar el drenaje de la pulpa de papel; y para la degradación vegetal.

10 El documento WO 89/09259 se refiere a un preparado de celulasa útil para reducir la aspereza de los productos textiles que contienen algodón y para reducir la velocidad a la que los productos textiles se vuelven ásperos, que comprende aproximadamente 40 % o más, en base al contenido de proteína total, de un componente de endoglucanasa con una actividad endoasa alta y afinidad hacia la celulosa. La celulasa se obtiene de una cepa de *Humicola*, *Trichoderma*, *Myceliophthora*, *Penicillium*, *Irpex*, *Aspergillus*, *Sulpalidium* o *Fusarium*.

15 El documento US 4.106.989 se refiere a una celulasa termoestable de *Sporotrichum cellulophilum* y a un método de producción de la misma. La celulasa termoestable hidroliza la celulosa a una temperatura elevada y produce glucosa y otros subproductos útiles. La celulasa termoestable se encontró en un caldo de cultivo de un hongo perteneciente a *Sporotrichum cellulophilum*.

20 El documento US 3.438.864 se refiere a un método de producción de una celulasa mediante el cultivo de una cepa de un moho de *Eumyces* en un medio líquido estéril que comprende fuentes de carbono y nitrógeno. El documento desvela que el medio de cultivo de *Myriococcum albomyces* ATCC 16425 contiene una enzima disgregante de la celulosa y también una sustancia de antibiótico. Se saló el medio de cultivo filtrado y centrifugado para hacer precipitar la enzima celulasa. El documento no describe el aislamiento ni la purificación de ninguna enzima celulasa de *Myriococcum albomyces*.

25 El documento DE 1767773 se refiere a un método de preparación de una celulasa mediante el cultivo de una cepa de *Trichoderma*, *Myrothecium*, *Penicillium*, *Apergillus*, *Chaetomium*, *Xylaria*, *Polyporous* o *Trametes* en condiciones ácidas.

30 El documento WO 91/17244 describe una enzima degradante de la celulosa o la hemicelulosa que se puede obtener de un hongo distinto de *Trichoderma* o *Phnerochaete*, y que comprende un dominio de unión a hidratos de carbono homólogo a una región A terminal de las celulasas de *Trichoderma reesei*. El dominio de unión a hidratos de carbono comprende la secuencia de aminoácidos (α) o una subsecuencia de la misma que es capaz de efectuar la unión de la enzima a un sustrato celulósico o hemicelulósico insoluble.

35 Tradicionalmente, en el "lavado a la piedra", se han usado piedras pómez para cambiar las características del tejido. Gradualmente, las celulasas están reemplazando a las piedras pómez, que también aportan al tejido su aspecto final deseado, pero que pueden dañar las máquinas, las prendas y el equipo de procesamiento de aguas residuales. Los documentos US 4.832.864, US 4.912.056, US 5.006.126, US 5.122.159, US 5.213.581 y EP 307.564 desvelan el uso de celulasas en el biolavado a la piedra.

40 Las celulasas son especialmente útiles para el lavado a la piedra de la tela vaquera teñida con índigo, pues el colorante permanece en su mayor parte en la superficie del hilo y no penetra bien en las fibras. Cuando se usa para tratar productos textiles de algodón, las celulasas neutras generalmente requieren un tiempo de lavado más prolongado que las celulasas ácidas. Sin embargo, las celulasas neutras disponibles son menos agresivas (activas) contra el algodón que las celulasas ácidas, y se ha publicado que no comprometen la resistencia del tejido tan fácilmente como las celulasas ácidas. Las celulasas neutras tienen un perfil de pH más amplio y, por tanto, el aumento de pH que tiene lugar durante el biolavado a la piedra tiene poco efecto en la actividad de la enzima neutra.

45 El uso de las celulasas ácidas se ve dificultado por su tendencia a potenciar la retrotinción y el debilitamiento de los productos textiles. Además, el pH se debe ajustar a un intervalo adecuado para la función de las celulasas ácidas. Por consiguiente, existe una clara demanda de preparaciones de enzimas celulasas neutras que no provoquen la retrotinción ni el debilitamiento de los productos textiles.

50 Aunque se ha vuelto popular el uso de las celulasas en la industria textil, el simple cambio de la mezcla de celulasa que se usa puede producir un acabado diferente. Estos problemas se han centrado en la atención creciente por buscar mezclas reproducibles de celulasas con propiedades deseadas. Por lo tanto, existe una clara demanda, especialmente en la industria textil y de los detergentes, por nuevas celulasas activas a valores de pH neutros y alcalinos, que no comprometan la resistencia de los productos textiles, con buenas propiedades de limpieza y/o cuidado o reducción de la aspereza de los productos textiles.

55

Compendio de la invención

Reconociendo la importancia de identificar las enzimas útiles en el bioacabado y el biolavado a la piedra textil y en aplicaciones en detergentes, los inventores han explorado especies de hongos en busca de celulasas neutras y alcalinas con características enzimáticas que serían útiles en dicho tipo de tecnologías.

5 Estos estudios han dado lugar a nuevas celulasas procedentes de los géneros *Myceliophthora*, *Myriococcum* o *Melanocarpus*, *Sporotrichum* y *Chaetomium*.

Estos estudios han dado como resultado además la identificación de tres nuevas celulasas que son especialmente útiles en la industria textil y de los detergentes. Los preparados purificados de *Melanocarpus* sp. o *Myriococcum* sp. han revelado una celulasa 20 KDa con actividad endoglucanasa (designada en el presente documento "celulasa 20 K"), una celulasa 50 KDa ("celulasa 50 K") y una segunda celulasa 50 KDa ("celulasa B 50 K"). También se ha descubierto un nuevo producto génico con alta homología con la familia de las celulasas, denominado en el presente documento "proteína con CBD" (donde CBD significa "dominio de unión a celulosa").

La presente invención proporciona preparaciones enzimáticas que contienen la celulasa 20 K o la celulasa 50 K.

15 Por lo tanto, en un aspecto, la presente invención se refiere a una secuencia de nucleótidos aislada que codifica un polipéptido que tiene la actividad enzimática de la celulasa, siendo dicha secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en:

- (a) una secuencia de nucleótidos aislada que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 31 o 33, o de la Figura 19 o 21;
- 20 (b) una secuencia de nucleótidos aislada que comprende la secuencia de codificación de la secuencia de nucleótidos SEC ID N° 30 o 32, o de la Figura 19 o 21;
- (c) una secuencia de nucleótidos aislada que comprende la secuencia de codificación del inserto de ADN contenido de DSM 11024, DSM 11012, DSM 11025 o DSM 11014;
- 25 (d) una secuencia de nucleótidos aislada, cuya secuencia de codificación difiere de la secuencia de codificación de la secuencia de nucleótidos de uno cualquiera de (a) a (c) debido a la degeneración del código genético; y
- (e) una secuencia de nucleótidos aislada que codifica un polipéptido que tiene actividad celulasa y que tiene una secuencia de aminoácidos que muestra una identidad de al menos 80 % con la secuencia de SEC ID N° 31 o 33, o la Figura 19 o 21.

30 En otro aspecto, la invención se refiere a un vector que contiene la secuencia de nucleótidos según lo definido anteriormente.

En un tercer aspecto, la invención se refiere a una célula hospedadora transformada con dicho vector.

En un cuarto aspecto, la invención se refiere a un proceso de producción de un polipéptido que tiene actividad celulasa, que comprende las etapas de cultivar la célula hospedadora según lo definido anteriormente y recuperar la proteína del medio de cultivo.

35 En un quinto aspecto, la invención se refiere a un polipéptido que tiene actividad celulasa y que está codificado por la secuencia de nucleótidos según lo definido anteriormente, el vector según lo definido anteriormente y que se puede obtener mediante el proceso definido anteriormente.

En un sexto aspecto, la invención se refiere a una preparación enzimática que comprende un polipéptido que tiene actividad celulasa codificada por la secuencia de nucleótidos según lo definido anteriormente.

40 En aspectos adicionales, la invención se refiere a usos de la preparación enzimática en el biolavado a la piedra de productos textiles y prendas que contienen algodón, para el bioacabado de materiales textiles, en composiciones detergentes, para el tratamiento de pulpa o fibra derivada de la madera y para mejorar la calidad de piensos animales.

Breve descripción de las figuras

45 La Figura 1 (A y B) muestra las dependencias en el pH (Figura 1A) y en la temperatura (Figura 1B) de las actividades endoglucanasa de ALKO4179, CBS 689.95.

La Figura 2 (A y B) muestra las dependencias en el pH (Figura 2A) y en la temperatura (Figura 2B) de las actividades endoglucanasa de ALKO4124, CBS 687.95.

50 La Figura 3 (A y B) muestra las dependencias en el pH (Figura 3A) y en la temperatura (Figura 3B) de las actividades endoglucanasa de ALKO4237, CBS 685.95.

La Figura 4 (A y B) muestra las dependencias en el pH (Figura 4A) y en la temperatura (Figura 4B) de las actividades endoglucanasa de ALKO4265, CBS 730.95.

La Figura 5 (A y B) muestra las dependencias en el pH (Figura 5A) y en la temperatura (Figura 5B) de las actividades endoglucanasa de ALKO4125, CBS 688.95.

- 5 La Figura 6 (A y B) muestra el efecto del lavado y de la retención (Figura 6A) y de la coloración azul (Figura 6B) con las celulasas neutras.

La Figura 7 (A y B) muestra el efecto de lavado y de la retención (Figura 7A) y de la coloración azul (Figura 7B) con Ecostone L con dosis gradualmente crecientes de enzimas. 1X corresponde a la dosis de enzima de las celulasas neutras en las Figuras 6A y 6B.

- 10 La Figura 8 muestra la purificación de la celulasa 20 K del Pico II por cromatografía sobre SP-Sepharose™. Se aplicó una muestra que contenía 11,7 g de proteína y 576.000 ECU a una columna de 4,5 x 31 cm, que se desarrolló como se describe en el Ejemplo 9. Se recogieron fracciones de 15 ml. Las actividades endoglucanasa del pico en las fracciones 148-161 están mal estimadas, porque la cristalización se produjo antes de que la enzima se pudiera diluir suficientemente para el ensayo. El material cristalino de dichas fracciones contenía 486.000 ECU.

- 15 La Figura 9 (A y B) muestra el análisis de SDS-PAGE de la celulasa 20 K. Las masas moleculares de los patrones se muestran en kDa.

A: material parcialmente cristalino precipitado de las fracciones de S-Sepharose™ activas (calle 1).

- 20 B: fracciones de la cromatografía del material parcialmente cristalino sobre Sephadex G50. Las fracciones mostradas en las calles 19 y 25 no contenían actividad endoglucanasa. Para el resto de fracciones, las cantidades de actividad (en ECU) aplicadas en el gel fueron las siguientes: fracción 27: 0,4; 29: 2,4 (como 3,0 µg de proteína); 30: 2,1; 31: 1,9; 33: 0,46; y 35: 1,1.

- 25 La Figura 10 muestra la separación de la celulasa 50 K y la celulasa B 50 K del pico III/IV por cromatografía en SP-Sepharose™. Se aplicó una muestra que contenía 200 mg de proteína y 14.800 ECU en la columna de 2,5 x 11 cm, que se desarrolló como se describe en el Ejemplo 9. Se recogieron fracciones de 6,8 ml. Se eluyó una cantidad menor de celulasa 50 K antes del gradiente de NaCl, mientras que la mayoría de la celulasa 50 K se eluyó a aproximadamente NaCl 50 mM. La celulasa B 50 K se encontró en el pico principal de proteína a aproximadamente NaCl 80 mM.

- 30 La Figura 11 muestra un análisis de SDS-PAGE de celulasa de 50K purificada (11A) y celulasa B de 50K (11B). Los números de la calle indican las fracciones (3,3 ml) eluidas de la fenil-Sepharose. Para las fracciones 36-41, se aplicaron 2,5 µl de cada fracción al gel. Para las otras fracciones, se aplicaron 2 µl. El pico de la celulasa de 50K se encontró en las fracciones 37-38 (11A) (que contenía 780 y 880 ECU/ml, respectivamente). El pico de la celulasa B de 50K estaba en las fracciones 30 y 31 (11B), que contenían una actividad insignificante (inferior a 4 ECU/ml).

La Figura 12 muestra la dependencia de la temperatura de la actividad endoglucanasa de la celulasa de 50K a pH 7,0 y un tiempo de reacción de 60 min.

- 35 La Figura 13 muestra la dependencia del pH de la actividad endoglucanasa de la celulasa de 50K a 50 °C (♦) y a 70 °C (□).

- 40 La Figura 14 muestra un análisis Western usando antisuero de celulasa 20 K como sonda. Las calles 1, 2 y 3 contienen 25 µg de proteína de los picos de DEAE-Sepharose I, III y IV, respectivamente. Las calles 4 y 5 contienen 2,0 y 0,2 µg de celulasa 50 K pura, y la calle 6 contiene 0,6 µg de celulasa B 50 K pura. Las calles 7 y 8 contienen aproximadamente 25 µg de proteína de todo el medio de crecimiento de ALKO4237 y ALKO4124, respectivamente.

La Figura 15 muestra la dependencia de la temperatura de la actividad endoglucanasa de la celulasa de 20K a pH 7 (tiempos de reacción de 10 min).

La Figura 16 (A y B) muestra la dependencia del pH de la actividad endoglucanasa de la celulasa 20 K para el tiempo de reacción de (a) 10 minutos o (b) 60 minutos.

- 45 La Figura 17 muestra los datos de la secuencia de aminoácidos derivados de la secuenciación de la celulasa 20 K descrita en el material ilustrativo del presente documento. La secuencia 429 procede del extremo N de la proteína, y el resto de secuencias proceden de péptidos tripticos internos.

La Figura 18 muestra los mapas de restricción del ADN de *Melanocarpus albomyces* en plásmidos pALK1221, pALK1222 y pALK1223, que portan el gen de la celulasa 20 K.

- 50 La Figura 19 muestra la secuencia de ADN del gen de la celulasa 20 K. La flecha indica el sitio de procesamiento de la peptidasa señal predicha.

La Figura 20 muestra los mapas de restricción del ADN de *Melanocarpus albomyces* en plásmidos pALK1233, pALK1234, pALK1226 y pALK1227, que portan el gen de la celulasa 50 K.

La Figura 21 (A y B) muestra la secuencia de ADN del gen de la celulasa 50 K. La flecha indica el sitio de procesamiento de la peptidasa señal predicha.

- 5 La Figura 22 muestra los mapas de restricción del ADN de *Melanocarpus albomyces* en plásmidos pALK1229 y pALK1236, que portan el gen de la celulasa B 50 K.

La Figura 23 (A y B) muestra la secuencia de ADN del gen de la celulasa B 50 K. La flecha indica el sitio de procesamiento de la peptidasa señal predicha.

La Figura 24 muestra el mapa del plásmido pTTc01.

- 10 La Figura 25 muestra el mapa del plásmido pMS2.

La Figura 26 muestra el mapa de restricción del ADN de *Melanocarpus albomyces* en el plásmido pALK1230, que porta ADN que codifica la proteína con CBD. La secuencia presentada en la Figura 27 está marcada con una flecha en la Figura 26.

La Figura 27 muestra la secuencia de ADN del gen de la celulasa de la proteína con CBD en pALK1230.

- 15 La Figura 28 muestra el mapa del plásmido pALK1231.

La Figura 29 muestra el mapa del plásmido pALK1235.

- 20 La Figura 30 muestra un análisis Western usando antisuero de celulasa 20 K como sonda. Las calles 1 y 2 contienen aproximadamente 10 µg de proteína de todo el medio de crecimiento de los transformantes ALKO3620/pALK1235/49 y ALKO3620/pALK1235/40. La calle 3 contiene aproximadamente 10 µg de proteína de todo el medio de crecimiento de ALKO3620. Las calles 4 y 5 contienen aproximadamente 10 µg de proteína de todo el medio de crecimiento de los transformantes ALKO3620/pALK1231/16 y ALKO3620/pALK1231/14. La calle 6 contiene 100 ng de celulasa 20 K pura.

La Figura 31 muestra el mapa del plásmido pALK1238.

La Figura 32 muestra el mapa del plásmido pALK1240.

25 **Depósitos**

ALKO4179, *Myceliophthora thermophila* se depositó como CBS 689.95 el 12 de octubre de 1995, en Centraalbureau voor Schimmelcultures, C.C. 273.3740 AG BAARN.

ALKO4124, *Myriococcum* sp. se depositó como CBS 687.95 el 12 de octubre de 1995, en Centraalbureau voor Schimmelcultures, C.C. 273.3740 AG BAARN.

- 30 ALKO4237, *Melanocarpus albomyces* (= *Myriococcum albomyces* = *Thielavia albomyces*; Guarro *et al.*, 1996, *Mycol. Res.* 100(1):75.) se depositó como CBS 685.95 el 11 de octubre de 1995, en Centraalbureau voor Schimmelcultures, C.C. 273.3740 AG BAARN.

ALKO4125, *Sporotrichum thermophile* se depositó como CBS 688.95 el 12 de octubre de 1995, en Centraalbureau voor Schimmelcultures, C.C. 273.3740 AG BAARN.

- 35 ALKO4265, *Chaetomium thermophilum* La Touche se depositó como CBS 730.95 el 8 de noviembre de 1995, en Centraalbureau voor Schimmelcultures, C.C. 273.3740 AG BAARN.

- 40 El plásmido pALK1221 se depositó como DSM 11024 el 21 de junio de 1996 y λ4237/5.1 se depositó como DSM 11012 el 21 de junio de 1996, en Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1B, D-38124 Braunschweig, Alemania. Ambos contienen el gen de la celulasa 20 K de *Melanocarpus albomyces* CBS 685.95.

El plásmido pALK1227 se depositó como DSM 11025 el 21 de junio de 1996 y λ4237/35 se depositó como DSM 11014 el 21 de junio de 1996, en Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1B, D-38124 Braunschweig, Alemania. Ambos contienen el gen de la celulasa 50 K de *Melanocarpus albomyces* CBS 685.95.

- 45 El plásmido pALK1229 se depositó como DSM 11026 el 21 de junio de 1996 y λ4237/3 se depositó como DSM 11011 el 21 de junio de 1996 y λ4237/18 se depositó como DSM 11013 el 21 de junio de 1996, en Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1B, D-38124 Braunschweig, Alemania. pALK1229 contiene ADN que codifica la celulasa B 50 K, λ4237/3 y λ4237/18 el gen de la celulasa B 50 K de

Melanocarpus albomyces CBS 685.95.

El plásmido pALK1230 se depositó como DSM 11027 el 21 de junio de 1996 en Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1B, D-38124 Braunschweig, Alemania. pALK1230 contiene el gen de proteína con CBD de *Melanocarpus albomyces* CBS 685.95.

5 Descripción detallada de las realizaciones preferidas

En la descripción que figura a continuación, se utiliza ampliamente una serie de términos y expresiones usados en la tecnología de la industria textil. Para proporcionar una comprensión clara y coherente de la memoria descriptiva y de las reivindicaciones, incluyendo el alcance que debe darse a dichos términos y expresiones, se proporcionan las siguientes definiciones.

10 **Biolavado a la piedra.** "Biolavado a la piedra" del tejido o de la prenda significa el uso de enzimas en lugar, o además, del uso de piedras pómez para el tratamiento del tejido o de la prenda, especialmente de tela vaquera.

15 **Bioacabado.** "Bioacabado" se refiere al uso de enzimas en una hidrólisis controlada de fibras celulósicas para modificar la superficie del tejido o del hilo de manera que impida permanentemente la acumulación de fibra en la superficie del tejido, mejore el tacto del tejido tal como su blandura y suavidad, limpie la estructura de la superficie reduciendo la formación de pelusa, lo que produce el aclaramiento de los colores, mejore la drapabilidad del tejido, mejore la capacidad de absorción de la humedad, lo que también puede mejorar la absorción de colorantes.

Retrotinción. El colorante liberado tiende a volverse a depositar sobre la superficie de las fibras del tejido. Este efecto se denomina "retrotinción".

20 **Detergente.** "Detergente" pretende significar agente limpiador que puede contener agentes tensioactivos (tensioactivos aniónicos, no iónicos, catiónicos y anfóteros), coadyuvantes y otros ingredientes opcionales tales como agentes anti-redeposición y agentes de suspensión de la suciedad, abrillantadores ópticos, agentes blanqueadores, colorantes y pigmentos e hidrolasas. En la patente de EE.UU. N° 5.433.750, se ofrece un listado adecuado del contenido de los detergentes, y en la patente de EE.UU. N° 3.664.961, se ofrece un listado adecuado de tensioactivos

25 **Preparación enzimática.** "Preparación enzimática" pretende significar una composición que contiene enzimas. Preferentemente, las enzimas se han extraído de (bien parcial o completamente purificadas de) un microbio o del medio usado para cultivar dicho microbio. "**Extraído de**" significa que las enzimas deseadas se separan de la masa celular. Esto se puede realizar mediante cualquier método que consiga dicho objetivo, incluyendo la ruptura de células y también la simple eliminación del medio de cultivo de células usadas. Por lo tanto, la expresión
30 "preparación enzimática" incluye composiciones que contienen medios previamente usados para cultivar uno o varios microbios deseados y cualquier enzima que se haya liberado de las células microbianas a dicho medio durante el cultivo, o las etapas de procesamiento corriente abajo.

Hospedador que es "**sustancialmente incapaz**" de sintetizar una o más enzimas pretende significar un hospedador en el que la actividad de una o más de las enzimas enumeradas está reducida, es deficiente o está ausente en
35 comparación con el tipo silvestre.

Una secuencia de aminoácidos que es un "**equivalente**" de una secuencia de aminoácidos específica pretende significar una secuencia de aminoácidos que no es idéntica a la secuencia de aminoácidos específica, pero que, en cambio, contiene al menos algunos cambios de aminoácidos (eliminaciones, sustituciones, inversiones, inserciones, etc.) que no afectan esencialmente a la actividad biológica de la proteína en comparación con una actividad similar
40 de la secuencia de aminoácidos específica, cuando se usa para un fin deseado. La actividad biológica de una celulasa es su actividad catalítica y/o su capacidad de unirse a material celulósico. La actividad biológica de la celulasa B 50 K incluye, además, su capacidad para actuar de forma sinérgica con las celulasas. Preferentemente, una secuencia de aminoácidos "equivalente" contiene al menos de 80 % a 99 % de identidad a nivel de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos específica, lo más preferentemente al menos 90 % y, en una realización muy especialmente preferida, al menos 95 % de identidad a nivel de aminoácidos.
45

Vehículo de clonación. Un vehículo de clonación es un ADN de plásmido o fago, u otra secuencia de ADN (tal como un ADN lineal) que proporciona un entorno portador de ácido nucleico apropiado para la transferencia de un gen de interés a una célula huésped. Los vehículos de clonación de la invención se pueden diseñar para replicarse de manera autónoma en hospedadores procariotas y eucariotas. En hospedadores fúngicos tales como
50 *Trichoderma*, los vehículos de clonación generalmente no se replican de forma autónoma, sino que simplemente proporcionan un vehículo para el transporte del gen de interés hacia el hospedador de *Trichoderma* para la posterior inserción en el genoma de *Trichoderma*. El vehículo de clonación se puede caracterizar además por uno o un pequeño número de sitios de reconocimiento de endonucleasas, en los que dichas secuencias de ADN se pueden cortar de una manera determinada sin pérdida de una función biológica esencial del vehículo, y en los que el ADN se puede cortar y empalmar para llevar a cabo la replicación y la clonación de dicho ADN. El vehículo de clonación puede contener además un marcador adecuado para su uso en la identificación de células transformadas con el
55 vehículo de clonación. Los marcadores son, por ejemplo, de resistencia a antibióticos. Como alternativa, dichos

marcadores se pueden proporcionar en un vehículo de clonación que esté separado del que suministra el gen de interés. El término "vector" a veces se usa para "vehículo de clonación".

5 **Vehículo de expresión.** Un vehículo de expresión es un vehículo o vector de clonación similar a un vehículo de clonación, pero que es capaz de expresar un gen de interés tras la transformación en un hospedador deseado. Cuando se usa un hospedador fúngico, el gen de interés se proporciona preferentemente a un hospedador fúngico como parte de un vehículo de clonación o expresión que integra en su interior el cromosoma fúngico, o permite que el gen de interés se integre en el cromosoma del hospedador. Las secuencias que forman parte del vehículo de clonación o vehículo de expresión también se pueden integrar con el gen de interés durante el proceso de integración. En *T. reesei*, los sitios de integración a los que el gen de interés se puede dirigir incluyen los locus *cbh* y/o *egl*. Lo más preferentemente, el gen de interés se dirige a reemplazar uno o más genes que codifican características no deseables.

El gen de interés también se sitúa preferentemente bajo el control de (es decir, está unido operativamente a) ciertas secuencias de control tales como secuencias promotoras proporcionadas por el vector (que se integran con el gen de interés). Como alternativa, las secuencias de control pueden ser las del sitio de inserción.

15 Las secuencias de control de la expresión de un vector de expresión variarán en función de si el vector está diseñado para expresar un determinado gen en un hospedador procarionta o eucarionta (por ejemplo, un vector lanzadera puede proporcionar un gen para la selección en hospedadores bacterianos). Las secuencias de control de la expresión pueden contener elementos reguladores de la transcripción tales como promotores, elementos potenciadores y secuencias de terminación de la transcripción, y/o elementos reguladores de la traducción tales como, por ejemplo, sitios de inicio y terminación de la traducción.

De acuerdo con la invención, se proporcionan celulasas neutras y alcalinas, y métodos de producción de dichas celulasas neutras y alcalinas útiles, que son deseables para el tratamiento de materiales textiles.

Los hospedadores nativos que producen las proteínas descritas en el presente documento son:

- 25 1) ALKO4179, *Myceliophthora thermophila*; depositado como CBS 689.95 en Centraalbureau voor Schimmelcultures, C.C. 273.3740 AG BAARN.
 2) ALKO4124, *Myriococcum* sp.; depositado como CBS 687.95;
 3) ALKO4237, *Melanocarpus albomyces*, depositado como CBS 685.95;
 4) ALKO4125, *Sporotrichum thermophila*, depositado como CBS 688.95; y
 5) ALKO4265, *Chaetomium thermophilum La Touche*, depositado como CBS 730.95.

30 Una realización preferida específica descrita en el presente documento es el medio de cultivo usado de los hospedadores nativos o preparaciones enzimáticas preparadas a partir del medio de cultivo.

En la presente invención, se proporcionan la celulasa 20 K y la celulasa 50 K purificadas. Dichas proteínas se pueden obtener, por ejemplo, a partir de *Melanocarpus* sp. o *Myriococcum* sp. como se describe en el presente documento y, especialmente, en el Ejemplo 9.

35 Se han generado los datos de las secuencias de aminoácidos de las celulasas descritas en el presente documento. Por consiguiente, la invención también se dirige a celulasas neutras o alcalinas que contienen una o más de las secuencias de aminoácidos mostradas en el presente documento. Así pues, la invención pretende dirigirse a cualquier celulasa neutra o alcalina que sea un equivalente funcional de la celulasa 20 K o la celulasa 50 K, y que tenga una o más de las secuencias de aminoácidos descritas en el presente documento, o sustancialmente la misma secuencia. Dichas celulasas neutras o alcalinas se pueden obtener de otras cepas de la misma especie o de organismos divergentes.

45 En realizaciones preferidas adicionales, la celulasa 20 K se proporciona con el material de picos separados formados durante los procedimientos de purificación ilustrados (por ejemplo, combinaciones de DEAE-Sepharose I, III o IV de la Tabla VIII del presente documento). En otras realizaciones adicionales más, se pueden usar otras proteínas en el medio ALKO 4237 de *Melanocarpus albomyces*, bien solas o en combinación con otras de dichas proteínas.

En realizaciones preferidas adicionales, la celulasa 50 K se proporciona con el material de picos separados formados durante los procedimientos de purificación ilustrados. En otras realizaciones adicionales más, se pueden usar otras proteínas en el medio ALKO 4237, bien solas o en combinación con otras de dichas proteínas

50 En realizaciones preferidas adicionales, la celulasa B 50 K se proporciona con el material de picos separados formados durante los procedimientos de purificación ilustrados. En otras realizaciones adicionales más, se pueden usar otras proteínas en el medio ALKO 4237, bien solas o en combinación con otras de dichas proteínas

55 Como se describe en el presente documento, ALKO 4265, *Chaetomium thermophilum La Touche*, depositado como CBS 730.95, se usa en el presente documento como un ejemplo de una celulasa neutra que no se prefiere en el método de biolavado a la piedra de la invención debido a que produce retrotinción. Sin embargo, existen pruebas de

que es útil en otras aplicaciones (por ejemplo, en detergentes).

El proceso de modificación mediante ingeniería genética de los huéspedes de la invención se facilita a través de la clonación de secuencias genéticas que codifican la proteína deseada y a través de la expresión de dichas secuencias genéticas. Como se usa en el presente documento, la expresión "secuencias genéticas" pretende referirse a una molécula de ácido nucleico (preferentemente ADN). Las secuencias genéticas que codifican la proteína deseada se obtienen de una variedad de fuentes. Dichas fuentes incluyen ADN genómico, ADNc, ADN sintético y combinaciones de los mismos. Se pueden usar sistemas de vectores para producir hospedadores para la producción de las preparaciones enzimáticas de la invención. Dicha construcción vectorial (a) puede proporcionar además una construcción vectorial separada (b) que codifique al menos un gen deseado para su integración en el genoma del hospedador y (c) un marcador seleccionable acoplado a (a) o (b). Como alternativa, para el marcador, se puede usar un vector separado.

Se dice que una molécula de ácido nucleico, tal como ADN, es "capaz de expresar" un polipéptido si dicha molécula contiene secuencias de control de la expresión que contienen información reguladora de la transcripción y dichas secuencias están "unidas operativamente" a la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido.

Una unión operativa es una unión en la que una secuencia está conectada con una secuencia (o secuencias) reguladora de manera que sitúa la expresión de la secuencia bajo la influencia o el control de la secuencia reguladora. Se dice que dos secuencias de ADN (tal como una secuencia de codificación de la proteína y una secuencia de la región promotora unida al extremo 5' de la secuencia de codificación) están unidas operativamente si la inducción de la función del promotor genera la transcripción del ARNm de la secuencia que codifica la proteína y si la naturaleza de la unión entre las dos secuencias de ADN no (1) provoca la introducción de una mutación de cambio en la estructura; (2) interfiere con la capacidad de las secuencias reguladoras de la expresión para dirigir la expresión del ARNm, ARN antisentido o proteína; o (3) interfiere con la capacidad del molde que va a ser transcrito por la secuencia de la región promotora. Así pues, la región promotora estaría unida operativamente a una secuencia de ADN si el promotor fuera capaz de efectuar la transcripción de dicha secuencia de ADN.

La naturaleza exacta de las regiones reguladoras necesarias para la expresión génica puede variar entre especies o tipos de células, pero en general incluirá, según sea necesario, secuencias que no transcriben 5' y secuencias que no traducen 5' (que no codifican) implicadas en la iniciación de la transcripción y la traducción, respectivamente. La expresión de la proteína en los hospedadores transformados requiere el uso de regiones reguladoras funcionales en dichos hospedadores. Se puede emplear una amplia variedad de secuencias reguladoras de la transcripción y de la traducción. En eucariotas, donde la transcripción no está ligada a la traducción, dichas regiones de control pueden o no proporcionar un codón de iniciación de metionina (AUG), dependiendo de si la secuencia clonada contiene dicha metionina. Dichas regiones incluirán, en general, una región promotora suficiente para dirigir la iniciación de la síntesis de ARN en la célula huésped.

Como se sabe ampliamente, la traducción del ARNm eucariota se inicia en el codón que codifica la primera metionina. Por este motivo, es preferible asegurarse de que la unión entre un promotor eucariota y una secuencia de ADN que codifica la proteína, o un derivado funcional de la misma, no contiene ningún codón intermedio capaz de codificar una metionina. La presencia de dichos codones genera bien la formación de una proteína de fusión (si el codón AUG está en la misma fase de lectura que la proteína que codifica la secuencia de ADN) o una mutación de cambio en la estructura (si el codón AUG no está en la misma fase de lectura que la secuencia que codifica la proteína).

En una realización preferida, se secreta una proteína deseada en el medio circundante debido a la presencia de una secuencia señal de secreción. Si una proteína deseada no posee su propia secuencia señal, o si dicha secuencia señal no funciona bien en el hospedador, entonces la secuencia que codifica la proteína se puede unir operativamente a una secuencia señal homóloga o heteróloga al hospedador. La secuencia de codificación deseada se puede unir a cualquier secuencia señal que permita la secreción de la proteína del hospedador. Dichas secuencias señal se pueden diseñar con o sin sitios proteasa específicos, de manera que la secuencia peptídica señal se pueda eliminar posteriormente. Como alternativa, se puede usar un hospedador que vierte la proteína en el medio, por ejemplo, un hospedador con una mutación en su membrana.

Si se desea, se pueden obtener las regiones 3' no transcritas y/o no traducidas a la secuencia de codificación de una proteína mediante los métodos de clonación descritos anteriormente. Se puede retener la región 3' no transcrita por sus elementos de la secuencia reguladora de terminación de la transcripción; se puede retener la región 3' no traducida por sus elementos de la secuencia reguladora de la terminación de la traducción, o por aquellos elementos que dirigen la poliadenilación en células eucariotas.

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

En una realización preferida, se construyen transformantes genéticamente estables mediante los que el ADN de una proteína deseada se integra en el cromosoma del hospedador. La secuencia de codificación para la proteína deseada puede proceder de cualquier fuente. Dicha integración puede ocurrir *de novo* dentro de la célula o, en una

realización más preferida, estar asistida por la transformación con un vector que se inserte funcionalmente en el cromosoma del hospedador, por ejemplo, elementos de ADN que potencien la integración de secuencias de ADN en cromosomas.

5 Se seleccionan células que han integrado de manera estable el ADN introducido en sus cromosomas introduciendo también uno o más marcadores que permiten la selección de células huésped que contienen el vector de expresión en el cromosoma, por ejemplo, el marcador puede proporcionar resistencia biocida, por ejemplo, resistencia a antibióticos, o metales pesados tales como el cobre o similares. El gen marcador seleccionable bien puede estar directamente unido a las secuencias de ADN del gen que se va a expresar o introducido en la misma célula por cotransformación.

10 Los factores relevantes en la selección de un determinado plásmido o vector viral incluyen: la facilidad con la que las células receptoras que contienen el vector se pueden reconocer y seleccionar entre aquellas células receptoras que no contienen el vector; el número de copias del vector que se desea en un determinado hospedador; y si es deseable que sea capaz de "transportar" el vector entre células huésped de distintas especies.

15 Una vez que el vector o la secuencia de ADN que contiene la/s construcción/es está preparado para la expresión, se introduce/n la/s construcción/es de ADN en una célula huésped apropiada mediante cualquiera de una variedad de medios adecuados, incluyendo la transformación como se ha descrito anteriormente. Tras la introducción del vector, se cultivan células receptoras en un medio selectivo, que selecciona el crecimiento de células transformadas. La expresión de la/s secuencia/s del gen clonado genera la producción de la proteína deseada, o la producción de un fragmento de dicha proteína. Esta expresión puede tener lugar de una manera continua en las células transformadas o de una manera controlada.

20 Por consiguiente, las secuencias de codificación de la proteína descritas en el presente documento se pueden unir operativamente a cualquier vector deseado y transformarse en un hospedador seleccionado, para proporcionar la expresión de dichas proteínas en ese hospedador.

25 También se describen las moléculas de ácido nucleico que codifican proteínas que tienen la actividad biológica de una celulasa y que se hibridan a cualquiera de las secuencias de nucleótidos definidas en la reivindicación 1.

30 El término "hibridación" en el presente contexto significa hibridación en condiciones de hibridación convencionales, preferentemente en condiciones rigurosas tales como las descritas, por ejemplo, por Sambrook *et al.* (1989, "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", II Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY). Dichas moléculas de ácido nucleico que se hibridan con las moléculas de ácido nucleico descritas en el presente documento, en principio, se pueden obtener de cualquier organismo que posea dichas moléculas de ácido nucleico. Preferentemente, se obtienen de hongos, concretamente los del género *Melanocarpus*, *Myriococcum*, *Sporotrichum*, *Myceliophthora* y *Chaetomium*. Las moléculas de ácido nucleico que se hibridan con las moléculas de ácido nucleico descritas en el presente documento se pueden aislar, por ejemplo, de librerías genómicas o librerías de ADNc de diversos organismos, concretamente de hongos.

35 Dichas moléculas de ácido nucleico se pueden identificar y aislar usando las moléculas de ácido nucleico descritas en el presente documento o fragmentos de dichas moléculas o los complementos invertidos de dichas moléculas, por ejemplo, por hibridación de acuerdo con técnicas convencionales (véase Sambrook *et al.* (1989)).

40 Como sonda de hibridación se pueden usar, por ejemplo, moléculas de ácido nucleico que tienen exacta o sustancialmente la misma secuencia de nucleótidos indicada en las figuras o fragmentos de dicha secuencia. Los fragmentos usados como sondas de hibridación también pueden ser fragmentos sintéticos obtenidos mediante técnicas de síntesis convencionales, y cuya secuencia es sustancialmente idéntica a la de las moléculas de ácido nucleico descritas en el presente documento. Una vez identificados y aislados los genes que se hibridan con dichas moléculas de ácido nucleico, es necesario determinar la secuencia y analizar las propiedades de las proteínas codificadas por dicha secuencia.

45 La expresión "molécula de ADN que se hibrida" incluye fragmentos, derivados y variantes alélicas de las moléculas de ácido nucleico anteriormente descritas que codifican la proteína anteriormente descrita o un fragmento biológicamente activo de la misma. Se entiende que los fragmentos forman parte de moléculas de ácido nucleico suficientemente largas para codificar la proteína descrita o un fragmento biológicamente activo de la misma. El término "derivativo" significa en el presente contexto que las secuencias de nucleótidos de dichas moléculas difieren de las secuencias de las moléculas de ácido nucleico anteriormente descritas en una o más posiciones y son altamente homólogas a dicha secuencia. Se entiende que el término "homología" se refiere a la identidad de una secuencia de al menos 40 %, particularmente una identidad de al menos 60 %, preferentemente de más 80 % e incluso más preferentemente de más de 90 %. Las desviaciones de las moléculas de ácido nucleico descritas anteriormente pueden ser el resultado de eliminación, sustitución, inserción, adición o combinación.

55 La homología también significa que las respectivas secuencias de nucleótidos o proteínas codificadas son funcional y/o estructuralmente equivalentes. Las moléculas de ácido nucleico que son homólogas a las moléculas de ácido nucleico anteriormente descritas y que son derivativas de dichas moléculas de ácido nucleico, con frecuencia, son variaciones de dichas moléculas que representan modificaciones que tienen la misma función biológica. Pueden ser

variaciones naturales, tales como las secuencias de otros organismos o mutaciones. Dichas mutaciones pueden ocurrir de forma natural o se pueden obtener mediante mutagénesis específica. Además, dichas variaciones pueden ser secuencias producidas de forma sintética. Las variantes alélicas pueden ser variantes naturales al igual que las variantes producidas sintéticamente o diseñadas por ingeniería genética.

5 Las proteínas codificadas por las diversas variantes de las moléculas de ácido nucleico de la invención comparten características comunes específicas, tales como actividad enzimática, peso molecular, reactividad inmunológica, configuración, etc., al igual que propiedades físicas, tales como movilidad electroforética, comportamiento cromatográfico, coeficientes de sedimentación, solubilidad, propiedades espectroscópicas, estabilidad, pH óptimo, temperatura óptima, etc. Se puede detectar la actividad enzimática de la celulasa, por ejemplo, según lo descrito en
10 la página 7 y en lo Ejemplos 1 y 25.

La presente invención también se refiere a moléculas de ácido nucleico cuyas secuencias difieren de las secuencias de las moléculas identificadas anteriormente debido a la degeneración del código genético, y que codifican una proteína que tiene la actividad biológica de la celulasa.

15 Las moléculas de ácido nucleico de la invención son preferentemente moléculas de ARN o ADN, más preferentemente ADN genómico o ADNc.

También se describen en el presente documento los anticuerpos que reconocen específicamente una de las proteínas descritas anteriormente, así como los fragmentos de anticuerpos que tienen dicha propiedad. Dichos anticuerpos pueden ser monoclonales o policlonales. Los métodos para su producción son muy conocidos en la técnica, y se describen en detalle, por ejemplo, en Harlow y Lane "Antibodies, A Laboratory Manual", CSH Press,
20 Cold Spring Harbor Laboratory (1988).

Además, en el presente documento, también se describen oligonucleótidos que se hibridan específicamente con una molécula de ácido nucleico desvelada en el presente documento o con la cadena complementaria de dicha molécula de ácido nucleico. En este sentido, la expresión "que se hibrida específicamente" significa que dicho oligonucleótido se hibrida en condiciones de hibridación rigurosas específicamente con una molécula de ácido nucleico de la invención y no muestra, en dichas condiciones, hibridación cruzada con las secuencias que codifican otros polipéptidos. Preferentemente, dichos oligonucleótidos tienen una longitud de al menos 10 nucleótidos, más preferentemente de al menos 15 nucleótidos y lo más preferentemente de al menos 30 nucleótidos. Preferentemente, no son de más de 100 nucleótidos, más preferentemente no más de 80 nucleótidos y lo más preferentemente no más de 60 nucleótidos. Para garantizar que se hibridan específicamente a una molécula de ácido nucleico descrita en el presente documento, dichos oligonucleótidos muestran en su longitud total una identidad de al menos 80 %, preferentemente de al menos 95 % y lo más preferentemente de al menos 99 % con una secuencia de nucleótidos correspondiente de una molécula de ácido nucleico de la presente invención. Dichos oligonucleótidos se pueden usar, por ejemplo, como sondas para la detección de secuencias que codifican las celulasas en las bibliotecas genómicas o de ADNc o como cebadores de PCR.

35 Las secuencias de codificación de proteínas descritas en el presente documento se pueden fusionar en fase con otras secuencias para construir ADN que codifique una proteína de fusión. Por ejemplo, se puede preparar un vector recombinante que codifique una celulasa 50 K, una celulasa 20 K, una celulasa B 50 K o el gen de la proteína con CBD como se ha descrito anteriormente, a excepción de que la secuencia que codifica la proteína se fusiona con una secuencia de una celulasa, hemicelulasa o mananasa de *T. reesei*, o al menos un dominio funcional de dicha celulasa, hemicelulasa o mananasa, como se describe en el documento US 5.298.405, WO93/24622 y en el informe del GenBank L25310, estando todos ellos incorporados en el presente documento por referencia. Especialmente, la celulasa, hemicelulasa o mananasa se selecciona del grupo que consiste en CBHI, CBHII, EGI, EGII, XYLI, XYLII y MANI, o un dominio de los mismos, como la señal de secreción o la secuencia del núcleo. La mananasa tiene la misma estructura en el dominio que la de las celulasas: un dominio nuclear, que contiene el sitio activo, un dominio bisagra que contiene una región rica en serina-treonina, y una cola, que contiene el dominio de unión.

Se pueden construir péptidos de fusión que contengan un dominio nuclear de mananasa o celobiohidrolasa o endoglucanasa o xilanasas, o los dominios nuclear y bisagra de las mismas, fusionado con la secuencia que codifica la proteína deseada descrita en el presente documento. El resultado es una proteína que contiene un núcleo de mananasa o celobiohidrolasa o endoglucanasa o xilanasas, o regiones nuclear y bisagra, y una celulasa 50 K, una celulasa 20 K, una celulasa B 50 K o el gen de la proteína con CBD. La proteína de fusión contiene tanto las actividades de mananasa o celobiohidrolasa o endoglucanasa o xilanasas, como de la celulasa 50 K, la celulasa 20 K, la celulasa B 50 K o del gen de la proteína con CBD de los diversos dominios como se proporciona en la construcción de fusión.

55 También se pueden construir proteínas de fusión de manera que se incluya la cola de la mananasa o celobiohidrolasa o endoglucanasa o xilanasas, o un fragmento deseado de las mismas, situada antes de la celulasa 50 K, celulasa 20 K, celulasa B 50 K o la secuencia de la proteína con CBD, especialmente para permitir el uso de un sitio de proteasa inespecífico en la cola como un sitio de proteasa para la recuperación de la celulasa 50 K, celulasa 20 K, celulasa B 50 K o la secuencia de la proteína con CBD de la proteína de fusión expresada. Como alternativa, se pueden construir proteínas de fusión que proporcionen un sitio de proteasa en un enlazador que se

coloque antes de la celulasa 50 K, celulasa 20 K, celulasa B 50 K o la secuencia de la proteína con CBD, con o sin secuencias de cola.

Se pueden crear nuevas propiedades para las celulasas 50 K y 20 K, y para la celulasa B 50 K mediante dominios de fusión tales como un dominio de unión a celulosa (CBD), preferentemente con su enlazador, a las proteínas descritas en el presente documento. Preferentemente, dichos CBD y enlazadores son los dominios de CBD y enlazadores correspondientes de una celulasa de *Trichoderma*, mananasa o de la proteína con CBD de *Melanocarpus albomyces*.

La invención proporciona métodos de producción de preparaciones enzimáticas que son parcial o totalmente deficientes en una actividad celulolítica no deseada (es decir, en la capacidad de degradar la celulosa) y que están enriquecidas en la celulasa 50 K o celulasa 20 K como se desea para la industria textil o de detergentes, o para el procesamiento de la pulpa y del papel. La expresión "deficiente en actividad celulolítica" pretende significar una capacidad reducida, disminuida o inhibida de degradar celulosa en oligosacáridos menores. Dichas preparaciones deficientes en actividad celulolítica, y la preparación de las mismas mediante métodos de ADN recombinante, se describen en el documento US 5.298.405, incorporado en el presente documento por referencia. Preferentemente, la preparación es deficiente en actividades de EG y/o actividades de CBHI.

Según lo descrito en el presente documento, la celulasa 50 K o la celulasa 20 K puede ser proporcionada directamente por los hospedadores de la invención. Como alternativa, se puede usar medio usado para el crecimiento de los hospedadores, o celulasa 50 K, celulasa 20 K, celulasa B 50 K o la proteína con CBD purificada del mismo. Además, si las actividades deseadas están presentes en más de un hospedador recombinante, dichas preparaciones se pueden aislar de los hospedadores apropiados y combinarse antes de su uso en el método de la invención.

Para obtener las preparaciones enzimáticas de la invención, los hospedadores nativos o recombinantes anteriormente descritos que tienen las propiedades deseadas (es decir, hospedadores capaces de expresar cantidades económicamente viables de la celulasa 50 K o la celulasa 20 K y, opcionalmente, aquellos que son sustancialmente incapaces de expresar una o más de otras enzimas celulasa no deseadas) se cultivan en condiciones adecuadas, las enzimas deseadas se secretan de los hospedadores al medio de cultivo, y se recupera la preparación enzimática de dicho medio de cultivo mediante métodos conocidos en la técnica.

Las preparaciones enzimáticas de la invención se pueden producir mediante el cultivo de hospedadores recombinantes o cepas nativas en un fermentador sobre un medio de crecimiento adecuado (tal como, por ejemplo, se muestra en el Ejemplo 1 o en el Ejemplo 30).

La preparación enzimática puede ser el medio de cultivo con o sin las células huésped nativas o transformadas, o recuperarse del mismo mediante la aplicación de métodos bien conocidos en la técnica. Sin embargo, debido a que la celulasa 50 K, la celulasa 20 K o la celulasa B 50 K se secreta al medio de cultivo y muestra actividad en condiciones ambientales del licor hemicelulótico, es una ventaja que las preparaciones enzimáticas descritas en el presente documento se puedan utilizar directamente del medio de cultivo sin mayor purificación. Si se desea, dichas preparaciones se pueden liofilizar, o la actividad enzimática concentrar y/o estabilizar de otro modo para su almacenamiento. Las preparaciones enzimáticas de la invención resultan muy económicas de suministrar y usar, porque (1) las enzimas se pueden usar de una forma en bruto; el aislamiento de una enzima específica del medio de cultivo es innecesario; y (2) porque las enzimas se secretan al medio de cultivo, y solo es necesario extraer el medio de cultivo para obtener la preparación enzimática deseada; no hay necesidad de extraer una enzima de los hospedadores. Preferentemente, el hospedador para dicha producción es *Trichoderma*, y especialmente *T. reesei*.

Las preparaciones enzimáticas de la invención se pueden suministrar en forma de líquido o de sólido, por ejemplo, en un polvo seco, o en forma granular o líquida, especialmente en gránulos de no espolvoreo, o un líquido estabilizado, o la preparación enzimática también se puede concentrar o estabilizar de otro modo para su almacenamiento o uso. Se prevé que las preparaciones enzimáticas que contienen una o más de las celulasas neutras de la invención pueden estar todavía más enriquecidas, o prepararse parcial o completamente deficientes en actividades enzimáticas específicas, para satisfacer los requisitos de una utilidad específica en diversas aplicaciones, por ejemplo, en la industria textil. Se puede seleccionar una mezcla de actividades enzimáticas secretadas por un hospedador, y especialmente un hongo, para que sea ventajosa en una determinada aplicación industrial, por ejemplo, en el biolavado a la piedra.

Las preparaciones enzimáticas de la invención se pueden ajustar para satisfacer determinados requisitos en diversas aplicaciones de la industria textil, de detergentes, o de la pulpa y del papel.

Se pueden preparar mezclas con otras macromoléculas no todas secretadas del mismo hospedador (por ejemplo, otras enzimas tales como endoglucanasas, proteasas, lipasas, peroxidases, oxidasas o amilasas) o sustancias químicas que puedan mejorar el rendimiento, la estabilización o el tamponamiento de la preparación enzimática deseada. Los gránulos de no espolvoreo se pueden recubrir. Se pueden estabilizar las preparaciones enzimáticas líquidas añadiendo un poliol tal como propilenglicol, un azúcar o alcohol azucarado, ácido láctico o ácido bórico, de acuerdo con métodos establecidos. Los detergentes líquidos generalmente contienen hasta 90 % de agua y de 0 a

20 % de disolvente orgánico. Se pueden preparar formas protegidas de las enzimas de la invención según lo descrito en el documento EP 238.216.

5 Las preparaciones enzimáticas de la invención pueden contener un tensioactivo que puede ser aniónico, no iónico, catiónico, anfótero o una mezcla de dichos tipos, especialmente cuando se usan como una composición de detergente. En el documento WO 94/07998, y en la patente de EE.UU. N° 5.443.750 y la patente de EE.UU. N° 3.664.961, se describen composiciones de detergentes útiles.

Si es necesario, se puede purificar adicionalmente una enzima deseada de acuerdo con condiciones convencionales tales como extracción, precipitación, cromatografía, cromatografía por afinidad, electroforesis o similares.

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

15 El lavado a la piedra no enzimático tiene tres etapas: eliminación del apresto, abrasión y post-tratamiento. La primera etapa, la eliminación del apresto, implica la eliminación del recubrimiento de almidón, o de sus derivados, mediante amilasa. La segunda etapa, la abrasión, cuando se realiza sin celulasa, por lo general, se realiza mediante el lavado de la tela vaquera con piedras pómez y, cuando se desea un aclaramiento, el blanqueamiento. El efecto abrasivo no solo es el resultado del efecto de las piedras, sino también del roce de la tela vaquera. Por lo general, a la abrasión le sigue la tercera etapa, una etapa de lavado para eliminar el exceso de colorante, durante la cual se pueden añadir suavizantes o abrillantadores ópticos.

20 En el lavado a la piedra enzimático, o biolavado a la piedra, la abrasión con piedras pómez se omite completa o parcialmente, y se añade celulasa para facilitar la abrasión del colorante índigo de la superficie de la fibra. Tras dicho tratamiento, se retira la celulasa con un lavado con detergente para asegurarse de que no se compromete más la resistencia mecánica de la fibra por la presencia continuada de la enzima. El tratamiento con una o varias celulasas puede reemplazar por completo el tratamiento con piedras pómez (por ejemplo, 1 kg de enzima comercial frente a 100 kg de piedras). Sin embargo, cuando se desee, para producir un acabado muy desgastado, el tratamiento con celulasa se puede combinar con el tratamiento con piedras pómez. Mediante un lavado que combine una celulasa neutra con piedras pómez también se consigue un efecto de piel de melocotón en el que se crea un delicado recubrimiento piloso que sobresale. Las celulasas de la presente invención son especialmente útiles para reducir al mínimo la retrotinción y aumentar el aclaramiento (abrasión) en el biolavado a la piedra.

30 El biolavado a la piedra se realiza preferentemente a un pH de aproximadamente 4,5 a 9,5, y lo más preferentemente a pH de 6,0 a 8,5. La temperatura de la reacción puede variar de aproximadamente 40 a 80 °C, preferentemente de 50 a 70 °C, y lo más preferentemente de 50 a 60 °C. La proporción de licor (proporción del volumen de líquido por peso de tejido) puede variar de aproximadamente 2:1 a 20:1, preferentemente de 4:1 a 10:1, y lo más preferentemente de 4:1 a 7:1. La dosificación enzimática puede variar de aproximadamente 25 a 1.500 nkat/g de tejido, preferentemente de 50 a 500 nkat/g de tejido y lo más preferentemente de 75 a 300 nkat/g de tejido.

35 Las celulasas de la invención son útiles en la industria textil para el bioacabado de tejidos o prendas, por ejemplo, la eliminación de acumulación de fibra en la superficie del tejido, eliminación de pelusa, aclarado del color, reducción de la aspereza, la creación de diferentes acabados (por ejemplo, un efecto de "piel de melocotón", "desgastado", "lavado con arena" o "aspecto antiguo") y para el bioacabado del hilo, por ejemplo, la reducción de pilosidad y el aumento de la suavidad). Las celulasas de la presente invención se pueden usar en el bioacabado en condiciones ácidas y neutras.

40 Las celulasas de la presente invención son útiles en composiciones de detergentes para mejorar el efecto de limpieza textil, por ejemplo, la eliminación de suciedad, y para mejorar las propiedades del cuidado del tejido mediante la reducción de la aspereza de los productos textiles, son útiles las celulasas que también tienen efectos de eliminación de la pelusa y aclarado del color, y efectos de restauración.

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

50 Las celulasas de la invención, además de ser especialmente útiles para el tratamiento de tejidos, son útiles, en general, en cualquier sector que requiera la actividad celulasa. En la industria de la pulpa y del papel, se pueden usar celulasas neutras, por ejemplo, en el destintado de diferentes papeles y cartones reciclados que tengan pH neutro o alcalino, en la mejora de la calidad de la fibra o el aumento del drenaje en la fabricación del papel. Otros ejemplos incluyen la eliminación del espesante de la pasta de impresión y el exceso de colorante tras la impresión textil, y como un tratamiento para piensos animales. Por ejemplo, si la aplicación deseada es mejorar la resistencia mecánica de la pulpa, entonces las preparaciones de celulasa 50 K o celulasa 20 K de la invención pueden

proporcionar una o más de dichas proteínas para potenciar o facilitar la capacidad de las fibras de celulosa para unirse entre sí. De igual manera, en la aplicación del refinado de pulpa, las preparaciones de celulasa 50 K o celulasa 20 K de la invención pueden proporcionar una o más de dichas proteínas a un nivel que potencie o facilite dicha dilatación.

- 5 La invención se describe más detalladamente en los siguientes ejemplos. Dichos ejemplos solo muestran unas cuantas aplicaciones concretas de la invención. Es evidente para un experto en la materia la creación de varias aplicaciones similares. Por lo tanto, los ejemplos no se deben interpretar para limitar el alcance de la invención, sino solo para aclarar el uso de la misma.

Ejemplos

10 *Ejemplo 1*

Cultivos en matraz agitador y fermentador

- 15 Para el mantenimiento, se sembraron las cepas ALKO4179, ALKO4124, ALKO4237, ALKO4265 y ALKO4125 en agar de esporulación (medio 5 de la ATCC, colección americana de cultivos tipo, catálogo de hongos filamentosos, XVIII Edición, eds., S. C. Jong y M. J. Edwards, (1991): 1 litro contiene 1 g de extracto de levadura, 1 g de extracto de carne de vacuno, 2 g de triptosa, una cantidad traza de FeSO_4 , 10 g de glucosa y 15 g de agar; el pH fue de 7,2. Se incubaron los medios inclinados de agar a 45 °C durante 3-6 días.

- 20 Para los ensayos de las aplicaciones de ALKO4237 (Ejemplos 3 y 4), se inoculó una colonia en 500 ml del siguiente medio mineral (Moloney, A. P. *et al.*, *Biotechnol. Bioeng.* 25: 1169 (1983)): 1 litro contiene 15 g de KH_2PO_4 , 15 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2,4 ml de $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 1 M, 5,4 ml de CaCl_2 1 M, 20 g de Solka-Floc, 15 g de maíz en polvo macerado, 1 g de extracto de levadura y 10 ml de 100 x solución de oligoelementos 1, donde 1 litro de 100 x solución de oligoelementos 1 contiene 0,5 g de $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0,156 g de $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, 0,14 g de $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ y 0,49 g de $\text{CoSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$; el pH se ajustó a pH 6,5. El cultivo se realizó a 45 °C durante 3 días en un agitador rotatorio (250 rpm). Se obtuvo actividad endoglucanasa de aproximadamente 20-25 nkat/ml.

- 25 Se midió la actividad de celulasa de la manera habitual como la actividad de endoglucanasa de acuerdo con Bailey, M. J. *et al.*, *Enzyme Microb. Technol.* 3: 153 (1981)), usando hidroxietilcelulosa al 1 % (p/v), HEC (Fluka AG N° 54290) como sustrato. Las condiciones de ensayo fueron, a menos que se indiquen otras, pH 7,0 y 50 °C con un tiempo de reacción de 10 minutos. Una unidad de endoglucanasa (1 nkat = 1 ECU) se define como la cantidad de enzima que produce la reducción de los hidratos de carbono que tienen un poder reductor correspondiente a un nanomol de glucosa en un segundo a partir de HEC en las condiciones de ensayo. Sin embargo, con las enzimas purificadas descritas en los Ejemplos 9-12, las condiciones de ensayo de Bailey *et al.*, *Enzyme Microb. Technol.* 3: 153 (1981) superan el intervalo lineal y, por lo tanto, el ensayo se modificó como se describe en el Ejemplo 10. Con cada cepa, el ensayo de actividad con papel de filtro (que mide la hidrólisis total de la celulosa e indica la presencia de actividad de celobiohidrolasa) fue bien inferior al límite de detección fiable o muy baja.

- 35 Para determinar la dependencia en el pH y en la temperatura (Ejemplo 2), así como para los ensayos de aplicación de las cepas ALKO4179, ALKO4124, ALKO4265 y ALKO4125 (Ejemplos 3 y 4), se inocularon las colonias en 500 ml del termomedio B modificado (G. Szakacs, Universidad Técnica de Budapest, Hungría): 1 litro contenía 6 g de Solka-Floc, 6 g de granos de trigo usados de destilador, 3 g de xilano de cáscara de avena, 2 g de CaCO_3 , 1,5 g de harina de soja, 1,5 g de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 1 g de salvado de cebada, 0,5 g de KH_2PO_4 , 0,5 g de $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g de NaCl, 0,5 ml de solución de oligoelementos 1 (1 litro contiene: 1,6 g de MnSO_2 , 3,45 g de $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ y 2,0 g de $\text{CoCl}_4 \times 6\text{H}_2\text{O}$) y 0,5 ml de solución de oligoelementos 2 (1 litro contiene: 5,0 g de $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ y dos gotas de H_2SO_4 concentrado); el pH se ajustó a pH 6,5. Los cultivos se realizaron a 45 °C durante 3 días en un agitador rotatorio (250 rpm). Dado que en el termomedio B, las actividades de endoglucanasa de las cepas ALKO4179, ALKO4124 y ALKO4237 fueron de aproximadamente 5 nkat/ml, se concentraron los filtrados de cultivo aproximadamente 10 veces en un concentrador Amicon usando un punto de corte de 30 kDa. La actividad de endoglucanasa obtenida con ALKO4265 fue de aproximadamente 20 nkat/ml y, con ALKO4125, de 30-40 nkat/ml.

El cultivo de fermentador de 1 litro de ALKO4179 se realizó en el siguiente medio: 1 litro contenía 10 g de Solka-Floc, 3 g de celobiosa, 4 g de polvo de maíz en polvo macerado, 1,5 g de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 0,3 g de $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g de NaCl, 2 g de CaCO_3 , 0,5 ml de solución de oligoelementos 1 y 0,5 ml de solución de oligoelementos 2, 0,5 g de KNO_3 , 0,3 g de CaCl_2 , 1 g de Tween 80; el pH se ajustó a pH 6,5.

- 50 El cultivo de fermentador de 1 litro de ALKO4124 se realizó en el termomedio B modificado: 1 litro contenía: 10 g de Solka-Floc, 1 g de xilano de Roth, 40 g de suero de leche, 30 g de harina de soja, 2 g de CaCO_3 , 5 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,5 g de KH_2PO_4 , 1,0 g de $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 1,0 g de NaCl, 1 g de antiespumante, 0,5 ml de solución de oligoelementos 1 y 0,5 ml de solución de oligoelementos 2.

- 55 El cultivo de fermentador de 1 litro de ALKO4237 se realizó en el medio mineral mencionado anteriormente. Se usó inóculo al 10 % (v/v). Se mantuvo el pH a $\text{pH } 6,5 \pm 0,4$ mediante la adición de amoníaco [12,5 % (v/v)] y ácido fosfórico [17 % (v/v)]. La temperatura de fermentación fue de 45 °C. Se agitó el fermentador (Biostat M, B. Braun, Melsungen, Alemania) a 400 rpm y el flujo de aire como 1 vvm. Las actividades de endoglucanasa obtenidas fueron

las siguientes: ALKO4179 de aproximadamente 40 nkat/ml, ALKO4124 de aproximadamente 90 nkat/ml y ALKO4237 de aproximadamente 30 nkat/ml. ALKO4265 y ALKO4125 no se cultivaron en un fermentador.

5 Se cultivaron ALKO4179, ALKO4124, ALKO4237 y ALKO4125 en un fermentador piloto de 100 litros en los medios y las condiciones que se han descrito anteriormente. Las actividades de endoglucanasa obtenidas fueron de aproximadamente 40 nkat/ml con ALKO4179 y ALKO4237, de aproximadamente 90 nkat/ml con ALKO4124 y de aproximadamente 100 nkat/ml con ALKO4125. Se concentraron los filtrados de cultivo 10-20 veces en un filtro ultrafino Millipore PUF100 y un concentrador de casete Pellicon Us usando un punto de corte de 10 kDa.

Ejemplo 2

Determinación de la dependencia en el pH y la temperatura de las actividades de endoglucanasa en los filtrados de cultivo

10 Para determinar la dependencia en el pH y en la temperatura, se cultivaron las cepas ALKO4179, ALKO4124, ALKO4237, ALKO4265 y ALKO4125 en el termomedio B modificado. Se diluyeron muestras de los cultivos en matraz agitador (filtrados de cultivo) en tampones de Mcllvain 50 mM (ácido cítrico 50 mM, Na₂HPO₄ 100 mM) del intervalo de pH 4,5 a 8,5. Los valores finales de pH de las mezclas tampón de filtrados de cultivo fueron de 4,3; 5,4; 6,3; 7,3; 8,1 y 8,7 para la cepa ALKO4179; 4,3; 5,4; 6,4; 7,3; 8,1 y 8,5 para la cepa ALKO4124; 4,4; 5,3; 6,2; 7,1; 8,0 y 8,5 para la cepa ALKO4237; 4,3, 5,4, 6,3, 7,2, 8,1 y 8,5 para la cepa ALKO4265 y 4,3, 5,4, 6,4, 7,3, 8,1 y 8,5 para la cepa ALKO4125. Se añadió BSA como una proteína vehículo a la concentración de 100 µg/ml. Se añadieron pepstatina A y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) como inhibidores de proteasa a 10 µg/ml y 174 µg/ml respectivamente. Se midió la actividad de endoglucanasa a cada pH a 50 °C con el tiempo de reacción de 60 minutos. La actividad de endoglucanasa de ALKO4179 presentó más de 90 % de su máximo en el intervalo de pH de aproximadamente 4,5 a 7,5, detectándose la actividad máxima en el intervalo de pH de aproximadamente 5,4 a 6,3 (Figura 1A). La actividad de endoglucanasa de ALKO4124 presentó más de 80 % de su actividad máxima en el intervalo de pH de aproximadamente 5,5 a 7,5, detectándose la actividad máxima a aproximadamente pH 6,4 (Figura 2A). La actividad de endoglucanasa de ALKO4265 presentó más de 80 % de su actividad máxima en el intervalo de pH de aproximadamente 4,5 a 7,0, detectándose la actividad máxima en el intervalo de pH de aproximadamente 5,5 a 6,5 (Figura 4A). La actividad de endoglucanasa de ALKO4237 presentó más de 80 % de su máximo en el intervalo de pH de aproximadamente 4,5 a 6,0, detectándose la actividad máxima a aproximadamente pH 5,3 (Figura 3A). La actividad de endoglucanasa de ALKO4125 presentó aproximadamente 90 % de su máximo en el intervalo de pH de aproximadamente 4,5 a 7,5, detectándose la actividad máxima a aproximadamente pH 6,5 (Figura 5A).

35 Para determinar la dependencia en la temperatura de la actividad de endoglucanasa, se diluyeron las muestras de los filtrados de cultivo en tampón de Mcllvain 50 mM, pH 7,0. Se añadió BSA como una proteína vehículo a la concentración de 100 µg/ml. Se añadieron pepstatina A y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) como inhibidores de proteasa a 10 µg/ml y 174 µg/ml respectivamente. Los valores finales de pH de las mezclas tampón de filtrados de cultivo fueron de 7,3 (ALKO4179, ALKO4124 y ALKO4125) y de 7,2 (ALKO4237 y ALKO4265). Las muestras se incubaron a 40 °C, 50 °C y 60 °C durante 60 minutos. La máxima actividad de endoglucanasa de ALKO4179 se detectó a 50 °C y 60 °C, conservándose aproximadamente 30 % de la actividad a 40 °C (Figura 1B). La máxima actividad de endoglucanasa de ALKO4124 se detectó a 60 °C, conservándose aproximadamente 70 % de la actividad a 50 °C y 30 % a 40 °C (Figura 2B). La máxima actividad de endoglucanasa de ALKO4237 se detectó a 60 °C, conservándose aproximadamente 60 % de la actividad a 50 °C y 40 % a 40 °C (Figura 3B). La máxima actividad de endoglucanasa de ALKO4265 se detectó a 60 °C, conservándose aproximadamente el 50 % de la actividad a 50 °C y 30 % a 40 °C (Figura 4B). La máxima actividad de endoglucanasa de ALKO4125 se detectó a 60 °C, conservándose aproximadamente 80 % de la actividad a 50 °C y 70 % a 40 °C (Figura 5B).

Ejemplo 3

Liberación de colorante índigo en condiciones neutras

45 Se ensayaron preparaciones de celulasa derivadas de las cepas ALKO4179, ALKO4124, ALKO4237, ALKO4265 y ALKO4125 (Ejemplos 1 y 2) en cuanto a su capacidad para liberar colorante en condiciones neutras desde tejido de tela vaquera que contenía algodón teñido con índigo para dar un aspecto de lavado a la piedra. Se usó el producto comercial de celulasa ácida Ecostone L (Primalco Ltd, Biotec, Finlandia) como control.

50 El tejido de tela vaquera se adquirió en Lauffenmuehl (Alemania). Se lavó previamente el tejido de ensayo durante 10 min a 60 °C con Ecostone A 200 (1 ml/litro, Primalco Ltd, Biotec, Finlandia). A continuación, se cortó el tejido en muestras de 12 x 12 cm. Se midió el color de ambos lados de las muestras de tejido como los valores de reflectancia con el sistema cromámetro CM 1000R L*a*b* de Minolta (Osaka, Japón).

55 Se realizaron los tratamientos de celulasa se realizaron en Launder-Ometer LP-2 (Atlas, Illinois, EE.UU.) de la siguiente manera. Se cargaron aproximadamente 7 g de muestras de tela vaquera en el recipiente de 1,2 litros que contenía 200 ml de tampón de citrato/fosfato 0,05 M a pH 7 o tampón de citrato 0,05 M a pH 5,2. Se añadieron 0,06 ml de Berol 08 al 10 % (Berol Nobel AS, Suecia) como agente tensioactivo.

Se añadió una cantidad de bolas de acero a cada recipiente para ayudar a la eliminación de las fibras. Finalmente, se añadieron las soluciones de celulasa al recipiente como unidades de actividad de endoglucanasa (Ejemplo 1). A continuación, se cerraron los recipientes y se cargaron en un baño Lave-Ometer a 50 °C. El Launder-Ometer se hizo funcionar a 42 rpm durante 2 horas.

- 5 Tras extraer las muestras de los recipientes, se pusieron a remojo durante 10 minutos en 200 ml de NaOH 0,01 y se aclararon durante 10 minutos con agua fría. A continuación, se secaron las muestras durante 1 hora a 105 °C. y se secaron al aire durante una noche. Se midió el color de ambos lados de las muestras con el cromómetro Minolta. En la Tabla I, se muestran los resultados de las mediciones del color de los tejidos de tela vaquera tratados.

Tabla I. Medición del color de tejidos de tela vaquera tratados con diferentes preparaciones de celulasa

Fuente enzimática	ECU/g de tejido	Lado del derecho del tejido			Lado del revés del tejido		
		L	b	ΔE	L	b	ΔE
pH 7*							
--	--	2,3	0,8	3,1	1,5	0,1	0,9
ALKO4237	200	6,4	3,3	7,6	2,4	1,7	3,2
	400	7,7	3,8	8,1	2,5	1,8	3,0
ALKO4179	200	5,5	2,4	6,4	2,8	1,9	3,0
	400	4,6	2,8	5,1	2,2	1,5	3,0
ALKO4124	200	4,8	2,8	6,1	3,3	1,2	2,5
	400	NR	NR	NR	NR	NR	NR
ALKO4125	200	4,0	2,7	5,6	2,3	1,5	2,3
	400	NR	NR	NR	NR	NR	NR
ALKO4265	200	2,2	3,6	5,1	-4,9	6,6	9,2
	400	NR	NR	NR	NR	NR	NR
Ecostone L	200	1,6	0,7	1,6	0	1,7	1,6
	400	1,6	0,9	1,8	- 1,9	22	2,8
pH 5,2**							
Ecostone L	200	2,01	2,33	3,30	-2,74	4,35	4,71
	400	3,19	2,76	4,35	-2,56	4,83	6,71
L: Unidad de claridad del tejido tras el tratamiento menos unidad de claridad del tejido antes del tratamiento. b: Unidad de coloración azul del tejido tras el tratamiento menos unidad de coloración azul del tejido antes del tratamiento. ΔE: Diferencia de color en el espacio de color L*a*b* entre el color de la muestra y el color diana (tejido diana = tejido de tela vaquera sin tratar). NR = no realizado. * La actividad de ECU se midió a pH 7,0. ** La actividad de ECU se midió a pH 4,8.							

- 10 Para comparar el aspecto final de los tejidos de tela vaquera tras lavar con diferentes preparaciones de celulasa, se midió el color de ambos lados (lado del revés y lado del derecho) de los tejidos. De los resultados mostrados en la Tabla I, se desprende que las unidades de claridad y coloración azul están claramente aumentadas en el lado del derecho de las prendas lavadas con las preparaciones de celulasas ALKO4179, ALKO4124, ALKO4237 y ALKO4125, mostrando un buen efecto de lavado a la piedra. La unidad de coloración azul también se aumentó en el

lado del derecho del tejido lavado con la preparación ALKO4265, pero no hubo aumento en la unidad de claridad. Esto se debe probablemente a que la enzima funciona a este pH, pero al mismo tiempo provoca una gran cantidad de retrotinción. No hubo efecto de lavado a la piedra en el tejido con el producto ácido comercial Ecostone L a pH 7 a dicha actividad de ECU.

- 5 En dicho estudio, la retrotinción sobre el lado del revés del tejido se usa como una indicación del grado de retrotinción en el lado del derecho del tejido. Para cuantificar el nivel de retrotinción, se midió el color en el lado del revés del tejido antes y después del tratamiento con celulasa. Como se muestra en la Tabla I, cuando las cantidades de ECU son iguales, prácticamente no se produjo retrotinción en los tejidos tratados con las preparaciones ALKO4179, ALKO4124, ALKO4237 y ALKO4125 en comparación con los tejidos tratados con las preparaciones ALKO4265 o Ecostone L (pH 5,2 y 7).

Ejemplo 4

Liberación de colorante en condiciones neutras, sin Berol

El diseño experimental fue como se ha descrito en el Ejemplo 3, excepto que no se usó Berol. Los resultados de las mediciones del color de los tejidos de tela vaquera tratados se muestran en la Tabla II.

- 15 **Tabla II. Medición del color de tejidos de tela vaquera tratados con diferentes preparaciones de celulasa, sin Berol.**

Fuente enzimática	ECU/g de tejido	Lado del derecho del tejido			Lado del revés del tejido		
		L	b	ΔE	L	b	ΔE
pH 7*							
--	—	2,1	0,5	2,2	1,7	- 1,1	2,0
ALKO4237	200	5,5	3,1	7,0	1,8	2,3	3,5
ALKO4179	200	4,4	3,2	5,6	1,4	2,2	2,7
ALKO4124	200	4,2	2,9	5,0	1,1	2,0	2,4
ALKO4125	200	3,5	2,6	4,4	1,6	1,4	2,5
ALKO4265	200	3,3	3,3	5,3	-5,7	6,6	10,0
Ecostone L	200	1,4	0,9	1,7	0,3	1,4	1,8
	400	1,4	0,8	1,7	-0,1	1,7	1,8
pH 5,2**							
Ecostone L	200	2,0	2,1	2,9	-4,0	4,8	5,4

L: Unidad de claridad del tejido tras el tratamiento menos unidad de claridad del tejido antes del tratamiento.
 b: Unidad de coloración azul del tejido tras el tratamiento menos unidad de coloración azul del tejido antes del tratamiento.
 ΔE: Diferencia de color en el espacio de color L*a*b* entre el color de la muestra y el color diana (tejido diana = tejido de tela vaquera sin tratar).
 NR = no realizado.
 * La actividad de ECU se midió a pH 7,0.
 ** La actividad de ECU se midió a pH 4,8.

Cuando se comparan con los resultados obtenidos con la inclusión de Berol (Ejemplo 3), los datos de la Tabla II muestran que se puede lograr casi el mismo efecto de lavado a la piedra con las preparaciones de celulasa ALKO4179, ALKO4124, ALKO4237 y ALKO4125 en ausencia del agente adyuvante Berol.

20 **Ejemplo 5**

Retrotinción en el lavado de tela vaquera con diferentes celulasas

En la literatura, se informa de que la retrotinción depende del pH y/o del tipo de enzima. Sin embargo, como se muestra en el presente documento, se encontró que la retrotinción depende solo indirectamente del pH (Figuras 6A y 6B, y 7A y 7B).

5 Se estudiaron dos preparaciones de celulasa neutra de ALKO4237 y de ALKO4265, y el producto de celulasa ácida Ecostone L en el lavado de tela vaquera a pequeña escala con una dosis igual de enzima a pH 5 y pH 7. Se determinó el efecto del lavado a la piedra midiendo el aumento de claridad y de coloración azul como unidades de reflectancia en el lado del derecho del tejido, y se determinó la retrotinción (redepositación de índigo sobre la superficie de las fibras) como el aumento de la coloración azul y la disminución de la claridad por el lado del revés. A pH 7, las celulasas neutras de ALKO4237 provocaron un aumento evidente en la claridad y la coloración azul por el lado del derecho, sin que se observara retrotinción (Figura 6A y 6B). Se encontró un efecto de lavado a la piedra similar a pH 5, pero con una ligera retrotinción. A pH 7, la otra celulasa neutra, ALKO4265, iluminó la coloración azul por el lado del derecho, pero produjo una retrotinción intensa por el lado del revés. A pH 5, se obtuvieron efectos similares con ambas preparaciones de ALKO4265 y ALKO4237. A pH 7, la celulasa ácida no produjo retrotinción ni confirió claridad por el lado del derecho (al usar dosis de actividad de endoglucanasa similares como con ALKO4265 y ALKO4237, Figura 7A y 7B, 1 x dosis), probablemente debido a que no funcionaba a dicho pH. Por otra parte, a pH 15 5, se aumentaron la claridad y la coloración azul por el lado del derecho, y la retrotinción fue claramente perceptible por el lado del revés. Basándose en estos resultados, la retrotinción se puede producir a ambos valores de pH en función de la preparación de celulasa usada.

Ejemplo 6

20 **Uso de las preparaciones enzimáticas que contienen celulasas neutras en el bioacabado de producto textil tejido que contiene algodón**

Se sometió producto textil tejido de algodón al 100 % a tratamiento con las celulasas ALKO4237 (Ejemplo 1) y ALKO4467 en un equipo Launder-Ometer. ALKO4467 es una mutante bajo UV con una mayor actividad de celulasa derivada de ALKO4125.

25 Se trató previamente el producto textil tejido de algodón al 100 % (adquirido en Pirkanmaan Uusi Värjäamo Ltd) como en el Ejemplo 7. Las condiciones de tratamiento de celulasa fueron como se describe en el Ejemplo 3, excepto que no se usó Berol y la proporción de líquido fue de 1:15 (volumen de líquido por peso de tejido). Las celulasas se administraron como unidades de actividad de ECU (Ejemplo 1).

30 Se usaron los siguientes métodos para la evaluación del efecto de las preparaciones enzimáticas en el bioacabado del tejido de algodón: la pérdida de peso de los tejidos tratados se definió como el porcentaje de peso del tejido antes y después del ensayo (antes de pesar los tejidos, se acondicionaron en una atmósfera de 21 + 2 °C. y HR del 50 + 5 %). Un grupo compuesto por tres personas realizó la evaluación del efecto de limpieza de la superficie de los tejidos tratados con enzimas. Los tejidos se clasificaron sobre una puntuación de 1 a 5, donde 5 correspondía a una superficie limpia. Se usó el método de frotamiento de Martindale (SFS-4328) para la evaluación de la acumulación de fibra en la superficie del tejido. La acumulación de fibra en la superficie del tejido fue evaluada por un panel tras 35 200 y 2.000 ciclos de abrasión (1 = mucha fibra, 5 = nada de fibra).

En la Tabla III, se muestra que el tratamiento del tejido de algodón con las preparaciones de celulasa ALKO4237 y ALKO4467 generó una buena limpieza de la superficie y la reducción notable de la tendencia a la formación de fibra en la superficie del tejido tanto a pH 5 como a pH 7.

40 **Tabla III. Pérdida de peso, efecto de limpieza de la superficie y tendencia a la formación de fibra en la superficie de los tejidos de algodón tratados con celulasas neutras en un Launder-Ometer**

Preparación	Dosis ECU/g	Tiempo h	pH	Pérdida de peso %	Efecto de limpieza de la superficie	Formación de fibra en superficie	
						200 ciclos	2000 ciclos
-	-	1	5	0	1,0	1,0	1,0
ALKO4237	200	1	5	2,3	3,5	4,0	3,8
ALKO4237	400	1	5	3,2	3,5	4,0	3,8
ALKO4467	200	1	5	1,2	2,5	3,7	3,4
ALKO4467	400	1	5	1,9	2,8	3,7	3,4
-	-	2	5	0,1	1,0	1,0	1,0
ALKO4237	200	2	5	4,4	4,0	4,2	4,1
ALKO4237	400	2	5	6,0	4,3	4,2	4,3
ALKO4467	200	2	5	3,0	3,5	4,0	3,8

Preparación	Dosis ECU/g	Tiempo h	pH	Pérdida de peso %	Efecto de limpieza de la superficie	Formación de fibra en superficie	
						200 ciclos	2000 ciclos
ALKO4467	400	2	5	4,0	3,8	4,0	3,9
-	-	1	7	0	1,0	1,0	1,0
ALKO4237	200	1	7	2,5	3,0	3,7	3,5
ALKO4237	400	1	7	3,8	4,0	4,0	3,9
ALKO4467	200	1	7	0,8	2,0	3,5	3,3
ALKO4467	400	1	7	1,4	2,0	3,6	3,7
-	-	2	7	0,1	1,0	1,2	1,1
ALKO4237	200	2	7	4,8	4,0	3,8	4,0
ALKO4237	400	2	7	6,0	4,3	4,0	4,3
ALKO4467	200	2	7	2,2	2,5	4,0	3,4
ALKO4467	400	2	7	3,0	3,3	3,8	3,7

Ejemplo 7

Uso de las preparaciones enzimáticas que contienen celulasas neutras de la invención en el bioacabado

7a. Uso de preparaciones enzimáticas en el bioacabado de productos textiles tejidos y de punto

5 Se somete producto textil tejido de algodón al 100 % o producto textil de punto de algodón al 100 % a tratamiento con las celulasas de la invención (Ejemplo 1) en una lavadora de tambor semi-industrial (Esteri 20 HS-P). Las condiciones de tratamiento son las siguientes:

A. Pretratamiento (solo para productos textiles tejidos)

60 °C, 10 minutos, Ecstone A200 (Primalco Ltd, Biotec, Finlandia) 1 ml/l de agua.

B. Tratamiento enzimático

10 Temperatura: 50-60 °C, pH 7;

proporción de líquido: 5-20:1 (volumen de líquido por peso de tejido);

tiempo de tratamiento: 20-90 minutos, preferentemente 30-60 minutos; y

dosis de enzimas: 50-900 nkat/g de producto textil tejido o de punto, preferentemente 200-600 nkat/g de producto textil tejido o de punto.

15 C. Tratamiento "tras el lavado"

40 °C, 10 minutos, detergente alcalino.

D. tratamiento de secado

20 Se usan los siguientes métodos convencionales para la evaluación del efecto de limpieza de la superficie de las preparaciones enzimáticas: método de frotamiento de Martindale (SFS-4328) y ensayo de durabilidad ante el lavado (SFS-3378). El tratamiento con las preparaciones de celulasas de la invención produjo un efecto de limpieza de la superficie, una mejora de la blandura y la suavidad del producto textil tejido y de punto, y una reducción de la tendencia a la acumulación de fibra en la superficie.

7b. Uso de preparaciones enzimáticas en el acabado de productos textiles tejidos y de punto Lyocell

25 Las preparaciones de celulasas de la invención se pueden usar en el control de la fibrilación y los diferentes procesos de acabado de productos textiles tejidos y de punto de Lyocell al 100 %, y mezclas de los mismos. Se usan las siguientes condiciones de tratamiento en lavadora de tambor semi-industrial (Esteri 20 HS-P) para crear el efecto de piel de melocotón en el tejido Lyocell:

A. Carbonato de sodio: 2,5 g/l; 60 °C, tiempo de tratamiento de 60 minutos;

B. Aclarado;

30 C. Tratamiento enzimático: temperatura de 50-60 °C, pH 7, proporción de líquido 5-20:1, tiempo de tratamiento: 40-

120 minutos, preferentemente 45-90 minutos y una dosis de enzima de 100-1.500 nkat/g de tejido, preferentemente 400-800 nkat/g de tejido;

D. Tratamiento posterior: lavado con detergente alcalino a 40 °C durante 10 minutos;

E. Aclarado; y

5 F. secado.

El resultado es un efecto de piel de melocotón.

Ejemplo 8

Uso de preparaciones enzimáticas en el biolavado a la piedra

10 Se sometieron prendas de tela vaquera a tratamiento con las preparaciones de celulasas neutras (Ejemplo 1) en una lavadora de tambor semi-industrial (Esteri 20 HS-P) para dar a las prendas un aspecto de lavado a la piedra. Se usó aproximadamente 1,0 kg de prendas de tela vaquera (contenían dos tipos diferentes de tejido) por carga de la máquina.

Las condiciones de tratamiento fueron las siguientes.

15 A. **Eliminación del apresto.** 100 litros de agua, 60 °C, 10 minutos; 100 ml de Ecostone A200 (Primalco Ltd, Biotec, Finlandia).

B. **Tratamiento con celulasas.** 100 litros de agua, 50 °C, 45 minutos; 10 g de Berol 08 (Berol Nobel AS, Suecia); 30 g de ácido cítrico + 128 g de Na₂HPO₄ x 2H₂O para dar pH 7.

Las preparaciones de celulasas neutras se administraron como unidades de actividad de endoglucanasa (ECU, Ejemplo 1):

20 1. ALKO4237, 260 ECU/g de prenda

2. ALKO4179, 260 ECU/g de prenda

3. ALKO4124, 300 ECU/g de prenda

4. ALKO4125, 250 ECU/g de prenda

C. **Tras el lavado.** Lavado con detergente alcalino, 40 °C, 10 minutos.

25 D. **Secado.**

Se evaluaron los resultados por el aspecto visual de las prendas y midiendo el color como los valores de reflectancia con el sistema cromámetro CM 1000R L*a*b de Minolta (Tabla IV). Se obtuvo un buen efecto de lavado a la piedra con todas estas prendas tratadas con celulasas. No se pudo observar retrofinción (examinada en el interior de la prenda) a simple vista en ninguna de dichas prendas tratadas con celulasas.

30 De los resultados de las mediciones del color mostrados en la Tabla IV, se puede observar que las unidades de claridad y coloración azul aumentaron visiblemente en el exterior de las prendas lavadas con las preparaciones de celulasas neutras, mostrando un buen efecto de lavado a la piedra.

Tabla IV. Medición del color de prendas de tela vaquera con diferentes preparaciones de celulasas

Fuente enzimática	Exterior de la prenda		Interior de la prenda	
	L	b	L	b
A. Tejido 1				
Sin tratar	24,1	-8,5	57,1	0,17
Lavada sin celulasa	21,4	-14,0	54,5	-4,3
ALKO4237	26,7	-17,3	56,5	-4,9
ALKOW179	26,8	-17,0	56,3	-4,5

Fuente enzimática	Exterior de la prenda		Interior de la prenda	
	L	b	L	b
ALKO4125	28,0	-17,4	57,8	-4,1
ALKO4124	26,4	-17,5	57,1	-4,8
B. Tejido 2				
Sin tratar	22,5	-8,3	57,6	0,66
ALKO4237	25,0	-16,3	56,1	-4,3
ALKO4179	25,0	-15,8	55,4	-4,4
ALKO4125	26,7	-17,0	56,8	-4,0
ALKO4124	25,6	-17,0	56,4	-4,0

L = unidad de claridad de la prenda después del tratamiento (cuanto mayor es el valor, más clara es la prenda).

b = unidad de coloración azul de la prenda después del tratamiento (cuanto más negativo es el valor, más azulada es la prenda).

Ejemplo 9

5 Purificación de celulasas neutras

Se dividió medio de crecimiento concentrado de ALKO4237 a 7 °C en DEAE Sepharose CL6B con un gradiente lineal de NaCl 0,0 a 0,5 M en Tris/HCl 25 mM, pH 7,2. Se encontraron cuatro picos de actividad de endoglucanasa a pH 4,8. El Pico I, que contenía aproximadamente 10 % de la ECU recuperada, eluyó a aproximadamente NaCl 150 mM; el Pico II (aproximadamente 30 % de ECU) a NaCl 230 mM; el Pico III (aproximadamente 20 % de ECU) a NaCl 270 mM; y el Pico IV (aproximadamente 40 % de ECU) a NaCl 320 mM. La Tabla V muestra los resultados cuando se ensayaron dichos picos para determinar su utilidad en el biolavado a la piedra a pH neutro y 50 °C.

Dichos resultados muestran que tanto en base a las ECU como a la proteína total, el Pico II fue más eficaz que cualquier otro pico o que el concentrado sin dividir. También se ensayó una mezcla de los Picos I y II que contenía 70 ECU de cada/g de tela vaquera. Esto dio lugar a un valor de L (lado del derecho) de 7,3 y de b (lado del revés) de 2,5. Por lo tanto, dicha mezcla fue más eficaz que cualquier pico solo.

Se aumentó a escala el procedimiento de purificación hasta obtener muestras homogéneas de algunas de las proteínas deseadas en dichos picos. Se dividió el medio de crecimiento concentrado de ALKO4237 (4,5 litros) con sulfato de amonio. Se suspendieron las proteínas que precipitaron entre 17 g y 42 g de sulfato de amonio por cada 100 ml de concentrado en 0,9 litros de Tris/HCl 25 mM, pH 7,2 que contenía EDTA 0,25 mM y luego se diluyeron con agua a una conductividad de 4 mS/cm y se ajustaron con NaOH 1 M a pH 8,0. Se bombeó la solución resultante (aproximadamente 45 litros) a 150 ml/min a través de una columna de 6,3 litros de DEAE-Sepharose FFTM a temperatura ambiente. La actividad de endoglucanasa del Pico I no se unió en estas condiciones. Las proteínas unidas eluyeron a 110 ml/min con un gradiente lineal de NaCl 0,0 a 0,5 M en 20 litros de Tris/HCl 25 mM, pH 7,7 que contenía EDTA 0,25 mM. La endoglucanasa del Pico II eluyó a aproximadamente 14 mS/cm. En lugar de los Picos III y IV separados vistos con las separaciones a pequeña escala en DEAE en la sala fría, un solo pico, denominado Pico III/IV, eluyó a aproximadamente 25 mS/cm.

Tabla V. Liberación de colorante indigo por mezclas de DEAE-Sepharose™ en condiciones neutras

		ADICIÓN										
ECU/g	mg/g	Nada	Concentrado		Pico I		Pico II		Pico III		Pico IV	
			100	200	310	185	340	97	260	95	190	
	0	0	10	20	41	9	26	24	46	5	10	
L (lado del derecho)	2,9	5,2	7,0	5,5	7,3	10,3	4,4	5,8	3,9	4,3		
b (lado del revés)	0,4	2,6	3,5	2,9	2,5	0,9	1,4	0,1	0,5			

El parámetro L (lado del derecho) indica el aclarado del lado del derecho de la tela vaquera azul, y b (lado del revés) indica la coloración azul del lado del revés (es decir, la retrofinción). Se lavó el tejido en el equipo Launder-Ometer LP-2 y luego se midió con el cromómetro de Minolta, como se describe en el Ejemplo 3, excepto que no se usó Berol y el tampón que se usó fue tampón de McIlvaine 0,05 M a pH 7 (véase "Data for Biochemical Research", Dawson, R., et al., eds., 1969, Oxford Univ. Press). La dosis se muestra tanto en ECU/g de tela vaquera como en mg de proteína/g de tela vaquera.

Se hicieron precipitar las proteínas del Pico II (3,5 litros) con sulfato de amonio (450 g/litro) y se suspendieron en 170 ml de PIPES 25 mM/KOH, pH 6,0, que contenía EDTA 1 mM. Se transfirieron partes de dicho material a acetato de sodio 25 mM, pH 4,0, que contenía EDTA 1 mM mediante filtración en gel sobre una columna de Sephadex™ de 5 x 29 cm, G25 (grueso) y luego se fraccionaron sobre SP-Sepharose™. La Figura 8 muestra el resultado que se obtuvo cuando se aplicaron 11,7 g de estas proteínas a una columna de 4,5 x 31 cm de SP-Sepharose™ en acetato de sodio 25 mM, pH 4,0, que contenía EDTA 1 mM a 150 ml/h, y se desarrolló la columna a 75 ml/h con un gradiente lineal de NaCl 0,0 a 0,4 M en 3,4 litros del mismo tampón. La mayor parte de la endoglucanasa eluyó a NaCl 0,2 M. Se usó el ensayo modificado descrito en el Ejemplo 10. Cuando se almacenaron las fracciones activas a 7 °C, apareció un precipitado cristalino en las mismas, que contenía casi toda la actividad de endoglucanasa. Se indujo la formación de cristales en las fracciones activas (15 ml), en las que la cristalización era lenta, mediante la siembra con 30 µl de suspensión de fracciones que ya contenían cristales. Tras 2 a 3 días, se recogieron los cristales por centrifugación, se lavaron con PIPES 25 mM/KOH, pH 6,0, que contenía EDTA 1 mM y se disolvieron en Tris/HCl 25 mM, pH 7,2, que contenía EDTA 0,25 mM. El análisis por SDS-PAGE mostró que los cristales lavados contenían una proteína casi homogénea con una masa molecular aparente de casi 20 kDa (el error en las estimaciones de la masa molecular de SDS-PAGE es al menos de ±10 %, y puede ser mucho mayor para las proteínas inusuales). Dicha proteína se denomina celulasa 20 K. La proteína contaminante también se pudo eliminar por filtración en gel sobre Sephadex™ G50 en PIPES 50 mM/KOH, pH 6,0, que contenía EDTA 1 mM. Un ejemplo de esto se muestra en la Figura 9, donde los cristales sin lavar se purificaron por filtración en gel. La actividad de endoglucanasa eluyó junto con la proteína de 20 kDa mucho después del volumen del citocromo c (11,2 kDa), lo que demuestra que dicha proteína de 20 kDa se ve anormalmente retardada por la interacción con Sephadex™.

Se hicieron precipitar las proteínas del Pico III/IV con sulfato de amonio y se transfirieron a acetato de sodio 25 mM, pH 4,0, que contenía EDTA 1 mM del mismo modo que se ha descrito para las proteínas del Pico II. Tras la transferencia a acetato de sodio 25 mM, pH 4,0, se formó un gran precipitado y se desechó. Se dividió el sobrenadante activo en SP-Sepharose™. A baja carga de proteína (por ejemplo, 200 mg de proteína a una columna de 2,5 x 11 cm como se muestra en la Figura 10), la mayor parte de la actividad de endoglucanasa se unió a la columna y se eluyó con un gradiente de NaCl a aproximadamente NaCl 50 mM. A dicho pico activo, le siguió un segundo pico de proteína inactiva.

El análisis de SDS-PAGE mostró que tanto los picos activos como los inactivos contenían varias proteínas, incluyendo las proteínas con masas moleculares aparentes de casi 50 kDa, que no se pudieron distinguir entre sí mediante SDS-PAGE. Se purificaron adicionalmente ambos picos mediante cromatografía en Phenyl Sepharose™.

Se combinaron las fracciones activas (fracciones 15 a 18 de la Figura 10), se ajustaron hasta PIPES 50 mM/KOH, pH 6,0 (mediante la adición de PIPES 0,25 M/KOH pH 6,0) y sulfato de amonio al 15 % (mediante la adición de sulfato de amonio sólido) y se aplicó a una columna de 1,5 x 8,5 cm de Phenyl Sepharose™ equilibrada con PIPES 25 mM/KOH, pH 6,0, que contenía EDTA 1 mM y sulfato de amonio al 15 %. Se desarrolló la columna con un gradiente lineal de sulfato de amonio de 15 a 0 % en 104 ml de PIPES 25 mM/KOH, pH 6,0. Una vez finalizado el gradiente, se lavó adicionalmente la columna con PIPES 25 mM/KOH, pH 6,0. Dos picos de proteína eluyeron en el gradiente, primero un pequeño pico de proteína inactiva y luego un pico principal que contenía la mayor parte de la actividad de endoglucanasa. El análisis de SDS-PAGE (Figura 11A y B) mostró que ambos picos contenían proteínas esencialmente homogéneas con masas moleculares aparentes de casi 50 kDa (es decir, migraban ligeramente más despacio que el patrón de ovoalbúmina previamente teñido con BioRad, que tenía una masa molecular aparente de 47 kDa). Estas dos proteínas no se pudieron distinguir mediante los análisis de SDS-PAGE de los inventores, incluso cuando se procesaron juntas como mezclas. La proteína del pico activo se denominó celulasa 50 K y la proteína del pico inactivo se denominó proteína B 50 K. Se obtuvieron cantidades mayores de celulasa B 50 K por fraccionamiento del segundo pico (e inactivo) eluido desde SP-Sepharose™ (fracciones 19 a 23 de la Figura 10) sobre Phenyl Sepharose™ exactamente de la misma manera que se ha descrito anteriormente para las fracciones activas.

La producción de cantidades todavía mayores de celulasa 50 K y celulasa B 50 K se vio facilitada por la sobrecarga de la columna de P-Sepharose™. Por ejemplo, cuando se aplicaron 15 g de proteína a una columna de 4,5 x 31 cm de SP-Sepharose™, en lugar de unirse a la columna, la celulasa 50 K fue aparentemente desplazada por proteínas unidas más fuertemente, y eluyó antes del gradiente de NaCl. Dicho material ya estaba muy purificado, y se aisló celulasa 50 K homogénea del mismo mediante cromatografía sobre Phenyl Sepharose™ como se ha descrito anteriormente.

Para acelerar la purificación de grandes cantidades de celulasa 50 K, se invirtieron las columnas de SP-Sepharose y Phenyl Sepharose. Tras ajustar la concentración de sulfato de amonio al aproximadamente 15 %, se aplicaron las proteínas precipitadas en el Pico III/IV en Phenyl Sepharose como se ha descrito anteriormente. Con alta sobrecarga (por ejemplo, 17 g de proteína aplicados a una columna de 3,2 x 25 cm de Phenyl Sepharose) la mayoría de la proteína total se desplazó a través de la columna, pero la celulasa 50 K (que contenía la mayor parte de la actividad de endoglucanasa) se unió y eluyó al final del gradiente lineal de 15 a 0 % de sulfato de amonio en PIPES 25 mM/KOH, pH 6,0. El análisis Western con un antisuero de conejo que reconocía la celulasa B 50 K mostró que la celulasa B 50 K eluyó justo antes de la celulasa 50 K. Se logró una purificación adicional mediante fraccionamiento en SP-Sepharose como se ha descrito anteriormente. En dicho orden inverso de SP-Sepharose y Phenyl Sepharose, las proteínas del Pico III/IV precipitadas con sulfato de amonio se pudieron aplicar directamente en la

5 siguiente etapa de purificación sin la eliminación de la sal. De este modo, también se pudo evitar el gran precipitado de proteína, que apareció después de la transferencia de las proteínas concentradas en el Pico III/IV directamente en acetato de sodio 25 mM, pH 4,0 para SP-Sepharose. Como la celulasa 50 K apenas se une a SP-Sepharose, el fraccionamiento precedente sobre Phenyl Sepharose redujo notablemente la carga total de proteínas que interferían aparentemente sobre SP-Sepharose.

10 Se ensayaron tanto la celulasa 50 K como la celulasa B 50 K en el ensayo realizado en el Launder-Ometer para ver si eran responsables de los efectos beneficiosos del Pico IV presentado en el Ejemplo 10. Se encontró que ambas proteínas tienen efectos beneficiosos (Tabla VI). A las bajas concentraciones usadas en dicho experimento, no aumentaron por sí mismas la liberación de colorante índigo desde la cara exterior de la tela vaquera (es decir, $L_{derecho}$ no aumentó), pero disminuyeron eficazmente la retención del colorante sobre la cara interior de la tela vaquera ($L_{revés}$ se volvió más positivo y $b_{revés}$ disminuyó), especialmente cuando se usaron junto con la celulasa 20 K.

15 El celulasa 20 K tuvo buenos resultados en los ensayos realizados en el Launder-Ometer a pH 5, así como a pH 7. A pH 5, 0,2 mg de celulasa 20 K por g de tela vaquera aumentaron $L_{derecho}$ de 3,2 a 5,2. La adición de celulasa 50 K a 0,1 mg por gramo de tela vaquera junto con la celulasa 20 K también disminuyó la retención a pH 5 ($L_{revés}$ y $b_{revés}$ cambiaron de 0,0 y 2,6 con la celulasa 20 K sola a 1,3 y 1,5, respectivamente, con la mezcla de celulasas 50 K y 20 K).

Tabla VI. Liberación de colorante índigo por celulasa 20 K, celulasa 50 K y celulasa B 50 K

Las condiciones fueron las mismas que en la Tabla V. La dosis se muestra como mg de proteína por gramo de tela vaquera

<u>Muestra</u>	<u>Dosis</u> (mg/g)	$L_{derecho}$	$L_{revés}$	$b_{revés}$
Tampón solo	-	2,8	-0,6	1,6
Celulasa 20 K	0,18	5,6	-1,0	4,0
	0,09	4,8	-1,5	3,3
Celulasa 50 K	0,15	2,6	-0,3	1,0
	0,075	3,0	0,4	1,3
Celulasa B 50 K	0,31	2,8	1,3	0,8
	0,15	2,7	1,5	0,5
Celulasa 20 K +	0,18 + 0,075	5,6	0,3	2,5
Celulasa 50 K	0,09 + 0,075	5,1	0,3	2,1
Celulasa 20 K + celulasa B 50 K	0,18 + 0,15	4,7	0,0	3,0

20 **Ejemplo 10**

Propiedades de la celulasa 20 K

25 Aunque los anticuerpos policlonales preparados contra celulasas purificadas de *Trichoderma reesei* (designados anticuerpos anti-EGI, anti-CBHI y anti-CBHII) reconocieron proteínas en el medio de crecimiento de ALKO4237, solo hubo una reacción cruzada muy débil con la celulasa 20 K pura en las mismas condiciones de análisis de transferencia Western.

Cuando se sondó el medio de crecimiento de ALKO4237 en el análisis Western con antisuero generado en conejos contra la celulasa 20 K pura, se observó una potente banda a aproximadamente 35 kDa además de la banda de 20 kDa. No se pudo detectar actividad de endoglucanasa aparente para dicha proteína de 35 kDa. Además, se observó una banda más débil inmediatamente delante de la banda de 20 kDa (Figura 14).

30 ALKO4124 dio un patrón casi idéntico a ALKO4237, lo que indica que este y otros hongos probablemente contienen celulasas muy similares a la celulasa 20 K de la presente invención.

En la Figura 17, se muestran secuencias de aminoácidos de péptidos tripticos derivados de las celulasa 20 K.

La celulasa 20 K purificada tuvo buenos resultados en el biolavado a la piedra a pH neutro sin la adición de otras actividades enzimáticas como se muestra en la Tabla VII.

Tabla VII. Biolavado a la piedra mediante celulasa 20 K purificada

- 5 Las condiciones fueron como las del experimento que se muestra en la Tabla V. Las dosis se muestran como mg de proteína/g de tejido de tela vaquera. "Medio entero" indica el medio de crecimiento concentrado de ALKO4237 sin dividir.

Adición	Dosis	L _{derecho}	b _{derecho}	L _{revés}	b _{revés}
Tampón	0,0	3,6	0,1	0,5	0,6
20 K	0,72	8,9	2,9	-1,1	4,7
20 K	0,25	6,0	2,3	-0,5	3,6
20 K	0,07	5,3	1,7	-0,4	2,9
Medio entero	20	6,1	2,8	-2,9	5,5

- 10 En comparación con el medio sin dividir, la celulasa 20 K dio como resultado el mismo grado de claridad (L_{derecho} = 6,0-6,1) a 1/80 de la dosis de la proteína. Además, se produjo menos retorción sobre el lado del revés del tejido (L_{revés} = -0,5 en comparación con -2,9, y b_{revés} = 3,6 en comparación con 5,5). El tejido tratado con celulasa 20 K resultó tener una textura suave agradable.

Aunque la celulasa 20 K tuvo unos resultados sorprendentemente buenos sin otras adiciones, se obtuvieron un aspecto y una textura del tejido incluso mejores al usar 20 K junto con las combinaciones de DEAE-Sepharose I, III o IV (Tabla VIII).

- 15 **Tabla VIII. Sinergia en el biolavado a la piedra entre la celulasa 20 K y las combinaciones de endoglucanasas eluidas desde DEAE-Sepharose**

Las condiciones fueron las de la Tabla V.

Adición	Dosis	L _{derecho}	b _{derecho}	L _{revés}	b _{revés}
Tampón	0,0	3,8	0,2	-0,7	1,5
20 K	0,18	5,8	2,3	-2,2	5,5
Combinación I	15	5,1	1,9	-3,1	5,7
Combinación III	47	5,2	1,6	-0,1	2,6
Combinación IV	14	5,6	0,9	0,4	1,8
20 K + Combinación I	15,18	7,1	2,8	0,7	3,3
20 K + Combinación III	47,18	7,6	3,1	-1,7	5,3
20 K + Combinación IV	14,18	8,6	2,6	0,8	3,2
Medio entero	20	5,7	2,4	-4,1	5,9

- 20 Las mezclas de celulasa 20 K con las combinaciones I, III y IV produjeron una mayor claridad (aumento de L_{derecho}) que cualquier componente solo. Al menos para la combinación de celulasa 20 K con la combinación IV, es evidente que esto se debe a la sinergia y no simplemente a un efecto aditivo. Además, la retorción con todas las mezclas, en realidad, fue inferior (L_{revés} más positivo, b_{revés} menos) que la retorción observada solo con la celulasa 20 K. La mezcla de 20 K con la combinación IV fue particularmente eficaz. La combinación IV contiene muchas proteínas,

una de las cuales (un polipéptido 50 KDa) se purifica junto con la actividad de endoglucanasa durante la cromatografía de la combinación IV sobre Sephadex G100 y S-Sepharose. Aunque se logra un buen biolavado a la piedra solo con la celulasa 20 K, se pueden obtener mejores resultados con la celulasa 20 K más una o más proteínas purificadas de la combinación IV. Ya se ha presentado el biolavado a la piedra con las mezclas de la celulasa 20 K y la celulasa 50 K y la celulasa B 50 K purificadas de la combinación III/IV (Tabla VI del Ejemplo 9). Por lo tanto, la presente invención no se limita al uso de solo la celulasa 20 K. Otras proteínas del medio ALKO4237 son útiles solas o en combinaciones adecuadas.

En el ensayo de endoglucanasa convencional descrito por Bailey *et al.* (1981, *loc. cit.*), se selecciona la cantidad de enzima que produce, en 10 min y a pH 4,8 (tampón de Na-citrato 0,05 M), equivalentes reductores a aproximadamente 0,6 mM de hidroxietilcelulosa al 1 %, generando un cambio de absorbancia final (ΔA_{540}) de entre 0,2 y 0,25. Esto supera con creces el intervalo en el que ΔA_{540} es proporcional a la cantidad de celulasa 20 K.

Por lo tanto, se modificó el procedimiento de la siguiente manera. Se usó suficiente enzima para producir equivalentes reductores de aproximadamente 0,2 mM en 10 min y en tampón HEPES 0,05 M (pH 7,0). Para alcanzar la concentración umbral de los equivalentes reductores por encima de la cual se forma color en el sistema DNS, se añadió glucosa 0,12 mM recién preparada a la solución madre de reactivo DNS. Dicho método (denominado método "modificado") se usó al caracterizar la actividad de endoglucanasa de la celulasa 20 K y también de la celulasa 50 K. Con hidroxietilcelulosa al 1 % como sustrato, el intervalo en el que ΔA_{540} es proporcional a la cantidad de celulasa 20 K y 50 K es relativamente reducido, y por ello, se tomó carboximetilcelulosa al 2 % como sustrato alternativo. Con carboximetilcelulosa al 2 %, el intervalo de correlación lineal entre ΔA_{540} y la cantidad de celulasa 20 K y 50 K fue más amplio que con hidroxietilcelulosa al 1 %. La actividad de endoglucanasa determinada con carboximetilcelulosa al 2 % fue aproximadamente 8-10 veces superior para la celulasa 20 K y aproximadamente 50 veces superior para la celulasa 50 K en comparación con la determinada con hidroxietilcelulosa al 1 %.

No se detectó actividad de celulasa 20 K para 4 metilumbeliferil- β -D-lactósido, un sustrato característico de las celobiohidrolasas. La actividad hacia el papel de filtro también fue muy baja, pero detectable.

La celulasa 20 K fue relativamente estable al calor. Se incubó a 7 μ g/ml y 100 °C. En Tris-HCl 25 mM, EDTA 0,2 mM, durante 30 o 60 min, y luego ensayó a pH 7,0 y 50 °C. Se mantuvo 52 % y 35 %, respectivamente, de la actividad de endoglucanasa a pH 7,2. Se mantuvo 40 % y 22 %, respectivamente, a un pH de 8,8. (Estos valores de pH se midieron a temperatura ambiente, siendo el pH real a 100 °C algo inferior). A 80 °C y pH 7,2, se mantuvo 70 % de la actividad durante 60 min.

Estos resultados indican que la enzima es adecuada para aplicaciones en las que se puede exponer (por ejemplo, accidentalmente) a temperaturas elevadas. Además de ser resistente a la inactivación irreversible a altas temperaturas, la enzima presentó una temperatura óptima de 70 °C durante ensayos de 10 min a pH 7,0 (Figura 15). La reducción de la actividad observada por encima de 70 °C se debió principalmente a un cambio reversible en la configuración de la enzima. La enzima recuperó la mayor parte de su actividad cuando volvió a los 50 °C.

A 50 °C, la celulasa 20 K presentó 80 % o más de su actividad máxima en todo el intervalo de pH 4 a 9, y casi 50 % a pH 10. Esto sucedió tanto en ensayos de 10 min (Figura 16A) como de 60 min (Figura 16B). Estas figuras también muestran la dependencia del pH de la enzima a 70 °C. Con ensayos de 10 min, la enzima fue más activa a 70 °C de lo que fue a 50 °C en el intervalo de pH 4,5 a 8 y aproximadamente igual de activa a pH 10 (Figura 16A). Con ensayos de 60 min (es decir, acercándose a las condiciones comerciales), la enzima fue más activa a 70 °C de lo que fue a 50 °C a pH entre 5,5 y 7,5. Sin embargo, solo fue ligeramente menos activa a 70 °C que a 50 °C hasta un pH 10. En la práctica, esto significa que la enzima se puede usar igualmente bien en un intervalo de pH amplio y a temperaturas de hasta al menos 70 °C.

Ejemplo 11

Propiedades de la celulasa 50 K

La celulasa 50 K pura resultó tener tanto actividad de endoglucanasa (contra hidroxietilcelulosa) como actividad de celobiohidrolasa (contra 4-metilumbeliferil- β -D-lactósido, ensayada esencialmente según lo descrito por van Tilbeurgh *et al*, en *Methods in Enzymology* [1988], vol 160, pág. 45-59). Una muestra de la enzima pura con una A_{280} de 1,8 contenía 2.030 ECU/ml y 300 PCU/ml a pH 7,0 y 50 °C (una PCU es la cantidad de actividad que libera 1 nmol de metilumbeliferona por segundo).

En los análisis Western, la celulasa 50 K fue potentemente reconocida por el antisuero (KH 1057) generado contra la endoglucanasa I de *T. reesei*, pero solo débilmente por los antisueros (KH 1050 y KH 1053, respectivamente) contra las celobiohidrolasas I y II de *T. reesei*. No fue reconocida por el antisuero contra la celulasa 20 K (Figura 14). Cuando el medio de crecimiento de ALKO 4237 se sondó en el análisis Western con antisuero de conejo generado contra la propia celulasa 50 K, solo se observó una banda evidente (que tenía una masa molecular de entre 33 y 47 kDa), además de la banda muy potente a aproximadamente 50 kDa.

La masa molecular aparente de celulasa 50 K por SDS-PAGE disminuyó en aproximadamente 2 a 5 kDa cuando se trató la proteína con endoglicosidasa H_f, lo que indica que la enzima contiene hidratos de carbono que pueden ser eliminados por dicha endoglicosidasa.

- 5 La celulasa 50 K fue inusualmente resistente a la digestión con tripsina, indicando que tiene una estructura inusualmente estable. Sin embargo, se escindió mediante el tratamiento con cianogenbromuro, y luego los fragmentos resultantes se pudieron digerir con tripsina o con lisilendopeptidasa C. Las secuencias de algunos de los péptidos así obtenidos se muestran en la Tabla IX.

Tabla IX

Secuencias de péptidos aislados de la celulasa 50 K (los restos inciertos figuran en minúsculas)

- 10 N° 507 VYLLDETEHR
 N° 509 XXLNPGGAYYGT
 N° 563 MsEGAECEYDGVCDKDG
 N° 565 NPYRVXITDYYGNS
 N° 603 DPTGARSELNPGGAYYGTGYXDAQ
 15 N° 605 XXVPDYhQHGVda
 N° 610 NEMDIXEANSRA
 N° 611 LPXGMNSALYLSEMDPTGARSELNP
 N° 612 VEPSPEVTYSNLRXGEIXgXF
 N° 619 DGCGWNPYRVvITiDYYnN
 20 N° 620 LPCGMXSALY
 N° 621 ADGCQPRTKYIVLDdLIHPXXQ.

- 25 El celulasa 50 K es una enzima estable que presenta actividad de endoglucanasa en un amplio intervalo de valores de pH y a altas temperaturas, por lo que es adecuada para su uso en muchas condiciones industriales. A pH 7,0 y con tiempos de reacción de 60 min, tiene una temperatura óptima de entre 65 y 70 °C, e incluso con este largo tiempo de reacción todavía presenta, a 75 °C, 50 % de la actividad observada a 50 °C (Figura 12).

- 30 Con tiempos de reacción de 60 min, el pH óptimo fue muy amplio a 50 °C, con actividad esencialmente constante a pH de entre 4,4 y 7,0, y las actividades a pH 9 y 10 equivalen a 50 % y 30 %, respectivamente, de la de pH 7,0. A 70 °C, hubo un evidente valor óptimo a pH 6 y, entre pH 5 y 7, la actividad (con tiempos de reacción de 60 min) fue 3 veces o más superior a la de 50 °C. Sin embargo, a valores de pH de 4,4 y superiores a 8, la actividad fue mayor a 50 °C que a 70 °C (en ensayos de 60 min), lo que sugiere que la estabilidad de la enzima disminuye a 70 °C por el lado del derecho en el intervalo de pH de 5 a 7,5. En la Figura 13, se ilustra la dependencia en el pH.

Ejemplo 12

Propiedades de la celulasa B 50 K (no forma parte de la invención reivindicada)

- 35 No se pudo medir actividad de endoglucanasa detectable para la celulasa B 50 K (anteriormente denominada proteína B 50 K) con hidroxietilcelulosa ni carboximetilcelulosa. A pH ácido, la celulasa B 50 K tuvo una baja actividad de celobiohidrolasa, lo que (medida con 4-metilumbeliferil-β-D-lactósido) a pH 5 fue inferior al 0,1 % de la de la celulasa 50 K. Además, la celulasa B 50 K tuvo una actividad detectable hacia un papel de filtro a pH 4,8, y se usó celulosa Solca-Floc amorfa, hinchada con ácido, a pH 5 y 7 en las determinaciones de la actividad enzimática.

- 40 En los análisis Western, la celulasa B 50 K fue reconocida potentemente por el antisuero (KH1050) generado contra la celobiohidrolasa I de *T. reesei*, pero solo débilmente por los antisueros generados contra la celobiohidrolasa II o endoglucanasa I de *T. reesei* o contra la celulasa 50 K. No fue reconocida por el antisuero generado contra la celulasa 20 K (Figura 14). La Tabla X muestra las secuencias de péptidos aislados de celulasa B 50 K.

Tabla X

Secuencias de péptidos aislados de la celulasa B 50 K (los restos inciertos figuran en minúsculas)

Nº 534 vGNPDFY GK

Nº 535 FGPIGSTY

5 N° 631 LSQYFIQDGeRK

N° 632 FTVVSRFEENK

N° 636 HEYGTNVGSRFYLMNGPDK

Ejemplo 13**Estabilidad de celulasas neutras en diferentes detergentes**

10 Se ensayó la estabilidad de las preparaciones de celulasas neutras en tres soluciones detergentes diferentes. Las soluciones detergentes fueron OMO[®] Total (o OMO[®] Neste, Lever RU), OMO[®] Color (Lever S.A.) y detergente líquido para tejidos de color (Unilever, Países Bajos). Las preparaciones de celulasa ensayadas fueron filtrados de cultivo concentrado de ALKO4125, ALKO4179, ALKO4237 y ALKO4265 (Ejemplo 1), y celulasas 20 K y 50 K de la cepa ALKO4237 (Ejemplo 9).

15 Se incubaron las preparaciones de celulasas a 40 °C en soluciones detergentes al 0,25 %. Se midió la actividad contra la hidroxietilcelulosa (ECU/ml, Ejemplo 1) (pH 7, 50 °C) de las muestras tomadas después de 5-30 minutos de incubación.

Las preparaciones ensayadas fueron las siguientes:

Filtrados de cultivo:

20 ALKO4125: 780 ECU/ml (pH 7, 50 °C)

ALKO4179: 830 ECU/ml

ALKO4265: 760 ECU/ml

ALKO4237: 650 ECU/ml.

Las proteínas purificadas:

25 celulasa 20 K: 9.423 ECU/ml

celulasa 50 K: 10.100 ECU/ml.

Los resultados se muestran en las Tablas XI-XIII.

30 Las preparaciones de celulasas ALKO4179, ALKO4265 y ALKO4237, y las celulasas 20 K y 50 K permanecen casi 100 % estables durante 30 minutos a 40 °C en los tres detergentes ensayados. ALKO4125 permanece estable durante 30 minutos a 40 °C en detergente líquido para tejidos de color y en OMO[®] Neste.

Tabla XI. Estabilidad de diferentes celulasas en detergente líquido para tejidos de color al 0,25 % (pH 7.5 a 7.9)

Preparación	Dosis de enzima % (ml)	pH*	% de actividad que queda				
			0'	5'	10'	20'	30'
Filtrados de cultivos:							
ALKO4125	6	7,3	100	97	98	98	99
ALKO4179	6	7,1	100	99	100	100	10
ALKO4265	6	7,2	100	100	100	100	100

Preparación	Dosis de enzima % (ml)	pH*	% de actividad que queda				
			0'	5'	10'	20'	30'
ALKO4237	6	7,1	100	100	82	95	100
Proteínas purificadas de ALKO4237:							
Celulasa 20 K	1	7,8	100	98	99	97	100
Celulasa 50 K	1	7,6	100	100	100	100	100

* pH del detergente al 0,25 % + solución enzimática tras incubación de 30'.

Tabla XII. Estabilidad de diferentes celulasas en OMO® Total al 0,25 % (u OMO® Neste pH 8,5)

Preparación	Dosis de enzima % (ml)	pH*	% de actividad que queda				
			0'	5'	10'	20'	30'
Filtrados de cultivos:							
ALKO4125	6	7,8	100	98	96	86	87
ALKO4179	6	7,3	100	98	96	96	99
ALKO4265	6	7,1	100	100	100	100	100
ALKO4265	4	7,8	100	99	97	100	100
ALKO4237	4	7,8	100	100	100	99	100
ALKO4237	2	7,3	100	99	97	99	99
Proteínas purificadas de ALKO4237:							
Celulasa 20 K	1	8,2	100	100	99	93	100
Celulasa 50 K	1	7,8	100	95	92	95	94

* pH del detergente al 0,25 % + solución enzimática tras incubación de 30'.

5 Tabla XIII. Estabilidad de diferentes celulasas en OMO® Color al 0,25 % (pH 9,6-10)

Preparación	Dosis de enzima % (ml)	pH*	% de actividad que queda				
			0'	5'	10'	20'	30'
Filtrados de cultivos:							
ALKO4125	6	9,6	100	(15)	(15)	(13)	(14)
ALKO4179	6	8,3	100	97	100	97	99
ALKO4265	6	9,1	100	100	100	100	100
ALKO4265	4	8,5	100	93	95	99	98
ALKO4237	4	8,5	100	98	96	96	99

Preparación	Dosis de enzima % (ml)	pH*	% de actividad que queda				
			0'	5'	10'	20'	30'
ALKO4237	2	9,1	100	93	95	99	98
Proteínas purificadas de ALKO4237:							
Celulasa 20 K	1	1	9,8	100	99	100	100
Celulasa 50 K	1	1	8,9	100	100	100	100

* pH del detergente al 0,25 % + solución enzimática tras incubación de 30'.

Ejemplo 14

Función de celulasas neutras en Detergentes en HEC Sustrato

5 Se determinó la función de diferentes celulasas neutras en detergentes mediante el uso de la hidroxietilcelulosa (HEC) como sustrato. Las preparaciones de celulasa ensayadas eran filtrados de cultivo concentrado de ALKO4265 y ALKO4237, y celulasas 20 K y 50 K purificadas de la cepa ALKO4237. Los sustratos de HEC se prepararon disolviendo HEC al 1 % en soluciones detergentes al 0,25 %. Mediante el uso de estos sustratos se midió la actividad contra HEC (ECU/ml) a 40 °C de cada preparación de celulasa como se describe en el Ejemplo 1. Los detergentes y las preparaciones de celulasa usados en dichos experimentos se describen en el Ejemplo 13.

10 pH de los sustratos:

HEC/tampón	pH 7
HEC/Detergente líquido para tejidos de color	pH 7,5
HEC/OMO® Total	pH 7,8
HEC/OMO® Color	pH 9,7

Tabla XIV. ECU de las preparaciones de celulasa en diferentes detergentes (en comparación con el % de la actividad de ECU medida en tampón a pH 7)

Preparación	% de actividad			
	ECU/tampón	ECU/det. liq. col.	ECU/OMO® Total	ECU/OMO® Color
Filtrados de cultivo:				
ALKO4265	100	89	96	59
ALKO4237	100	97	95	40
Proteínas purificadas:				
Celulasa 20 K	100	100	93	81
Celulasa 50 K	100	92	79	46

15 Las preparaciones de celulasas ALKO4237 y ALKO4265, y las celulasas 20 K y 50 K funcionan en los tres detergentes ensayados cuando se usa HEC como sustrato.

Ejemplo 15

Uso de celulasas neutras en detergentes sobre productos textiles tejidos de algodón

20 En el presente experimento se describe la capacidad de las celulasas neutras para funcionar como agente suavizante de tejidos y para prevenir la formación de pelusa y, por lo tanto, reducir la tendencia a la formación de fibra en la superficie del tejido de algodón tras repetidos lavados con detergentes. Las preparaciones de celulasa ensayadas fueron filtrado de cultivo concentrado de ALKO4237, y celulasas 20 K y 50 K purificadas de la cepa

ALKO4237 (Ejemplos 1 y 9).

5 El experimento de lavado se llevó a cabo con un Launder-Ometer LP-2 (Atlas, Illinois, EE.UU.). Se cargaron aproximadamente 10 g de muestra de producto textil tejido de algodón sin blanquear previamente lavado (Ejemplo 3) en un recipiente de 1,2 litros que contenía 150 ml de solución de detergente al 0,25 % con o sin celulasa. Las dosis de celulasa se basaron en las cantidades de proteínas. Las soluciones detergentes fueron OMO® Total (Lever, RU) y detergente líquido para tejidos de color (Unilever, Países Bajos). Se añadió una cantidad de bolas de acero a cada recipiente para aumentar la acción mecánica. El Launder-Ometer se hizo funcionar a 42 rpm durante 0,5 o 1 hora a 40 °C. El material se lavó 4 veces con aclarado y secado intermedios.

10 Se usó la pérdida de peso (véase el Ejemplo 6) para describir la cantidad de pelusa eliminada de la superficie de los tejidos.

Tabla XV. Pérdida de peso de los tejidos después del primer tiempo de lavado con celulasas neutras en detergentes

Nº de muestra	Preparación	Dosis de enzima como proteína/g de tejido	Tiempo, h	Pérdida de peso, %
En detergente líquido para tejidos de color:				
1	-	-	1	0,05
2	ALKO4237	11	1	0,3
3	ALKO4237	22	1	0,7
4	Celulasa 20 K	2	1	0,1
5	Celulasa 20 K	5	1	0,5
6	Celulasa 20 K	8	1	1,0
7	Celulasa 50 K	2	1	0,1
8	Celulasa 50 K	5	1	0,2
9	-	-	0,5	0,2
10	Celulasa 20 K	8	0,5	0,5
En OMO® Total:				
11	-	-	1	0,03
12	Celulasa 20 K	8	1	1,1
13	-	-	0,5	0,1
14	Celulasa 20 K	8	0,5	0,7

15 En la Tabla XV, se muestra que, tras el primer lavado en el Launder-Ometer, la pérdida de peso de los tejidos aumentó claramente más con los tejidos tratados con celulasas que con los tejidos tratados solo con el detergente. También se aumentó la pérdida de peso en función de la dosis de celulasa y, además, con la celulasa 20 K se aumentó la pérdida de peso al elevar el tiempo de lavado de 0,5 horas a 1 hora. La celulasa 20 K funcionó igual de bien en el detergente líquido para tejidos de color que en OMO® Total. Estos resultados indican que, en particular, la celulasa 20 K y la preparación de celulasa ALKO4237 funcionan en los detergentes como agentes de eliminación de pelusa ya tras un tiempo de lavado.

20 Tras tres tiempos de lavado más con las muestras 1, 2, 4 y 7 (Tabla XV), un grupo compuesto por tres personas realizó la evaluación de los tejidos. Se pidió a los miembros del grupo que evaluaran la suavidad y el aspecto visual de los tejidos tratados de la siguiente manera.

La suavidad de los tejidos:

- A. El tejido tratado con celulasa es más suave que el tejido tratado sin celulasa.
- 25 B. El tejido tratado con celulasa es tan suave como el tejido tratado sin celulasa.
- C. El tejido tratado con celulasa es más duro que el tejido tratado sin celulasa.

Los resultados se muestran en la Tabla XVI.

30 Se evaluó el aspecto visual de los tejidos mediante la clasificación de los mismos con una puntuación del 1 al 5. La puntuación de 5 no dio pelusas ni formación de fibra en la superficie, y la textura del tejido se hizo más evidente. La puntuación de 1 dio muchas pelusas y formación de fibra en la superficie del tejido. Se calculó la puntuación total

para cada tejido y se dividió entre el número de miembros del grupo. La puntuación media del aspecto visual de cada tejido se muestra en la Tabla XVI.

Tabla XVI. Suavidad y aspecto visual de los tejidos tras 4 lavados repetidos con celulasas neutras en detergentes

Preparación	Dosis de enzima como proteína/g de tejido	Tiempo, h	Suavidad	Aspecto visual
En detergente líquido para tejidos de color:				
-	-	1	100 %: más suave con celulasa	1
ALKO4237	11	1	100 %: más suave con celulasa	3,2
Celulasa 20 K	2	1	100 %: más suave con celulasa	3,7
Celulasa 50 K	2	1	100 %: sin diferencia	1,7

5 Tras 4 tratamientos, los tejidos tratados con celulasas resultaron tener un aspecto visual claramente mejor que los tejidos que se trataron solo con detergente. Por lo tanto, los tejidos tratados con estas celulasas mantuvieron un buen aspecto, y se impidió la formación de pelusa tras varios lavados en comparación con el tejido tratado sin celulasas. Además, tras 4 lavados, los tejidos tratados con ALKO4237 y celulasa 20 K resultaron ser más suaves que el tejido tratado solo con detergente.

10 **Ejemplo 16**

Uso de celulasas neutras en detergentes sobre punto afelpado de algodón

15 En el presente experimento, se describe la capacidad de las celulasas neutras para funcionar como agente suavizante de tejidos y para prevenir la formación de pelusa y, de este modo, reducir la tendencia a la formación de fibra en la superficie del producto textil de punto afelpado de algodón coloreado tras varios lavados en detergentes. Las preparaciones de celulasas ensayadas fueron filtrado de cultivo concentrado de ALKO4237 y celulasa 20 K purificada de la cepa ALKO4237 (Ejemplos 1 y 9).

Se lavaron muestras de punto afelpado de algodón verde en un Launder-Ometer en detergente líquido para tejidos de color o en OMO® Total durante 1 h 3 o 10 veces con o sin celulasas como se describe en el Ejemplo 15.

20 La evaluación de los tejidos de punto fue realizada por un grupo compuesto por tres personas. Se pidió a los miembros del grupo que evaluaran la suavidad y el aspecto visual (tanto por el derecho como por el revés) de los tejidos de punto tratados como se describe en el Ejemplo 15. La pérdida de peso de los tejidos de punto se determinó como se describe en el Ejemplo 15. Los resultados se muestran en la Tabla XVII.

25 Tras 3 lavados, los tejidos de punto tratados con la celulasa 20 K resultaron tener un mejor aspecto visual, tanto por el derecho como por el revés, que los tejidos de punto tratados solo con detergente. Los tejidos de punto tratados 10 veces con preparación de celulasa ALKO4237 resultaron tener un aspecto visual claramente mejor y un color verde brillante en comparación con los tejidos tratados solo con detergente. El mejor aspecto visual de los tejidos de punto tratados con celulasa ya se detectó tras 1 lavado (en especial por el lado del revés) y se desarrolló todavía más durante los lavados adicionales. Los tejidos de punto tratados con celulasa también fueron más suaves que los tejidos de punto tratados solo con detergente.

30

Tabla XVII. Suavidad, pérdida de peso y aspecto visual de los tejidos de punto atelpados tras 3 o 10 lavados repetidos con o sin celulasas en detergentes. Antes de los lavados, el pH de la solución de detergente para tejidos de color al 0,25 % era de 7,9, y de 8,4 para la solución de OMO® Total al 0,25 %

Preparación	Dosis de enzima como proteína/g de tejido	Lavados	pH después de los lavados	% de pérdida de peso	Suavidad	Aspecto visual	
						derecho	revés
<u>Detergente líquido para tejidos de color</u>							
-	-	3	7,9	0,46		1	1
20 K*	5	3	7,4	0,88	33 %: más suave con celulasa	1,5	2,7
-	-	10	8,0	1,46		1	1
A4237	20	10	7,9	2,80	100%: más suave con celulasa	2,5	2,8
<u>OMO® Total</u>							
-	-	10	8,3	0,57		1	1
A4237	20	10	8,2	1,57	100%: más suave con celulasa	2,3	2,8

* Celulasa 20 K

Ejemplo 17

Uso de celulastas neutras en detergentes sobre punto afelpado de algodón envejecido

En el presente experimento, se describe la capacidad de las celulastas neutras para funcionar como agente de renovación y suavizante de tejidos.

- 5 Se lavó 10 veces punto afelpado de algodón verde, con un secado intermedio, en una lavadora Cylinda con el programa 3 a 60 °C con 10 ml de OMO® Color (Lever, RU). Este programa simulaba los lavados del punto en la práctica.

Tras 10 tratamientos, este punto envejecido adquirió un aspecto poco atractivo y apagado con mucha pelusa en la superficie.

- 10 Tras estos 10 lavados repetidos, se usó el punto afelpado para los experimentos de lavado con o sin celulasa. Se lavaron las muestras de punto en un Launder-Ometer en detergente líquido para tejidos de color durante 1 h de 1 a 3 veces como se ha descrito en el Ejemplo 15 con aclarado y secado intermedios. Las preparaciones de celulasa usadas fueron filtrado de cultivo concentrado de ALKO4237, y celulastas 20 K y 50 K purificadas de ALKO4237 (Ejemplo 9).

- 15 La evaluación de los tejidos de punto fue realizada por un grupo compuesto por tres personas. Se pidió a los miembros del grupo que evaluaran la suavidad y el aspecto visual (tanto por el derecho como por el revés) de los tejidos tratados como se describe en el Ejemplo 15. La pérdida de peso de los tejidos de punto se determinó como se describe en el Ejemplo 15. Los resultados se muestran en la Tabla XVIII.

- 20 Tras un lavado, los tejidos de punto tratados con ALKO4237 y celulasa 20 K resultaron tener un aspecto visual ligeramente mejor que el tejido de punto tratado solo con detergente. El buen aspecto visual y el aspecto más atractivo se desarrollaron todavía más en los tejidos tratados con celulasa 20 K tras 2 y 3 lavados. El aspecto visual también se mejoró tras dos lavados en los tejidos de punto tratados con celulasa 50 K en comparación con el tejido de punto tratado solo con detergente. En general, los tejidos de punto tratados con celulastas resultaron tener un aspecto claramente mejor y más atractivo, mientras que los tejidos de punto tratados sin celulasa seguían teniendo un aspecto poco atractivo y apagado.
- 25

Tabla XVIII. Suavidad, pérdida de peso y aspecto visual de los tejidos de punto afelpados envejecidos tras 1 a 3 lavados repetidos con o sin celulosas en detergentes. Antes de los lavados, el pH de la solución de detergente para tejidos de color al 0,25 % era de 7,9.

Preparación	Dosis de enzima como proteínal/g de tejido	Lavados	pH después de los lavados	% de pérdida de peso	Suavidad	Aspecto visual	
						derecho	revés
-	-	1	ND	0		1	1
ALKO4237	20	1	ND	0,61	100 %: sin diferencia	1	1,5
20 K*	5	1	ND	0	100 %: sin diferencia	1,5	1,5
-	-	2	7,9	0,10		1	1
20 K*	5	2	7,7	0,46	100 %: más suave con celulosa	2,5	2,2
50 K*	5	2	7,7	0,26	100 %: sin diferencia	1	1,2
50 K*	15	2	7,3	0,49	100 %: sin diferencia	1	1,3
-	-	3	ND	0,31		1	1
20 K*	5	3	ND	0,88	100 %: más suave con celulosa	3,0	2,2

ND = No determinado

* = Celulosa 20 K o 50 K

H ₂ O desionizada		82	μl
Dynazyme	(2 U/μl)	1	μl
Total		101,4	μl

La reacción de PCR se realizó en las siguientes condiciones:

Etapa 1	95 °C	5 min
Etapa 2	95 °C	1 min
Etapa 3	56 °C	1 min
Etapa 4	72 °C	1 min
Etapa 5	Pasar a la "etapa 2"	29 veces más
Etapa 6	72 °C	8 min
Etapa 7	4 °C	mantener

5 Se analizaron 10 μl de la mezcla de reacción por electroforesis en gel de agarosa, y se detectó una sola banda correspondiente a aproximadamente 600 pb de longitud. El resto del producto de PCR fue digerido con endoglucanasa de restricción *EcoR1*, y procesado por electroforesis en agarosa. Se extrajo la sección de agarosa que contenía el fragmento de ADN y se purificó mediante el método Magic PCR Preps (Promega, EE.UU.) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Se ligó el fragmento aislado con plásmido pBluescript II SK+ (Stratagene, EE.UU.), que se cortó de manera similar con *EcoR1*. Se transformaron células XL-Blue de *Escherichia coli* competentes (Stratagene, EE.UU.) con la mezcla de ligadura. Se aisló ADN de plásmido de algunas de las colonias resultantes mediante el método Magic Minipreps (Promega, EE.UU.) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Se analizó el ADN del plásmido por electroforesis en agarosa, y un clon con las características esperadas se designó pALK549.

15 Se secuenció el ADN de *Melanocarpus* desde pALK549 usando los kits ABI (Applied Biosystems, EE.UU.) basados en los cebadores T3 y T7 marcados con fluorescencia, o cebadores específicos de la secuencia con didesoxinucleótidos marcados con fluorescencia mediante el protocolo de secuenciación en ciclos de cebadores con colorante Taq de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Debido al alto contenido de GC del ADN de *Melanocarpus*, las reacciones de secuenciación se realizaron a la temperatura de hibridación de 58 °C, con DMSO al 5 % (v/v). Se analizaron las reacciones de secuenciación en el secuenciador ABI 373A (Applied Biosystems, EE.UU.), y se caracterizaron las secuencias obtenidas usando el paquete informático de análisis de secuencias del grupo Genetics Computer, versión 7.2.

20 Se determinó que el inserto (594 pb) en pALK549 codificaba la mayoría de los péptidos derivados de la celulasa 20 K (Figura 17). El ADN amplificado por PCR (además de los cebadores) corresponde a los nucleótidos 175-716 de la Figura 19.

25 Se aisló ADN cromosómico de ALKO4124 de *Myriococcum* sp. como se describe en el Ejemplo 18. Una reacción PCR con los cebadores 429-32 y fr28-16, y el ADN cromosómico de ALKO4124 como molde, produjo un fragmento de mismo tamaño que el generado a partir de ADN de ALKO4237. Este fragmento se secuenció parcialmente, y fue casi idéntico a la secuencia de ALKO4237. Se concluye que ALKO4124 de *Myriococcum* sp. tiene una proteína que es casi idéntica a la celulasa 20 K de ALKO4237 de *Melanocarpus albomyces*. Este resultado también coincide con la observación de que los anticuerpos específicos de la celulasa 20 K ALKO4237 también reconocen una banda de proteína 20 K del medio de crecimiento de ALKO4124 en el análisis Western (Figura 14). Las enzimas de ambas cepas dieron buenos resultados similares en los experimentos biolavado ala piedra (Ejemplos 3 y 4).

Ejemplo 20

Clonación y secuenciación de genes de celulasa 20 K ALKO4237 de *Melanocarpus albomyces*

35 Se cultivaron células XL1-Blue MRA (P2) de *E. coli* (Stratagene, EE.UU.) en LB + maltosa al 0,2 % + MgSO₄ 10 mM, y se diluyeron hasta DO₆₀₀ = 0,5. Se infectaron las células con el biblioteca genómica de ALKO4237 de *Melanocarpus albomyces* (Ejemplo 18) durante 15 min a 37 °C, y se sembraron con agar enzima de NZY en las placas de NZY. Se incubaron las placas a 37 °C durante una noche. Se transfirieron las placas a un filtro de nylon (Hybond, Amersham, RU) de acuerdo con las instrucciones de Stratagene.

Se marcó el fragmento de PCR purificado (Ejemplo 19) con digoxigenina de acuerdo con el manual "DIG DNA Labeling and Detection Nonradioactive, Application Manual". Se realizó la hibridación a 68 °C. Se recogieron los

clones positivos en tampón SM/cloroformo, y se purificaron con una segunda serie de detección.

En dichas condiciones, se encontraron 4 clones positivos. Se realizó el aislamiento de ADN de bacteriófago lambda a gran escala a partir de los clones de acuerdo con Sambrook *et al*, en "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989. Los ADN de fago se analizaron por digestión del ADN con varias enzimas de restricción, y el ADN digerido se hibridó con la sonda de PCR. Se aislaron tres fragmentos de hibridación: fragmento *EcoR1-XhoI* de aproximadamente 2,6 kb, fragmento *XhoI* de aproximadamente 4,9 kb y fragmento *SacI* de aproximadamente 3 kb. Se insertaron dichos fragmentos en vector pBluescript II SK+ cortado de forma similar (Stratagene, EE.UU.), creando los plásmidos pALK1221, pALK1222 y pALK1223, respectivamente (Figura 18).

Se secuenció el ADN de *Melanocarpus albomyces* en pALK1221 como se ha descrito en el Ejemplo 19. La secuencia de ADN que codifica la celulasa 20 K de *Melanocarpus albomyces* se muestra en la Figura 19. La secuencia es de 936 pb de longitud, y tiene una fase de lectura abierta (ORF) que codifica 235 aminoácidos; el gen tiene dos intrones. El sitio de procesamiento del péptido señal putativo está después de la alanina-21, y el extremo N de la proteína madura comienza en alanina-22, como lo sugieren los resultados de la secuenciación de péptidos (Figura 17, péptido N° 429). La ORF predice una proteína con un peso molecular de 25,0 kDa para la preproteína de longitud completa, y de 22,9 kDa para la proteína madura. Esto coincide bien con los resultados obtenidos a partir del trabajo de purificación de proteínas (Ejemplo 10). Estos resultados también verifican que la proteína de aproximadamente 35 kDa detectada previamente con el antisuero de celulasa 20 K (Ejemplo 10) es un producto génico diferente a la celulasa 20 K.

La celulasa 20 K de *Melanocarpus albomyces* parece pertenecer a la familia K de celulasas y a la familia 45 de glicosil hidrolasas (Henrissat y Bairoch, *Biochem. J.* 293:781-788 (1993)). La celulasa 20 K muestra homología (aproximadamente 76 % se identifica en el solapamiento de 235 aminoácidos) hacia la endoglucanasa V de *Humicola insolens* (EMBL: a23635), pero la celulasa 20 K tiene la característica sorprendente de que no alberga el dominio de unión a celulosa (CBD) ni su enlazador, que son característicos de la endoglucanasa V de *Humicola insolens* y otras endoglucanasas relacionadas (Schülein *et al*, 1993, en: Suominen y Reinikainen (editores), "Foundation for Biotechnical and Industrial Fermentation Research", Helsinki, vol. 8, 109; Saloheimo *et al.*, 1994, *Mol. Microbiol.* 13, 219). Esta característica de la celulasa 20 K puede explicar el excelente rendimiento de la enzima en los experimentos de biolavado a la piedra (Ejemplo 10).

Ejemplo 21

Amplificación, clonación y secuenciación de DNA de celulasa 50 K con cebadores degenerados

Los péptidos derivados de la celulasa 50 K (Tabla IX) comparten alguna homología hacia la endoglucanasa I de *Humicola grisea* (DDBJ: D63516). Para amplificar el gen de celulasa 50 K mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se sintetizó un par de cebadores degenerados basados en las secuencias de péptidos (Tabla IX). El cebador 1 (507-128) se obtuvo de los aminoácidos N° 5-10 del péptido N° 507 (Tabla IX), y el cebador 2 (509-rev) se diseñó como la cadena antisentido para los aminoácidos N° 4-9 del péptido 509 (Tabla IX). El orden de los dos péptidos en la proteína (y la naturaleza sentido-antisentido correspondiente de los cebadores) se dedujo de la comparación con la endoglucanasa I de *Humicola grisea*.

Cebador 1 (507-128)

5' - GA(C/T) GA(A/G) AC(A/C/G/T) GA(A/G) CA(C/T) (A/C)G
 D E T E H R

Cebador 2 (509-rev)

5' -TA (A/C/G/T)GC (A/C/G/T)CC (A/C/G/T)CC (A/C/G/T)GG (A/G)TT
 Y A G G P N

En la reacción de PCR, se usaron 1,5 µg del ADN genómico de ALKO4237 purificado (Ejemplo 18) como molde. Se usó ADN polimerasa Dynazyme (Finnzymes Ltd, Finlandia) de acuerdo con las instrucciones del proveedor.

ADN de molde	(0,3 µg/µl)	5	µl
Cebador 1	(0,5 µg/µl)	1	µl
Cebador 2	(0,5 µg/µl)	1	µl
dNTP	(2 mM)	5	µl
10 x tampón de PCR		10	µl
H ₂ O desionizada		79	µl
Dynazyme	(2 U/µl)	1	µl
Total		102	µl

La reacción de PCR se realizó en las siguientes condiciones:

Etapa 1	95 °C	5 min
Etapa 2	95 °C	1 min
Etapa 3	56 °C	1 min
Etapa 4	72 °C	1 min
Etapa 5	Pasar a la "etapa 2"	29 veces más
Etapa 6	72 °C	8 min
Etapa 7	4 °C	mantener

5 Se analizaron 10 µl de la mezcla de reacción por electroforesis en gel de agarosa, y se detectó una sola banda correspondiente a aproximadamente 160 pb de longitud. El resto del producto de PCR fue cargado para someterlo a electroforesis sobre gel de agarosa, y se extrajo la sección de agarosa que contenía el fragmento de ADN y se purificó mediante el método Magic PCR Preps (Promega, EE.UU.) de acuerdo con las instrucciones del proveedor.

10 Se ligó el fragmento aislado con plásmido pBluescript II SK+ (Stratagene, EE.UU.), que había sido digerido con endonucleasa EcoRV y ddT de cola según lo descrito en Holton y Graham (1990) *Nucl. Acids Res.* 19, 1156. Se transformaron células XL-Blue de *Escherichia coli* competentes (Stratagene, EE.UU.) con la mezcla de ligadura. Se aisló ADN de plásmido de algunas de las colonias resultantes mediante el método Magic Minipreps (Promega, EE.UU.) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Se analizó el ADN del plásmido por electroforesis en agarosa, y un clon con las características esperadas se designó pALK1064.

15 Se secuenció el inserto (161 pb) en pALK1064 como se describe en el Ejemplo 19, y se encontró que contenía una ORF, que predijo un péptido homólogo a la endoglucanasa I de *Humicola grisea* (DDBJ: D63516). La ORF también codificaba el péptido N° 612 (Tabla IX) de la celulasa 50 K purificada. El ADN amplificado por PCR (además de los cebadores) corresponde a los nucleótidos 404-530 en la Figura 21.

20 La PCR con los cebadores 507 y 590-rev con el ADN cromosómico de ALKO4124 como molde (Ejemplo 19) produjo un fragmento del mismo tamaño que el producido a partir del ADN de ALKO4237. Esto sugiere que ALKO4124 de *Myriococcum* sp. tiene una proteína muy similar a la celulasa 50 K de ALKO4237 de *Melanocarpus albomyces*. Esto también se ve apoyado por el hecho de que las enzimas de ambas cepas dieron buenos resultados similares en los experimentos de biolavado a la piedra.

Ejemplo 22

Clonación y secuenciación de genes de celulasa 50 K ALKO4237 de *Melanocarpus albomyces*

25 Se preparó el banco genómico de ALKO4237 de *Melanocarpus albomyces* para la hibridación como se describe en el Ejemplo 20. Se marcó con digoxigenina el fragmento de PCR purificado que portaba parte del gen de celulasa 50 K (Ejemplo 21) de acuerdo con el manual "DIG DNA Labeling and Detection Nonradioactive, Application Manual". Se realizó la hibridación a 68 °C. Se recogieron los clones positivos en tampón SM/cloroformo, y se purificaron con una segunda serie de detección.

30 En dichas condiciones, se encontraron 10 clones positivos. Se realizó el aislamiento de ADN de bacteriófago lambda a gran escala a partir de los clones de acuerdo con Sambrook *et al*, 1989. Los ADN de fago se analizaron por

5 digestión del ADN con varias enzimas de restricción, y el ADN digerido se hibridó con la sonda de PCR específica de la celulasa 50 K. Se aislaron cuatro fragmentos de hibridación: fragmento e *SacI-XhoI* de aproximadamente 2,8 kb, fragmento *SacI* de aproximadamente 5 kb, fragmento *XhoI* de aproximadamente 3,2 kb y fragmento *EcoRI* de aproximadamente 2 kb. Se insertaron dichos fragmentos en vector pBluescript II SK+ cortado de forma similar (Stratagene, EE.UU.), creando los plásmidos pALK1234, pALK1233, pALK1226 y pALK1227, respectivamente (Figura 20).

Se secuenció el ADN de ALKO4237 de *Melanocarpus albomyces* a partir de los plásmidos específicos de la celulasa 50 K mencionados anteriormente. El protocolo de secuenciación se ha descrito en el Ejemplo 19.

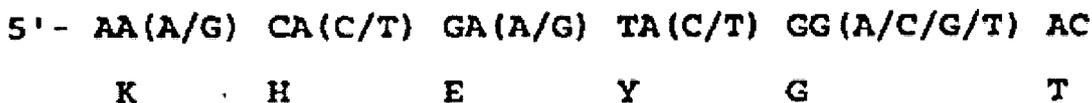
10 El ADN que codifica la celulasa 50 K de *Melanocarpus albomyces* se muestra en la Figura 21 (A y B). La secuencia revela una ORF de aproximadamente 1.363 pb de longitud, interrumpida por un intrón. La ORF codifica 428 aminoácidos. La proteína predicha tiene un peso molecular de 46,8 kDa y, tras la escisión del péptido señal, de 44,8 kDa. Todos los péptidos de la Tabla IX se encuentran en la secuencia de proteína predicha (Figura 2), aunque algunos aminoácidos identificados con incertidumbre durante la secuenciación de péptidos resultaron ser incorrectos. La proteína presenta homología con la endoglucanasa I de *Humicola grisea* (DDBJ:D63516).

15 **Ejemplo 23**

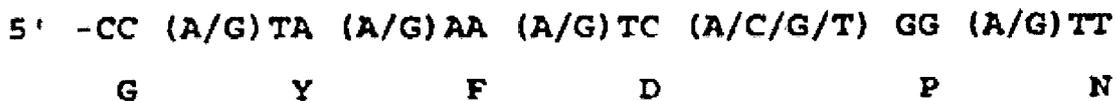
Amplificación, clonación y secuenciación de DNA de la celulasa B 50 K con cebadores degenerados (no forma parte de la invención reivindicada)

20 Los péptidos derivados de la celulasa B 50 K (Tabla X) comparten cierta homología con la celobiohidrolasa I de *Humicola grisea* (DDBJ:D63515). Para amplificar el gen de celulasa B 50 K mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se sintetizó un par de cebadores degenerados basados en las secuencias de péptidos (Tabla X). El cebador 1 (636) se obtuvo de los aminoácidos N° 1-5 del péptido N° 636 (Tabla X) (se supuso que el primer aminoácido era lisina, porque este péptido se aisló tras la digestión con una proteasa que se escinde detrás de las lisinas) y el cebador 2 (534-rev) se diseñó como la cadena antisentido para los aminoácidos N° 3-8 del péptido N° 534 (Tabla X). El orden de los dos péptidos en la proteína (y la naturaleza sentido-antisentido correspondiente de los
25 cebadores) se dedujo de la comparación con la endoglucanasa I de *Humicola grisea*.

Cebador 1 (636)



Cebador 2 (534-rev)



30 En la reacción de PCR, se usaron 1,5 µg del ADN genómico de ALKO4237 purificado (Ejemplo 18) como molde. Se usó ADN polimerasa Dynazyme (Finnzymes Ltd, Finlandia) de acuerdo con las instrucciones del proveedor.

ADN de molde	(0,3 µg/µl)	5	µl
Cebador 1	(0,3 µg/µl)	1,7	µl
Cebador 2	(0,3 µg/µl)	1,7	µl
dNTP	(2 mM)	5	µl
10 x tampón de PCR		10	µl
H ₂ O desionizada		80	µl
Dynazyme	(2 U/µl)	1	µl
Total		104,4	µl

La reacción de PCR se realizó en las siguientes condiciones:

Etapa 1	95 °C	5 min
Etapa 2	95 °C	1 min
Etapa 3	48 °C	1 min
Etapa 4	72 °C	2 min
Etapa 5	Pasar a la "etapa 2"	34 veces más
Etapa 6	72 °C	8 min
Etapa 7	4 °C	mantener

5 Se analizaron veinte μ l de la mezcla de reacción por electroforesis en gel de agarosa, y se detectaron unas cuantas bandas. Una de las bandas tenía un tamaño aparente de 700 pb, tamaño que coincidía con el tamaño que cabía esperar al compararlo con el gen de celobiohidrolasa de *grisea Humicola*, en particular, si el fragmento contenía uno o más intrones. Se purificaron los productos de PCR mediante el método Magic PCR Preps (Promega, EE.UU.) de acuerdo con las instrucciones del proveedor.

10 Se ligó el fragmento aislado con plásmido pBluescript II SK+ (Stratagene, EE.UU.), que había sido digerido con endonucleasa *EcoRV* y *ddT* de cola según lo descrito en Holton y Graham (1990) *Nucl. Acids Res.* 19, 1156. Se transformaron células XL-Blue de *Escherichia coli* competentes (Stratagene, EE.UU.) con la mezcla de ligadura. Se aisló ADN de plásmido de algunas de las colonias resultantes mediante el método Magic Minipreps (Promega, EE.UU.) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Se analizó el ADN del plásmido por electroforesis en agarosa, y un clon con inserto de aproximadamente 700 pb se designó pALK1224.

15 Se secuenció el inserto en pALK1224 como se describe en el Ejemplo 19, y se encontró que contenía una ORF que codificaba todo el péptido N° 636 de la celulasa B 50 K (Tabla X). La ORF predijo un péptido homólogo a la celobiohidrolasa I de *Humicola grisea* (DDBJ: D63515). El ADN amplificado por PCR (además de los cebadores) corresponde a los nucleótidos 371-1023 de la Figura 23.

Ejemplo 24

Clonación y secuenciación del gen de celulasa B 50 K ALKO4237 de *Melanocarpus albomyces* (no forma parte de la invención reivindicada)

20 Se preparó el banco genómico de ALKO4237 de *Melanocarpus albomyces* para la hibridación como se describe en el Ejemplo 20. Se retiró el inserto de pALK1224 por digestión del plásmido con las endoglucanasas de restricción *EcoRI* y *HindIII*. Se procesó el ADN plásmido digerido por electroforesis en agarosa. Se escindió la sección de agarosa que contenía el fragmento de ADN de aproximadamente 700 pb y se purificó mediante el método Magic PCR Preps (Promega, EE.UU.) de acuerdo con las instrucciones del proveedor.

25 Se marcó el fragmento de PCR purificado de pALK1224 que portaba parte del gen de la celulasa B 50 K (Ejemplo 23) con digoxigenina de acuerdo con el manual "DIG DNA Labeling and Detection Nonradioactive, Application Manual". Se realizó la hibridación a 68 °C. Se recogieron los clones positivos en tampón SM/cloroforno, y se purificaron con una segunda serie de detección.

30 En dichas condiciones, se encontraron 3 clones positivos. Se realizó el aislamiento de ADN de bacteriófago lambda a gran escala a partir de los clones de acuerdo con Sambrook *et al*, en "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989. Los ADN de fago se analizaron por digestión del ADN con varias enzimas de restricción, y el ADN digerido se hibridó con la sonda de PCR específica de la celulasa B 50 K. Se aisló un fragmento *NotI* de 3,5 kb de hibridación, y se insertó en vector pBluescript II SK+ cortado de forma similar (Stratagene, EE.UU.), creando el plásmido pALK1229 (Figura 22).

35 El extremo 5' del gen se encontró por hibridación de los ADN de fago con el fragmento *NotI-PstI* de 0,2 kb de pALK1229. Se aisló un fragmento de hibridación *PstI* de 2,4 kb y se insertó en vector pBluescript II SK+ cortado de forma similar (Stratagene, EE.UU.), creando el plásmido pALK1236 (Figura 22).

40 Se secuenció parte de los insertos de pALK1229 y pALK1236 como se describe en el Ejemplo 19. El ADN que codificaba la celulasa B 50 K de *Melanocarpus albomyces* se muestra en la Figura 23 (A y B). La secuencia revela una ORF de 1.734 pb de longitud interrumpida por cinco intrones. La ORF codifica 452 aminoácidos. La proteína predicha tiene un peso molecular de 49,9 kDa y, tras la escisión del péptido señal, de 47,6 kDa. Todos los péptidos de la Tabla X se encuentran en la secuencia de proteína predicha (Figuras 23A y B), aunque algunos aminoácidos identificados con incertidumbre durante la secuenciación peptídica resultaron ser incorrectos. La proteína predicha presenta homología con la celobiohidrolasa I de *Humicola grisea* (DDBJ:D63515) y otras celobiohidrolasas. Sin

embargo, la celulasa B 50 K tiene la característica sorprendente de que no alberga el dominio de unión a celulosa (CBD) ni su enlazador, que es característica de la celobiohidrolasa I de *Humicola grisea* y muchas otras celobiohidrolasas.

Ejemplo 25

5 Detección de biblioteca genómica de ALKO4237 de *Melanocarpus albomyces* con genes de celulasas de *Trichoderma reesei*

Se preparó el banco genómico de ALKO4237 de *Melanocarpus albomyces* para la hibridación como se describe en el Ejemplo 20.

10 Se aisló un fragmento de ADN que portaba ADN específico de *cbh1* de *Trichoderma reesei* cortando el plásmido pTTc01 (Figura 24) con la endonucleasa de restricción *HincII*, y aislando el fragmento de aproximadamente 1,6 kb del gel de agarosa tras la electroforesis. Se aisló un fragmento de ADN que portaba ADN específico de *egl2* de *Trichoderma reesei* cortando el plásmido pMS2 (Figura 25) con las endonucleasas de restricción *BamHI* y *EcoRI*, y aislando el fragmento de aproximadamente 1,5 kb del gel de agarosa tras la electroforesis. La clonación del gen *cbh1* se describe en Teeri *et al.*, *Bio/Technology* 1:696-699 (1983) y la secuencia de ADN se describe en Shoemaker *et al.*, *Bio/Technology* 1:691-696 (1983). El gen *egl2* (originalmente denominado "*egl3*") se describe en Saloheimo *et al.*, *Gene* 63: 11-21 (1988).

Se marcaron los fragmentos con digoxigenina de acuerdo con Boehringer, manual "DIG DNA Labeling and Detection Nonradioactive, Application Manual". Se realizó la hibridación a 68 °C con la sonda *cbh1* y a 60 °C con la sonda *egl2*. Se recogieron los clones positivos en tampón SM/cloroformo, y se purificaron con una segunda serie de detección.

20 En dichas condiciones, se encontraron 13 clones positivos en *cbh1* y 6 clones positivos en *egl2*. Se hibridó un clon a ambas sondas. Se aisló el ADN de lambda de los clones como se ha descrito anteriormente. Se analizaron los ADN de fago por digestión del ADN con varias enzimas de restricción, y se hibridó el ADN digerido con las sondas de *cbh1* y *egl2*. Los clones también se hibridaron con el fragmento de PCR específico de la celulasa 20 K (Ejemplo 19). Un clon (lambda-16) fue claramente positivo, y otros dos clones (lambda-8/1 y lambda-5/2) fueron débilmente positivos; todos estos clones se recogieron originalmente con la sonda de *cbh1*.

Se aisló un fragmento *EcoRI* de aproximadamente 4 kb de lambda-16, que se hibridó tanto a la sonda de *cbh1* de *Trichoderma reesei* y como al fragmento de PCR específico de la celulasa 20 K, del gel de agarosa tras la electroforesis, y se insertó en pBluescript II SK+ cortado de manera similar. El plásmido resultante se denominó pALK1230 (Figura 26).

30 Se secuenció parte del inserto de pALK1230 como se describe en el Ejemplo 19. El ADN no parece codificar la celulasa 20 K, pero codifica una proteína homóloga a varias celulasas, especialmente en la zona del dominio de unión a celulosa (CBD). Así pues, el producto génico muy probablemente tiene una alta afinidad hacia el material celulósico y, por lo tanto, dicho producto génico fue designado proteína con CBD. La secuencia se muestra en la Figura 27.

35 Se realizaron las reacciones de PCR con los cebadores 636 y 534-rev (Ejemplo 23) con el ADN de los 19 clones lambda como moldes. Un clon lambda, el lambda-3, dio una banda de aproximadamente 700 pb de tamaño, similar a la del Ejemplo 23 cuando se usó ADN cromosómico de ALKO4237 como molde. Dicho clon originalmente había sido recogido por la sonda de *cbh1* de *Trichoderma*. Se digirió el ADN lambda con varias endonucleasas de restricción, y se hibridó con la sonda específica de la celulasa B 50 K. El clon mostró un patrón de enzimas de restricción similar a los 3 clones del Ejemplo 24. Se concluye que lambda-3 también porta el gen de la celulasa B 50 K.

Ejemplo 26

Proteínas de fusión (no forman parte de la invención reivindicada)

45 Se prepara un vector recombinante que codifica la celulasa 20 K, la celulasa 50K o la celulasa B 50 K mediante la fusión de la secuencia que codifica la celulasa con la secuencia de la celulasa o hemicelulasa de *Trichoderma reesei* o al menos un dominio funcional de dicha celulasa o hemicelulasa, como se describe en la patente de EE.UU. N° 5.298.405, en el documento WO 93/24621 y en el informe del GenBank L25310, incorporados en el presente documento por referencia. Especialmente, la enzima se selecciona del grupo que consiste en CBHI, CBHII, EGI, EGII, XYLI, XYLII y MANI, o un dominio de las mismas, tal como la señal de secreción o la secuencia del núcleo.

50 Se pueden construir proteínas de fusión que contengan una mananasa N-terminal, o el dominio del núcleo de celobiohidrolasa o endoglucanasa, o el dominio del núcleo y bisagra de las mismas, fusionados a una de las secuencias de la celulasa de *Melanocarpus*. El resultado es una proteína que contiene una mananasa N-terminal o regiones del núcleo, o regiones del núcleo y bisagra de celobiohidrolasa o endoglucanasa, y una celulasa de *Melanocarpus* C-terminal. La proteína de fusión contiene tanto la mananasa o celobiohidrolasa o endoglucanasa de *Trichoderma*, como las actividades de celulasa de *Melanocarpus* de los diversos dominios, como se proporcionan en

la construcción de fusión. Como alternativa, en las construcciones se pueden incluir mutaciones que modifiquen las actividades de la mananasa o celobiohidrolasa o endoglucanasa de *Trichoderma*, o las actividades de celulasa de *Melanocarpus*. En este caso, las proteínas de fusión contienen tanto la actividad de la enzima *Trichoderma* modificada como la actividad de celulasa de *Melanocarpus* de los diversos dominios según lo dispuesto en la construcción de fusión.

También se pueden construir proteínas de fusión de manera que se coloque la cola de la mananasa o celobiohidrolasa o endoglucanasa o un fragmento deseado de las mismas, antes de una de las secuencias de celulasa de *Melanocarpus*, especialmente con el fin de permitir el uso de un sitio de proteasa inespecífico en la cola como sitio de proteasa para la recuperación de la parte celulasa de *Melanocarpus* a partir de la proteína de fusión expresada. Como alternativa, se pueden construir proteínas de fusión para que proporcionen un sitio de proteasa en un enlazador sintético que se coloque antes de una de las celulasas de *Melanocarpus*, con o sin las secuencias de la cola.

Ejemplo 27

Hospedadores

Se prepara la construcción recombinante que codifica las proteínas de fusión deseadas o las proteínas de *Melanocarpus* como se ha descrito anteriormente, y se transforma en un hongo filamentoso tal como *Aspergillus* sp., preferentemente *Trichoderma* sp.

Ejemplo 28

Fondo de *Trichoderma* para la producción de celulasa 20 K

En el presente ejemplo, se describen experimentos de lavado a la piedra para determinar el fondo más adecuado de las celulasas de *Trichoderma* para la producción de celulasa 20 K. El fin de dichos experimentos era determinar qué celulasas de *Trichoderma* producirían retrotinción en el lavado a la piedra en condiciones neutras.

Se seleccionó la cepa ALKO3620 de *Trichoderma reesei* (el gen de la endoglucanasa 2 está eliminado) como hospedador de dichos experimentos. En estudios previos, se ha demostrado que la enzima EGII (endoglucanasa II) de *Trichoderma* tiene efectos perjudiciales en las estructuras de las fibras de algodón y, por lo tanto, debilita las propiedades de resistencia de los tejidos que contienen algodón (En: Proceedings of the TIWC96 Conference, 1996, Vol I (2), pág 197).

Los experimentos de lavado a la piedra se realizaron a pH 6,5 y 7 como se describe en el Ejemplo 3, a excepción de que no se usó Berol.

Las preparaciones de celulasa de *Trichoderma* ensayadas fueron:

ALKO3133 (*egl2* y *cbh1* eliminados)

ALKO3269 (*egl2* y *cbh1* eliminados)

ALKO3268 (*egl2* y *cbh1* eliminados).

La dosis de las preparaciones de *Trichoderma* fue de aproximadamente 2,5 mg (= dosis baja, L) o de aproximadamente 5 mg (=dosis alta, H) de proteína total por g de tejido. Se usaron 0,4 mg de celulasa 20 K purificada por g de tejido cuando fue necesario.

Los resultados de las mediciones del color de los tejidos de tela vaquera tratados se muestran en la Tabla XIX.

Los resultados del lavado a la piedra muestran que el fondo de ALKO3269 (*egl2* y *egl1* eliminados) provoca menos retrotinción en condiciones neutras que el fondo de ALKO3268 (*egl2* y *cbh1* eliminados) o ALKO3133 (*egl2* y *cbh2* eliminados). Así pues, el hospedador preferido para la producción de celulasa 20 K para el biolavado a la piedra es una cepa de tipo ALKO3269. Aunque con concentraciones de celulasa 20 K mayores, el fondo de *Trichoderma* probablemente haya tenido muy escasa importancia. Un fondo de tipo ALKO3269 es probablemente tan bueno para la producción de celulasa 50 K y celulasa B 50 K para el biolavado a la piedra como lo es para la producción de celulasa 20 K.

45

Tabla XIX. Mediciones del color de tejidos de tela vaquera tratados con diferentes preparaciones de celulasa de *Trichoderma* con (+) o sin (-) celulasa 20 K

Preparación/ dosis	20 K +/-	pH	Lado derecho		ΔE	Lado del revés		ΔE
			L	b		L	b	
-	-	6,5	2,2	1,1	3,1	0,7	0,1	1,4
ALKO3620/L	-	6,5	2,2	2,6	3,0	-0,7	2,6	2,9
ALKO3620/L	+	6,5	5,5	4,0	7,7	-1,3	5,0	5,5
ALKO3133/L	-	6,5	1,9	2,2	3,7	0,2	1,6	2,3
ALKO3133/H	-	6,5	4,2	1,9	4,5	-1,5	3,3	4,8
ALKO3133/L	+	6,5	5,7	4,3	7,8	0,3	4,5	5,0
ALKO3133/H	+	6,5	8,5	4,0	9,4	-1,4	5,9	7,8
ALKO3269/L	-	6,5	2,9	1,9	4,4	0,8	0,8	1,6
ALKO3269/H	-	6,5	4,3	1,5	4,5	0,6	1,3	2,6
ALKO3269/L	+	6,5	6,6	4,2	8,7	1,1	4,0	4,3
ALKO3269/H	+	6,5	7,9	3,9	8,5	0,7	3,7	5,1
ALKO3268/L	-	6,5	2,9	1,7	3,7	0,1	1,8	3,0
ALKO3268/H	-	6,5	4,2	2,0	4,3	-0,7	3,4	5,0
ALKO3268/L	+	6,5	5,9	3,2	7,7	-1,2	4,5	6,0
ALKO3268/H	+	6,5	7,1	3,7	7,7	-2,0	5,8	7,3
-	-	7,0	2,9	0,8	2,6	0,7	0,5	1,5
ALKO3620/L	-	7,0	3,3	1,2	1,9	1,7	0,3	1,1
ALKO3620/L	+	7,0	6,7	3,4	5,6	1,1	3,2	2,9
ALKO3133/L	-	7,0	3,2	1,0	1,4	0,6	0,6	0,9
ALKO3133/L	+	7,0	5,9	3,7	5,5	0,1	4,3	3,1
ALKO3269/L	-	7,0	3,6	1,2	2,2	1,3	-0,3	1,3
ALKO3269/L	+	7,0	6,4	3,4	5,9	1,2	3,2	2,8
ALKO3268/L	-	7,0	2,9	1,4	3,9	0,5	0,4	2,5
ALKO3268/L	+	7,0	8,4	3,1	9,6	1,1	3,5	4,6

Ejemplo 29

Producción de celulasa 20 K ALKO4237 de *Melanocarpus albomyces* en *T. reesei*

- 5 Se construyeron las cepas de *Trichoderma reesei* para la producción de celulasa 20 K ALKO4237 de *Melanocarpus albomyces*. Las cepas producen celulasa 20 K de *Melanocarpus*, y son incapaces de producir endoglucanasa II y celobiohidrolasa I o endoglucanasa I de *T. reesei*. Dichas preparaciones deficientes en actividad celulolítica de *Trichoderma* y la realización de las mismas mediante métodos de ADN recombinante se describen en el documento US 5.298.405 o en Suominen *et al.* (1993), "High frequency one-step gene replacement in *Trichoderma reesei*. II. Effects of deletions of individual cellulase genes". *Mol. Gen. Genet.* 241: 523, incorporados en el presente documento por referencia.

15 En la construcción de las cepas productoras de celulasa 20 K de *Melanocarpus albomyces*, la cepa parental de *Trichoderma reesei* ALKO3620 se transformó con los casetes de expresión del plásmido pALK1231 o pALK1235 (Figuras 28 y 29). En los casetes, la celulasa 20 K se expresa a partir del promotor potente de *cbh1*. La integración de los casetes de expresión produjo los reemplazos de los genes parentales *cbh1* (pALK1231) o *egl1* (pALK1235).

En la cepa hospedadora ALKO3620, el gen *egl2* se ha reemplazado por el fragmento de 3,3 kb *XbaI-BglII* del gen *ble* de *Streptoalloteichus hindustanus* (Mattern *et al.* ((1988), "A vector of *Aspergillus* transformation conferring phleomycin resistance". *Fungal Genet. Newslett.* 35: 25.; Drocourt *et al.* (1990) "Cassettes of the *Streptoalloteichus hindustanus ble* gene for transformation of lower and higher eukaryotes to phleomycin resistance". *Nucl. Acids Res.* 18: 4009) usando los métodos de ADN recombinante descritos en el documento US 5.298.405, incorporada en el presente documento por referencia.

Los plásmidos pALK1231 y pALK1235 que se usaron en la construcción de las cepas productoras de celulasa de *Melanocarpus* son idénticos entre sí con respecto al promotor de *cbh1*, gen de la celulasa 20 K y el terminador de *cbh1* que se describen a continuación:

*promotor de *cbh1* (celobiohidrolasa 1) de *T. reesei*: el promotor es de VTT-D-80133 de *Trichoderma reesei* (Teeri *et al.* (1983) "The molecular cloning of the major cellulase gene from *Trichoderma reesei*". *Bio/Technology* 1: 696). En la construcción, se usó el fragmento *EcoRI-SacII* de 2,2 kb (Karhunen *et al.* (1993) "High frequency one-step gene replacement in *Trichoderma reesei*. I. Endoglucanase I overproduction". *Mol. Gen. Genet.* 241: 515). La secuencia de la zona del promotor que precede a ATG fue publicada por Shoemaker *et al.* (1983) "Molecular cloning of exo-cellobiohydrolase from *Trichoderma reesei* strain L27". *Bio/Technology* 1. 691). Los últimos 15 nucleótidos del promotor de *cbh1* L27 de *T. reesei* (el sitio de *SacII* está subrayado) son CCGCGGACTGGCATC (Shoemaker *et al.* 1983). Se ha secuenciado el promotor de *cbh1* de la cepa VTT-D-80133 de *Trichoderma reesei* en Alko Research Laboratories, y se ha observado una diferencia de un nucleótido en la secuencia de ADN de dentro de la región mencionada anteriormente. En la cepa VTT-D-80133 de *T. reesei*, la secuencia que precede a ATG es CCGCGGACTG/C/GCATC (El sitio de *SacII* está subrayado, la citosina adicional en la secuencia de ADN está entre barras).

Se añadieron los nucleótidos que faltaban del promotor (10 pb detrás de *SacII* hasta el ATG), y se realizó la fusión del promotor exacto con el primer ATG de la celulasa 20 K de *Melanocarpus* (véase más adelante) usando el método de PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Se secuenciaron la fusión y el fragmento de PCR para garantizar que no se habían producido errores en la reacción. En pALK1231, la zona promotor también está funcionando como un ADN homólogo (junto con el fragmento 3' de *cbh1*; véase más adelante) para dirigir la integración del ADN transformante hacia el locus de *cbh1*.

*Gen de la celulasa 20 K de *Melanocarpus albomyces*: la secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos deducida del gen de la celulasa 20 K que codifica una celulasa de 20 kDa se presenta en el Ejemplo 20 (Figura 19). Se usó un fragmento de 0,9 kb que partía del codón ATG en ambos plásmidos.

*Terminador de *cbh1* de *T. reesei*: se añadió el fragmento *AvaI* de 739 pb (Kaihunen *et al.* (1993) "High frequency one-step gene replacement in *Trichoderma reesei*. I. Endoglucanase I overproduction". *Mol. Gen. Genet.* 241: 515) a partir de 113 pb antes del codón de TERMINACIÓN del gen *cbh1* detrás del gen de la celulasa 20 K para garantizar la terminación de la transcripción.

Además del material descrito anteriormente, el plásmido pALK1231 contiene:

*Gen *amdS*: el gen se ha aislado de VH1-TRSX6 de *Aspergillus nidulans* y se codifica para acetamidasa (Hynes *et al.* (1983), "Isolation of genomic clones containing the *amdS* gene of *Aspergillus nidulans* and their use in the analysis of the structural and regulatory mutations". *Mol. Cell. Biol.* 3: 1430). La acetamidasa permite desarrollarse a la cepa usando acetamida como la única fuente de nitrógeno, y estas características se han usado para la selección de los transformantes. En los plásmidos, se usa el fragmento de 3,1 kb (*SpeI-XbaI*) del plásmido p3SR2 (Kelly J. y Hynes M. (1985) "Transformation of *Aspergillus niger* by the *amdS* gene of *Aspergillus nidulans*". *EMBO J.* 4:475). El fragmento contiene 1.007 pb de la zona del promotor, 1.897 pb de la región codificante (intrones incluidos) y la zona del terminador de 183 pb del gen *amdS*.

*Fragmento 3' de *cbh1*: el fragmento se aisló de ALKO2466 de *T. reesei* usando el rescate del plásmido (1,7 kb, *BamHI-EcoRI*, comenzando 1,4 kb después de la TERMINACIÓN del gen, Suominen *et al.* (1993) "High frequency one-step gene replacement in *Trichoderma reesei*. II. Effects of deletions of individual cellulase genes". *Mol. Gen. Genet.* 241:523). La cepa ALKO2466 deriva de la cepa ALKO233 (Harkki *et al.* (1991), "Genetic engineering of *Trichoderma* to produce strains with novel cellulase profiles". *Enzyme Microb. Technol.* 13: 227). El fragmento 3' se usa junto con la zona del promotor para dirigir el gen de la celulasa 20 K hacia el locus *cbh1* mediante recombinación homóloga.

El plásmido pALK1235 contiene:

*Gen *hph*: el gen que codifica la HmB fosfotransferasa se aisló originalmente a partir de K-12 JM109 de *E. coli* (Yanish-Perron *et al.* (1985) "Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mpl8 and pUC19 vectors". *Gene* 33: 103) y confiere resistencia a la higromicina B (HmB). La resistencia a la higromicina (inactivada por fosforilación mediante la HmB fosfotransferasa) se usó para la selección de los transformantes. El gen *hph* junto con el promotor de *pki* y el terminador de *cbh2* (véase más adelante) se aísla del plásmido pRLM_{ex}30 (Mach *et al.* "Transformation of *Trichoderma reesei* based on hygromycin B resistance using homologous expression signals". *Curr. Genet.* 25: 567) como un fragmento *NotI-PvuII* de 2,2 kb.

*Promotor de *pki*: el promotor de *pki* de aproximadamente 0,75 kb (piruvato quinasa) para la expresión de *hph* se ha sintetizado por PCR usando ADN de QM9414 de *T. reesei* como molde (Schindler *et al.* (1993) "Characterization of the pyruvate kinase-encoding gene (*pki*) of *Trichoderma reesei*". *Gene* 130:271).

5 *Terminador de *cbh2*: la secuencia del terminador de *cbh2* se inicia inmediatamente después del codón de TERMINACIÓN del gen *cbh2* (hasta el sitio *PvuII* de 0,5 kb del codón de TERMINACIÓN; Mach *et al.* (1994) "Transformation of *Trichoderma reesei* based on hygromycin B resistance using homologous expression signals". *Curr. Genet.* 25: 567) y se origina a partir del plásmido pRLM_{ex}30.

10 *Fragmento 5' de *egl1*: el fragmento 5' de *egl1* de 1,8 kb (*Scal-StuI*) se ha aislado de QM 6a de *T. reesei* (Mandels y Reese (1957) "Induction of cellulase in *Trichoderma viridae* as influenced by carbon sources and metals". *J. Bacteriol.* 73: 269). Este fragmento se encuentra aproximadamente 1,35 kb cadena arriba de la región codificante de *egl1*, y se usó para dirigir la integración del ADN de transformación hacia el locus de *egl1*.

* Fragmento 3' de *egl1*: el fragmento 3' de *egl1* de 1,6 kb (*Scal-XhoI*) se aisló, como el fragmento 5', de QM 6a de *T. reesei*. El fragmento está situado 0,3 kb cadena abajo del extremo del gen *egl1*, y se usó para la dirección del ADN de transformación hacia el locus de *egl1*.

15 En la construcción de los vectores, se usaron los métodos de ADN habituales descritos por Sambrook *et al.* en "Molecular cloning: a laboratory manual", II edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. Las enzimas de restricción, ADN ligasa de T4, el fragmento de Klenow de la ADN polimerasa I, ADN polimerasa de T4, la polinucleótido quinasa y la Taq polimerasa se adquirieron en Boehringer Mannheim, Alemania) y New England Biolabs (EE.UU.). Todas las enzimas se usaron de acuerdo con las instrucciones del proveedor. El ADN del plásmido se aisló usando columnas Qiagen (Qiagen GmbH, Alemania) o Promega Magic Minipreps (Promega, EE.UU.) de acuerdo con los protocolos del fabricante. Los oligonucleótidos usados en las reacciones de PCR y en las reacciones de secuenciación fueron sintetizados por un sintetizador de ADN ABI (Applied Biosystems, EE.UU.) 381A. La secuenciación del ADN se realizó como se describe en el Ejemplo 19.

25 Los fragmentos de ADN para la clonación o las transformaciones se aislaron de geles de agarosa de bajo punto de fusión (FMC Bioproducts, EE.UU.) mediante el tratamiento con β -agarasa I (New England Biolabs, EE.UU.) o mediante el uso del kit de extracción en gel QIAEX (Qiagen GmbH, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del proveedor.

30 ALKO3620 de *T. reesei* se transformó según lo descrito por Penttilä *et al.* (1987), "A versatile transformation system for the cellulolytic filamentous fungus *Trichoderma reesei*". *Gene* 61:155) con las modificaciones descritas en Karhunen *et al.* (1993) "High frequency one-step gene replacement in *Trichoderma reesei*. I. Endoglucanase I overproduction". *Mol. Gen. Genet.* 241: 515). Se transfirieron los transformantes de *T. reesei* a un medio selectivo y se purificaron a través de los conidios. Los transformantes se estabilizaron mediante su cultivo en medios inclinados selectivos para dos generaciones antes de la esporulación en agar de dextrosa de patata.

Ejemplo 30

35 **Características de los transformantes productores de celulasa 20 K ALKO4237 de *Melanocarpus albomyces***

Se cultivaron los transformantes purificados en matraces agitadores en un medio que contenía suero de leche al 4 %, fuente de nitrógeno complejo al 1,5 % derivada de grano, KH_2PO_4 al 5 % y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 0,5 %. Los cultivos se cultivaron a 30 °C y 250 rpm durante 7 días.

40 Los sobrenadantes del cultivo se transfirieron directamente sobre filtros de nitrocelulosa mediante un aparato de transferencia puntual. Se detectó CBMH mediante inmunotinción usando un anticuerpo monoclonal específico de CBMI Cl-258 y EGI mediante el anticuerpo monoclonal específico de EI-2 (Aho *et al.* (1991) "Monoclonal antibodies against core and cellulose-binding domains of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolases I and II and endoglucanase I". *Eur. J. Biochem.* 200: 643) y el sistema AP de transferencia Western ProtoBlot (Promega, EE.UU.) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

45 Las cepas de *T. reesei* ALKO3620/pALK1231/14, ALKO3620/pALK1231/16, ALKO3620/pALK1231/20 y ALKO3620/pALK1231/59 no contienen el gen *cbh1*. El gen *cbh1* está sustituido por el gen marcador *amdS* y la construcción de celulasa 20 K en el casete de expresión pALK1235. El reemplazo del gen *cbh1* se verificó en hibridaciones Southern. Las cepas de *T. reesei* ALKO3620/pALK1235/40 y ALKO3620/pALK1235/49 no contienen el gen *egl1*. El gen *egl1* está reemplazado por el gen marcador *hph* y la construcción de celulasa 20 K en los casetes de expresión de pALK1235. El reemplazo del gen *egl1* se verificó en hibridaciones Southern. La cepa hospedadora ALKO3620 usada en las transformaciones es deficiente en el gen *egl2* (reemplazado por el gen *ble* de *Streptoaloteichus hindustanus* (Mattem *et al.*, 1988, Drocourt *et al.*, 1990). Así pues, las cepas no producen los componentes de celulasa EGI y CBHI o EGI de *Trichoderma*.

55 Se procesaron muestras de los sobrenadantes de los cultivos en placas de gel de poliacrilamida que contenían SDS al 0,1% en el sistema de electroforesis Mini Protean II de Bio-Rad (EE.UU.). Se usó el anticuerpo policlonal preparado contra la celulasa 20 K purificada para detectar la proteína producida en las transferencias Western. En la

detección, se usó el Sistema AP ProtoBlot® de Promega. El resultado de la transferencia se muestra en la Figura 30. Los transformantes ALKO3620/pALK1235/49, ALKO3620/pALK1235/40, ALKO3620/pALK1231/14 y ALKO3620/pALK1231/16 (calles 1, 2, 4 y 5) producen una proteína que reacciona con el antisuero policlonal de la celulasa 20 K. El tamaño de la proteína producida por los transformantes es igual al tamaño de la celulasa 20 K purificada (calle 6). ALKO3620 (calle 3) no produce la proteína correspondiente.

Las actividades de endoglucanasa de los transformantes se determinaron como se describe en el Ejemplo 10. Cuando se usó carboximetilcelulosa (CMC) al 2 % como sustrato, la temperatura de reacción se elevó hasta 70 °C y, por lo tanto, la actividad de endoglucanasa de ALKO3620 se inactivó por calor. Cuando se usó hidroxietilcelulosa al 1 % como sustrato, la inactivación por calor se realizó antes de las mediciones de la actividad enzimática. Se diluyeron las muestras de medio de crecimiento hasta HEPES 0,05 M, tampón a pH 7,0, y se incubaron durante 20 min a 70 °C. La inactivación por calor de la endoglucanasa I (la endoglucanasa principal que queda en ALKO3620) fue casi completa. La actividad de los transformantes negativos en *egl1* cayó aproximadamente 30 % en la inactivación por calor, lo que indica la inactivación por calor menor de la celulasa 20 K. Las actividades de endoglucanasa se presentan en la Tabla XX. Cuando HEC fue el sustrato, la actividad de celulasa 20 K se extrapoló con la actividad antes del tratamiento térmico dividiendo la actividad obtenida después del tratamiento térmico con 0,7.

Tabla XX. Actividades de endoglucanasa de transformantes de *T. reesei* que producen la celulasa 20 K de *Melanocarpus albomyces*

Sustrato	CMC 70 °C, pH 7,0	Actividad de la celulasa 20 K (unidades artificiales/ml)	
		HEC 50 °C, pH 7,0	
ALKO4237	-*	100**	
ALKO3620	50***	38***	
ALKO3620/pALK1231/14	2400	350	
ALKO3620/pALK1231/16	2600	350	
ALKO3620/pALK1231/20	6500	750	
ALKO3620/pALK1231/59	6800	750	
ALKO3620/pALK123 5/40	2400	325	
ALKO3620/pALK123 5/49	2100	350	

* sin medir

** sin activar térmicamente, también contiene celulasa 50 K, celulasa B 50 K y otras actividades de celulasas.

*** Actividad debida a las celulasas de *Trichoderma*.

Las actividades de endoglucanasa de la cepa hospedadora de *T. reesei* ALKO3620 son casi totalmente inactivadas por calor a 70 °C. Los transformantes productores de celulasa 20 K de *Melanocarpus albomyces* producen cantidades sustanciales de celulasa 20 K relativa estable al calor. El nivel de producción de endoglucanasa de los transformantes es varias veces superior al de la cepa parental de celulasa 20 K ALKO4237.

Ejemplo 31

Producción de celulasa 50 K ALKO4237 de *Melanocarpus albomyces* en *T. reesei*

Se construyeron las cepas de *Trichoderma reesei* para la producción de celulasa 50 K ALKO4237 de *Melanocarpus albomyces*. Las cepas producen celulasa 50 K de *Melanocarpus* y son incapaces de producir endoglucanasa II y celobiohidrolasa I o endoglucanasa I de *T. reesei*. En la construcción de las cepas productoras de la celulasa 50 K de *Melanocarpus albomyces*, se transformó la cepa parental ALKO3620 de *Trichoderma reesei* con los casetes de expresión del plásmido pALK1238 o pALK1240 (Fig. 31 y 32). En los casetes, la celulasa 50 K se expresa a partir del promotor potente de *cbh1*. La integración de los casetes de expresión produce los reemplazos de los genes parentales *cbh1* (pALK1238) o *egl1* (pALK1240). La clonación y la transformación se realizaron como se describe en el Ejemplo 29, excepto que el gen de la celulasa 20 K fue reemplazado por el gen de la celulasa 50 K (fragmento de 1,7 kb a partir del codón ATG) descrito en el Ejemplo 22. A continuación, se caracterizaron los transformantes productores de la celulasa 50 K de *Melanocarpus albomyces* de manera similar al Ejemplo 30 con las modificaciones obvias para el experto en la materia. Los transformantes productores de la celulasa B 50 K y la proteína con CBD de *Melanocarpus albomyces* se pueden crear de manera similar a los Ejemplos 29 y 30 con las modificaciones obvias para el experto en la materia.

Habiéndose descrito ahora la invención por completo, los expertos en la materia entenderán que la invención se puede llevar a cabo en un intervalo amplio y equivalente de condiciones, parámetros y similares, sin afectar al espíritu ni al alcance de la invención, ni a cualquier realización de la misma. Todas las referencias citadas en el presente documento se incorporan en su totalidad en el presente documento por referencia.

LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

5

(i) SOLICITANTE:

- (A) NOMBRE: Primalco Ltd
- (B) CALLE: Valta-akseli
- (C) CIUDAD: Rajamaki
- (E) PAIS: Finland
- (F) CÓDIGO POSTAL : 05200
- (G) TELEFONO: +358 9 13311
- (H) TELEFAX: +358 9 133 1236

10

15

(ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: NUEVAS CELULASAS, GENES QUE LAS CODIFICAN Y USOS DE LAS MISMAS

20

(iii) NUMBER DE SECUENCIAS: 37

(iv) FORMA LEGIBLE POR ORDENADOR:

- (A) TIPO DE MEDIO: Disquete
- (B) ORDENTADOR: Ordenador compatible con IBM
- (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Versión #1.30 (EPO)

25

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID NO:1:

30

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 30 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) TIPO DE CADENA:
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

35

(ii) TIPO MOLECULA: péptido

(vi) FUENTE ORIGINAL:

- (A) ORGANISMO: Melanocarpus albomyces
- (B) CADENA: ALKO4237

40

(ix) CARACTERÍSTICAS:

- (A) NOMBRE/CLAVE: Péptido
- (B) LOCALIZACIÓN: 1..30
- (D) INFORMACIÓN ADICIONAL: /etiqueta= NO_429

45

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO:1:

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

Gly Trp Arg Gly Lys Gly Pro Val Asn Gln Pro Val Tyr Ser
20 25 30

50

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID NO:2:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 7 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) TIPO DE CADENA:
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

55

60

(ii) TIPO MOLECULA: péptido

(vi) FUENTE ORIGINAL:

- (A) ORGANISMO: Melanocarpus albomyces
- (B) CADENA: ALKO4237

5 (ix) CARACTERÍSTICAS:
(A) NOMBRE/CLAVE: Péptido
(B) LOCALIZACIÓN:1..7
(D) INFORMACIÓN ADICIONAL:/etiqueta= NO_430

10 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO:2:

Tyr Gly Gly Ile Ser Ser Arg
1 5

15 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID NO:3:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
(A) LONGITUD: 4 aminoácidos
20 (B) TIPO: aminoácido
(C) TIPO DE CADENA:
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO MOLECULA: péptido

25 (vi) FUENTE ORIGINAL:
(A) ORGANISMO: Melanocarpus albomyces
(B) CADENA: ALKO4237

30 (ix) CARACTERÍSTICAS:
(A) NOMBRE/CLAVE: Péptido
(B) LOCALIZACIÓN:1..4
(D) INFORMACIÓN ADICIONAL:/etiqueta= NO_431

35 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO:3:

Cys Gly Trp Arg
1

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID NO:4:

40 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
(A) LONGITUD: 6 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
(C) TIPO DE CADENA:
45 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO MOLECULA: péptido

(vi) FUENTE ORIGINAL:
50 (A) ORGANISMO: Melanocarpus albomyces
(B) CADENA: ALKO4237

(ix) CARACTERÍSTICAS:
(A) NOMBRE/CLAVE: Péptido
55 (B) LOCALIZACIÓN:1..6
(D) INFORMACIÓN ADICIONAL:/etiqueta= NO_432

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO:4:

Pro Ser Cys Gly Trp Arg
60 **1 5**

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID NO:5:

- 5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 (A) LONGITUD: 6 aminoácidos
 (B) TIPO: aminoácido
 (C) TIPO DE CADENA:
 (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO MOLECULA: péptido
- 10 (vi) FUENTE ORIGINAL:
 (A) ORGANISMO: Melanocarpus albomyces
 (B) CADENA: ALKO4237
- 15 (ix) CARACTERÍSTICAS:
 (A) NOMBRE/CLAVE: Péptido
 (B) LOCALIZACIÓN:1..6
 (D) INFORMACIÓN ADICIONAL:/etiqueta= NO_433

20 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO:5:

Tyr Trp Asp Cys Cys Lys
1 5

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID NO:6:

- 25 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 (A) LONGITUD: 17 aminoácidos
 (B) TIPO: aminoácido
 (C) TIPO DE CADENA:
 (D) TOPOLOGÍA: lineal
- 30 (ii) TIPO MOLECULA: péptido
- (vi) FUENTE ORIGINAL:
 (A) ORGANISMO: Melanocarpus albomyces
 35 (B) CADENA: ALKO4237
- (ix) CARACTERÍSTICAS:
 (A) NOMBRE/CLAVE: Péptido
 (B) LOCALIZACIÓN:1..17
 40 (D) INFORMACIÓN ADICIONAL:/etiqueta= NO_439

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO:6:

Gln Glu Cys Asp Ser Phe Pro Glu Pro Leu Lys Pro Gly Cys Gln Trp
1 5 10 15

Arg

- 45 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID NO:7:
- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 50 (A) LONGITUD: 8 aminoácidos
 (B) TIPO: aminoácido
 (C) TIPO DE CADENA:
 (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO MOLECULA: péptido
- 55 (vi) FUENTE ORIGINAL:
 (A) ORGANISMO: Melanocarpus albomyces
 (B) CADENA: ALKO4237
- 60 (ix) CARACTERÍSTICAS:
 (A) NOMBRE/CLAVE: Péptido

(B) LOCALIZACIÓN:1..8
 (D) INFORMACIÓN ADICIONAL:/etiqueta= fr9

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO:7:

5
Arg His Asp Asp Gly Gly Phe Ala
1 5

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID NO:8:

10 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 (A) LONGITUD: 7 aminoácidos
 (B) TIPO: aminoácido
 (C) TIPO DE CADENA:
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

15 (ii) TIPO MOLECULA: péptido

(vi) FUENTE ORIGINAL:
 (A) ORGANISMO: Melanocarpus albomyces
 (B) CADENA: ALKO4237

(ix) CARACTERÍSTICAS:
 (A) NOMBRE/CLAVE: Péptido
 (B) LOCALIZACIÓN:1..7
 (D) INFORMACIÓN ADICIONAL:/etiqueta= fr14

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO:8:

30 **Tyr Trp Asp Cys Cys Lys Pro**
1 5

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID NO:9

35 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 (A) LONGITUD: 18 aminoácidos
 (B) TIPO: aminoácido
 (C) TIPO DE CADENA:
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

40 (ii) TIPO MOLECULA: péptido

(vi) FUENTE ORIGINAL:
 (A) ORGANISMO: Melanocarpus albomyces
 (B) CADENA: ALKO4237

45 (ix) CARACTERÍSTICAS:
 (A) NOMBRE/CLAVE: Péptido
 (B) LOCALIZACIÓN:1..18
 (D) INFORMACIÓN ADICIONAL:/etiqueta= fr16

50 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO:9:

Gly Lys Gly Pro Val Asn Gln Pro Val Tyr Ser Cys Asp Ala Asn Phe
1 5 10 15

Gln Arg

55

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID NO:10:

60 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 (A) LONGITUD: 10 aminoácidos
 (B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE CADENA:
(D) TOPOLOGÍA: lineal

5 (ii) TIPO MOLECULA: péptido

(vi) FUENTE ORIGINAL:
(A) ORGANISMO: Melanocarpus albomyces
(B) CADENA: ALKO4237

10 (ix) CARACTERÍSTICAS:
(A) NOMBRE/CLAVE: Péptido
(B) LOCALIZACIÓN:1..10
(D) INFORMACIÓN ADICIONAL:/etiqueta=fr17

15 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO:10:

Val Gln Cys Pro Glu Glu Leu Val Ala Arg
1 5 10

20 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID NO:11:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
25 (A) LONGITUD: 15 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
(C) TIPO DE CADENA:
(D) TOPOLOGÍA: lineal

30 (ii) TIPO MOLECULA: péptido

(vi) FUENTE ORIGINAL:
(A) ORGANISMO: Melanocarpus albomyces
(B) CADENA: ALKO4237

35 (ix) CARACTERÍSTICAS:
(A) NOMBRE/CLAVE: Péptido
(B) LOCALIZACIÓN:1..15
(D) INFORMACIÓN ADICIONAL:/etiqueta= fr28

40 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO:11:

Asp Trp Phe Gln Asn Ala Asp Asn Pro Ser Phe Thr Phe Glu Arg
1 5 10 15

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID NO:12:

45 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
(A) LONGITUD: 30 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
(C) TIPO DE CADENA:
50 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO MOLECULA: péptido

(vi) FUENTE ORIGINAL:
55 (A) ORGANISMO: Melanocarpus albomyces
(B) CADENA: ALKO4237

(ix) CARACTERÍSTICAS:
(A) NOMBRE/CLAVE: Péptido
(B) LOCALIZACIÓN:1..30
60 (D) INFORMACIÓN ADICIONAL:/etiqueta= fr30

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO:12:

Thr Met Val Val Gln Ser Thr Ser Thr Gly Gly Asp Leu Gly Ser Asn
1 5 10 15

His Phe Asp Leu Asn Ile Pro Gly Gly Gly Val Gly Leu Phe
20 25 30

5 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID NO:13:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 10 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

10 (C) TIPO DE CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO MOLECULA: péptido

15 (vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: Melanocarpus albomyces

(B) CADENA: ALKO4237

(ix) CARACTERÍSTICAS:

20 (A) NOMBRE/CLAVE: Péptido

(B) LOCALIZACIÓN:1..10

(D) INFORMACIÓN ADICIONAL:/etiqueta= No_507

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO:13:

25

Val Tyr Leu Leu Asp Glu Thr Glu His Arg
1 5 10

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID NO:14:

30

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 12 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

35 (C) TIPO DE CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO MOLECULA: péptido

(vi) FUENTE ORIGINAL:

40 (A) ORGANISMO: Melanocarpus albomyces

(B) CADENA: ALKO4237

(ix) CARACTERÍSTICAS:

45 (A) NOMBRE/CLAVE: Péptido

(B) LOCALIZACIÓN:1..12

(D) INFORMACIÓN ADICIONAL:/etiqueta= No_509

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO:14:

50

Xaa Xaa Leu Asn Pro Gly Gly Ala Tyr Tyr Gly Thr
1 5 10

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID NO:15:

55

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 17 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO MOLECULA: péptido

(vi) FUENTE ORIGINAL:

- 5 (A) ORGANISMO: Melanocarpus albomyces
(B) CADENA: ALKO4237

(ix) CARACTERÍSTICAS:

- 10 (A) NOMBRE/CLAVE: Péptido
(B) LOCALIZACIÓN:1..17
(D) INFORMACIÓN ADICIONAL:/etiqueta= No_563

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO:15:

Met Ser Glu Gly Ala Glu Cys Glu Tyr Asp Gly Val Cys Asp Lys Asp
1 5 10 15

15 **Gly**

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID NO16:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 20 (A) LONGITUD: 14 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
(C) TIPO DE CADENA:
25 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO MOLECULA: péptido

(vi) FUENTE ORIGINAL:

- 30 (A) ORGANISMO: Melanocarpus albomyces
(B) CADENA: ALKO4237

(ix) CARACTERÍSTICAS:

- 35 (A) NOMBRE/CLAVE: Péptido
(B) LOCALIZACIÓN:1..14
(D) INFORMACIÓN ADICIONAL:/etiqueta= No_565

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO:16:

Asn Pro Tyr Arg Val Xaa Ile Thr Asp Tyr Tyr Gly Asn Ser
1 5 10

40

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID NO:17:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 45 (A) LONGITUD: 24 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
(C) TIPO DE CADENA:
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO MOLECULA: péptido

50

(vi) FUENTE ORIGINAL:

- (A) ORGANISMO: Melanocarpus albomyces
(B) CADENA: ALKO4237

55

(ix) CARACTERÍSTICAS:

- (A) NOMBRE/CLAVE: Péptido
(B) LOCALIZACIÓN:1..24
(D) INFORMACIÓN ADICIONAL:/etiqueta= No_603

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO:17:

Asp Pro Thr Gly Ala Arg Ser Glu Leu Asn Pro Gly Gly Ala Tyr Tyr
1 5 10 15

Gly Thr Gly Tyr Xaa Asp Ala Gln
20

5

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID NO: 18:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 13 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) TIPO DE CADENA:
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

10

(ii) TIPO MOLECULA: péptido

15

(vi) FUENTE ORIGINAL:

- (A) ORGANISMO: Melanocarpus albomyces
- (B) CADENA: ALKO4237

20

(ix) CARACTERÍSTICAS:

- (A) NOMBRE/CLAVE: Péptido
- (B) LOCALIZACIÓN:1..13
- (D) INFORMACIÓN ADICIONAL:/etiqueta= No_605

25

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO:: 18

Xaa Xaa Val Pro Asp Tyr His Gln His Gly Val Asp Ala
1 5 10

30

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID NO:19

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 12 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) TIPO DE CADENA:
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

35

(ii) TIPO MOLECULA: péptido

40

(vi) FUENTE ORIGINAL:

- (A) ORGANISMO: Melanocarpus albomyces
- (B) CADENA: ALKO4237

45

(ix) CARACTERÍSTICAS:

- (A) NOMBRE/CLAVE: Péptido
- (B) LOCALIZACIÓN:1..12
- (D) INFORMACIÓN ADICIONAL:/etiqueta= No_610

50

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO::19

Asn Glu Met Asp Ile Xaa Glu Ala Asn Ser Arg Ala
1 5 10

55

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID NO: 20

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 25 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido

60

(C) TIPO DE CADENA:
(D) TOPOLOGÍA: lineal

- 5 (ii) TIPO MOLECULA: péptido
- (vi) FUENTE ORIGINAL:
(A) ORGANISMO: Melanocarpus albomyces
(B) CADENA: ALKO4237
- 10 (ix) CARACTERÍSTICAS:
(A) NOMBRE/CLAVE: Péptido
(B) LOCALIZACIÓN:1..25
(D) INFORMACIÓN ADICIONAL:/etiqueta= No_611
- 15 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO::20

Leu Pro Xaa Gly Met Asn Ser Ala Leu Tyr Leu Ser Glu Met Asp Pro
1 5 10 15

Thr Gly Ala Arg Ser Glu Leu Asn Pro
20 25

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID NO: 21

- 20 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
(A) LONGITUD: 21 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
(C) TIPO DE CADENA:
(D) TOPOLOGÍA: lineal
- 25 (ii) TIPO MOLECULA: péptido
- (vi) FUENTE ORIGINAL:
(A) ORGANISMO: Melanocarpus albomyces
(B) CADENA: ALKO4237
- 30 (ix) CARACTERÍSTICAS:
(A) NOMBRE/CLAVE: Péptido
(B) LOCALIZACIÓN:1..21
(D) INFORMACIÓN ADICIONAL:/etiqueta= No_612
- 35 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO:21:

Val Glu Pro Ser Pro Glu Val Thr Tyr Ser Asn Leu Arg Xaa Gly Glu
1 5 10 15

Ile Xaa Gly Xaa Phe
20

- 40 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID NO:22
- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
(A) LONGITUD: 19 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
(C) TIPO DE CADENA:
(D) TOPOLOGÍA: lineal
- 45 (ii) TIPO MOLECULA: péptido
- 50 (vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: Melanocarpus albomyces
(B) CADENA: ALKO4237

5 (ix) CARACTERÍSTICAS:
(A) NOMBRE/CLAVE: Péptido
(B) LOCALIZACIÓN:1..19
(D) INFORMACIÓN ADICIONAL:/etiqueta= No_619

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO:22:

Asp Gly Cys Gly Trp Asn Pro Tyr Arg Val Val Ile Thr Thr Asp Tyr
1 5 10 15

10 **Tyr Asn Asn**

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID NO:23

15 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
(A) LONGITUD: 10 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
(C) TIPO DE CADENA:
(D) TOPOLOGÍA: lineal

20 (ii) TIPO MOLECULA: péptido

(vi) FUENTE ORIGINAL:
(A) ORGANISMO: Melanocarpus albomyces
(B) CADENA: ALKO4237

25 (ix) CARACTERÍSTICAS:
(A) NOMBRE/CLAVE: Péptido
(B) LOCALIZACIÓN:1..10
(D) INFORMACIÓN ADICIONAL:/etiqueta= No_620

30 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO:23:

Leu Pro Cys Gly Met Xaa Ser Ala Leu Tyr
1 5 10

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID NO:24

35 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
(A) LONGITUD: 22 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
(C) TIPO DE CADENA:
(D) TOPOLOGÍA: lineal

40 (ii) TIPO MOLECULA: péptido

45 (vi) FUENTE ORIGINAL:
(A) ORGANISMO: Melanocarpus albomyces
(B) CADENA: ALKO4237

50 (ix) CARACTERÍSTICAS:
(A) NOMBRE/CLAVE: Péptido
(B) LOCALIZACIÓN:1..22
(D) INFORMACIÓN ADICIONAL:/etiqueta= No_621

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO:24:

Ala Asp Gly Cys Gln Pro Arg Thr Asn Tyr Ile Val Leu Asp Asp Leu

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO MOLECULA: péptido

5 (vi) FUENTE ORIGINAL:
 (A) ORGANISMO: Melanocarpus albomyces
 (B) CADENA: ALKO4237

10 (ix) CARACTERÍSTICAS:
 (A) NOMBRE/CLAVE: Péptido
 (B) LOCALIZACIÓN:1..12
 (D) INFORMACIÓN ADICIONAL:/etiqueta= No_631

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO:27:

15 **Leu Ser Gln Tyr Phe Ile Gln Asp Gly Glu Arg Lys**
1 5 10

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID NO: 28

20 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 (A) LONGITUD: 11 aminoácidos
 (B) TIPO: aminoácido
 (C) TIPO DE CADENA:
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

25 (ii) TIPO MOLECULA: péptido

(vi) FUENTE ORIGINAL:
 (A) ORGANISMO: Melanocarpus albomyces
 (B) CADENA: ALKO4237

30 (ix) CARACTERÍSTICAS:
 (A) NOMBRE/CLAVE: Péptido
 (B) LOCALIZACIÓN:1..11
 (D) INFORMACIÓN ADICIONAL:/etiqueta= No_632

35 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO:28:

Phe Thr Val Val Ser Arg Phe Glu Glu Asn Lys
1 5 10

40 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID NO: 29

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 (A) LONGITUD: 19 aminoácidos
 (B) TIPO: aminoácido
 (C) TIPO DE CADENA:
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO MOLECULA: péptido

50 (vi) FUENTE ORIGINAL:
 (A) ORGANISMO: Melanocarpus albomyces
 (B) CADENA: ALKO4237

55 (ix) CARACTERÍSTICAS:
 (A) NOMBRE/CLAVE: Péptido
 (B) LOCALIZACIÓN:1..19
 (D) INFORMACIÓN ADICIONAL:/etiqueta= No_636

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO:29:

His Glu Tyr Gly Thr Asn Val Gly Ser Arg Phe Tyr Leu Met Asn Gly
1 5 10 15
Pro Asp Lys

5

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID NO: 30:

- 10 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 (A) LONGITUD: 936 pares de bases
 (B) TIPO: ácido nucléico
 (C) TIPO DE CADENA:
 (D) TOPOLOGÍA: lineal
- 15 (ii) TIPO MOLECULA: ADN (genómico)
- (vi) FUENTE ORIGINAL:
 (A) ORGANISMO: Melanocarpus albomyces
 (B) CADENA: ALKO4237
- 20 (ix) CARACTERÍSTICAS:
 (A) NOMBRE/CLAVE: exón
 (B) LOCALIZACIÓN:33..115
 (D) INFORMACIÓN ADICIONAL: codón de iniciación= 33 /producto= "20K-celulasa"
- 25 (ix) CARACTERÍSTICAS:
 (A) NOMBRE/CLAVE: exón
 (B) LOCALIZACIÓN:187...435
 (D) INFORMACIÓN ADICIONAL: /producto: "20K-celulasa"
- 30 (ix) CARACTERÍSTICAS:
 (A) NOMBRE/CLAVE: exón
 (B) LOCALIZACIÓN:506...881
 (D) INFORMACIÓN ADICIONAL: /producto: "20K-celulasa"
- 35 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO:30:

TCGCCCTAA CCGAGAACCA AAGACTCCAA GAATGCGCTC TACTCCGTT CTCCGCGCCC 60
 TCCTGGCCGC AGCATTGCC CTCGGGGCCC TCGCCGCCAA CGGTCAGTCC ACGAGGTAAC 120
 TGATCACCCG CCTCATTACG CGTGCCGACC GGACCGCGTT CAGGGCTCAC TGCTCACCCG 180
 ATCCAGATAC TGGGACTGCT GCAAGCCGTC GTGCGGCTGG CGCGGAAAGG GCCCCGTGAA 240
 CCAGCCCGTC TACTCGTGCG ACGCCAACCT CCAGCGCATC CACGACTTCG ATGCCGTCTC 300
 GGGCTGCGAG GGGCGCCCCG CCTTCTCGTG CGCCGACCAC AGCCCCTGGG CCATTAATGA 360
 CAACCTCTCG TACGGCTTCG CGGCGACTGC ACTCAGCGGC CAGACCGAGG AGTCGTGGTG 420
 CTGTGCCTGC TACGCGTGAG TGTGCTTGGG CCCAACGTCG GTGATTCCGG AGTTCAGACC 480
 ACTGACCCAG CGACCCGCTC GCCAGTCTGA CCTTTACATC GGGTCCCGTG GCCGGAAGA 540
 CCATGGTCGT CCAGTCGACC AGCACGGGCG GCGACCTCGG CAGCAACCAC TTCGACCTCA 600
 ACATCCCCGG CGGCGGCGTC GGCCTCTTCG ACGGCTGCAC TCCCAGTTC GGCGGCCTCC 660
 CGGGCGCACG GTACGGCGGC ATCTCGTCGC GCCAGGAGTG CGACTCGTTC CCCGAGCCGC 720
 TCAAGCCCGG CTGCCAGTGG CGCTTCGACT GGTTCAGAA CGCCGACAAC CCGTCCTTTA 780
 CCTTCGAGCG GGTCCAGTGC CCCGAGGAGC TGGTCGCTCG GACCGGCTGC AGGCGCCACG 840
 ACGACGGCGG CTTCGCCGTC TTCAAGGCC CCAGCGCCTG ATCCGTTTTT GGGCAGTGTC 900
 CGTGTGACGG CAGCTACGTG GAACGACCTG GAGCTC 936

5 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID NO: 31:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 235 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

10 (C) TIPO DE CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO MOLECULA: proteína

15 (vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: Melanocarpus albomyces

(B) CADENA: ALKO4237

20 (ix) CARACTERÍSTICAS:

(A) NOMBRE/CLAVE: Proteína

(B) LOCALIZACIÓN: 1..235

(D) INFORMACIÓN ADICIONAL: /etiqueta= 20K-celulasa

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO:31:

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

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID NO: 32

- 5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 - (A) LONGITUD: 1894 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucléico
 - (C) TIPO DE CADENA: simple
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
- 10 (ii) TIPO MOLECULA: ADN (genómico)
- 15 (vi) FUENTE ORIGINAL:
 - (A) ORGANISMO: Melanocarpus albomyces
 - (B) CADENA: ALKO4237
- 20 (ix) CARACTERÍSTICAS:
 - (A) NOMBRE/CLAVE: exón
 - (B) LOCALIZACIÓN:233..838
 - (D) INFORMACIÓN ADICIONAL:/producto= "50K-celulasa"
- (ix) CARACTERÍSTICAS:
 - (A) NOMBRE/CLAVE: exón
 - (B) LOCALIZACIÓN:916..1596

(D) INFORMACIÓN ADICIONAL:/producto= "50K-celulasa"

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO:32:

5	GAATTCGGGG GTTGCCAGGG AGTCGTACAG GGGTGGGTGG AGGGGGATGG GGGATGGAAG	60
	GGGGATGGAG AAGAAAGCAT ATATGGGACG TTTGTGCTCG CCGGCTCCCC TCTGCCACGT	120
	TCCCTTGCCT CCTTGCCTGG GTTGTGTGTTG GTCTTCCCTT CACCATCCGA CAAACCAACC	180
	TGCTGCGGGT GAACTCGCAG AGCGCCTTCG GACGACGACA GACAGACGCA CCATGACTCG	240
	CAACATCGCC CTGCTCGGCG CCGCGTCGGC GCTCCTGGGC CTCGCCCACG GCCAGAAGCC	300
	GGGCGAGACG CCCGAGGTGC ACCCGCAGCT GACGACGTTT CCGTGCACCA AGGCGGACGG	360
	GTGCCAGCCG CGGACCAACT ACATTGTGCT GGACTCGCTG TCGCACCCGG TGCACCAGGT	420
	GGACAACGAC TACAACGCG GCGACTGGGG GCAGAAGCCC AACGCGACGG CGTGCCCGGA	480
	CGTCGAGTCG TCGCGCGCA ACTGCATCAT GGAGGGCGTG CCCGACTACA GCCAGCACGG	540
	CGTCACGACG AGCGACACGT CGCTGCGCCT GCAGCAGCTC GTCGACGGCC GCCTCGTCAC	600
	GCCGCGGTC TACCTGCTCG ACGAGACCGA GCACCGCTAC GAGATGATGC ACCTGACCGG	660
	CCAGGAGTTC ACCTTTGAGG TCGAGCCAC CAAGCTGCCC TCGCGCATGA ACAGCGCCCT	720
	CTACCTGTCC GAGATGGACC CGACCGGCGC CCGGAGCGAG CTCAACCCCG GCGGTGCCTA	780
	CTACGGCACC GGCTACTGCG ACGCCAGTG CTTGCTGACG CCATTCATCA ACGGCATTGT	840
	GAGTGTCCC CTTTGGCCCC CCCCTGAAA ATAGATGTAC CTGGGTGCTA ACCCCGGGGT	900
	GTCGACCAA AACAGGGCAA CATCGAGGGC AAGGGCTCGT GCTGCAACGA GATGGACATC	960
	TGGGAGGCCA ACTCGCGGGC GACGACGCTG GCGCCGACA CGTGCAACCA GACGGGTCTG	1020
	TACATGTGCG AGGGCGCCGA GTGCGAGTAC GACGGCGTGT GCGACAAGGA CGGGTGCGGG	1080

TGGAACCCGT ACCGGGTCAA CATCACCGAC TACTACGGCA ACTCGGACGC GTTCCGCGTC 1140
 GACACGCGGC GGCCCTTAC CGTGGTGACG CAGTTCCCGG CCGACGCCGA GGGCCGGCTC 1200
 GAGAGCATCC ACCGGCTGTA CGTGCAGGAC GGCAAGGTGA TCGAGTCGTA CGTCGTCGAC 1260
 GCGCCGGGCC TGCCCCGGAC CGACTCGCTC AACGACGAGT TCTGCGCCGC CACGGGCGCC 1320
 GCGCGCTACC TCGACCTCGG CGGCACCGCG GGCATGGGCG ACGCCATGAC GCGCGGCATG 1380
 GTGCTGGCCA TGAGCATCTG GTGGGACGAG TCCGGCTTCA TGAAGTGGCT CGACAGCGGC 1440
 GAGGCCGGCC CCTGCCTGCC CGACGAGGGC GACCCCAAGA ACATTGTCAA GGTCGAGCCC 1500
 AGCCCCGAGG TCACCTACAG CAACCTGCGC TGGGGCGAGA TCGGGTCGAC CTTTGAGGCC 1560
 GAGTCCGACG ACGACGGCGA CGGCGACGAC TGCTAGATAA CTAAGTAGTG GGCAGAAAGG 1620
 GCGGGGGATG CGTAACTTAC ATACAGCCCG GAGTTGTTTT GAGTGTAGAG TATTGAGCTT 1680
 TCGATGTGTT AGTTGAGTGG AATGGAAAAT TCGCGTCTTT GCCCCGGTGG TTGCGATAAA 1740
 CAATAGTCGG CTGGTGCAAT TGTGACACTT CAATTGCGCT GTTGGCTTGG TGACAGACAC 1800
 GGCAGCGTCG ATGACCCGAC ACCCAGAATA ATTGCGATGG TTGATTATGT TATTGTGCTT 1860
 TAAATCGGAG GCTGATGCTC ATCTCTCGA ATTC 1894

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID NO: 33:

5

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 428 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) TIPO DE CADENA:
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

10

(ii) TIPO MOLECULA: proteína

(vi) FUENTE ORIGINAL:

- (A) ORGANISMO: Melanocarpus albomyces
- (B) CADENA: ALKO4237

15

(ix) CARACTERÍSTICAS:

- (A) NOMBRE/CLAVE: Proteína
- (B) LOCALIZACIÓN: 1..428
- (D) INFORMACIÓN ADICIONAL: /etiqueta= 50K-celulasa

20

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO:33:

Met Thr Arg Asn Ile Ala Leu Leu Gly Ala Ala Ser Ala Leu Leu Gly
 1 5 10 15
 Leu Ala His Gly Gln Lys Pro Gly Glu Thr Pro Glu Val His Pro Gln
 20 25 30

25

ES 2 525 677 T3

Leu Thr Thr Phe Arg Cys Thr Lys Ala Asp Gly Cys Gln Pro Arg Thr
 35 40 45
 Asn Tyr Ile Val Leu Asp Ser Leu Ser His Pro Val His Gln Val Asp
 50 55 60
 Asn Asp Tyr Asn Cys Gly Asp Trp Gly Gln Lys Pro Asn Ala Thr Ala
 65 70 75 80
 Cys Pro Asp Val Glu Ser Cys Ala Arg Asn Cys Ile Met Glu Gly Val
 85 90 95
 Pro Asp Tyr Ser Gln His Gly Val Thr Thr Ser Asp Thr Ser Leu Arg
 100 105 110
 Leu Gln Gln Leu Val Asp Gly Arg Leu Val Thr Pro Arg Val Tyr Leu
 115 120 125
 Leu Asp Glu Thr Glu His Arg Tyr Glu Met Met His Leu Thr Gly Gln
 130 135 140
 Glu Phe Thr Phe Glu Val Asp Ala Thr Lys Leu Pro Cys Gly Met Asn
 145 150 155 160
 Ser Ala Leu Tyr Leu Ser Glu Met Asp Pro Thr Gly Ala Arg Ser Glu
 165 170 175
 Leu Asn Pro Gly Gly Ala Tyr Tyr Gly Thr Gly Tyr Cys Asp Ala Gln
 180 185 190
 Cys Phe Val Thr Pro Phe Ile Asn Gly Ile Gly Asn Ile Glu Gly Lys
 195 200 205
 Gly Ser Cys Cys Asn Glu Met Asp Ile Trp Glu Ala Asn Ser Arg Ala
 210 215 220
 Thr His Val Ala Pro His Thr Cys Asn Gln Thr Gly Leu Tyr Met Cys
 225 230 235 240
 Glu Gly Ala Glu Cys Glu Tyr Asp Gly Val Cys Asp Lys Asp Gly Cys
 245 250 255
 Gly Trp Asn Pro Tyr Arg Val Asn Ile Thr Asp Tyr Tyr Gly Asn Ser
 260 265 270
 Asp Ala Phe Arg Val Asp Thr Arg Arg Pro Phe Thr Val Val Thr Gln
 275 280 285
 Phe Pro Ala Asp Ala Glu Gly Arg Leu Glu Ser Ile His Arg Leu Tyr
 290 295 300
 Val Gln Asp Gly Lys Val Ile Glu Ser Tyr Val Val Asp Ala Pro Gly
 305 310 315 320

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

Ala Ala Arg Tyr Leu Asp Leu Gly Gly Thr Ala Gly Met Gly Asp Ala
 340 345 350

Met Thr Arg Gly Met Val Leu Ala Met Ser Ile Trp Trp Asp Glu Ser
 355 360 365

Gly Phe Met Asn Trp Leu Asp Ser Gly Glu Ala Gly Pro Cys Leu Pro
 370 375 380

Asp Glu Gly Asp Pro Lys Asn Ile Val Lys Val Glu Pro Ser Pro Glu
 385 390 395 400

Val Thr Tyr Ser Asn Leu Arg Trp Gly Glu Ile Gly Ser Thr Phe Glu
 405 410 415

Ala Glu Ser Asp Asp Asp Gly Asp Gly Asp Asp Cys
 420 425

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID NO: 34

5

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 2000 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucléico
- (C) TIPO DE CADENA: simple
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

10

(ii) TIPO MOLECULA: ADN (genómico)

(vi) FUENTE ORIGINAL:

- (A) ORGANISMO: Melanocarpus albomyces
- (B) CADENA: ALKO4237

15

(ix) CARACTERÍSTICAS:

- (A) NOMBRE/CLAVE: exón
- (B) LOCALIZACIÓN:154..729
- (D) INFORMACIÓN ADICIONAL:/producto= "50K-celulasa B"

20

(ix) CARACTERÍSTICAS:

- (A) NOMBRE/CLAVE: exón
- (B) LOCALIZACIÓN:810..946
- (D) INFORMACIÓN ADICIONAL:/producto= "50K-celulasa B"

25

(ix) CARACTERÍSTICAS:

- (A) NOMBRE/CLAVE: exón
- (B) LOCALIZACIÓN:1018..1230
- (D) INFORMACIÓN ADICIONAL:/producto= "50K-celulasa B"

30

(ix) CARACTERÍSTICAS:

- (A) NOMBRE/CLAVE: exón
- (B) LOCALIZACIÓN:1308..1551
- (D) INFORMACIÓN ADICIONAL:/producto= "50K-celulasa B"

35

(ix) CARACTERÍSTICAS:

- (A) NOMBRE/CLAVE: exón
- (B) LOCALIZACIÓN:1637..1767
- (D) INFORMACIÓN ADICIONAL:/producto= "50K-celulasa B"

40

(ix) CARACTERÍSTICAS:

- (A) NOMBRE/CLAVE: exón
- (B) LOCALIZACIÓN:1831..1888
- (D) INFORMACIÓN ADICIONAL:/producto= "50K-celulasa B"

45

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO:34:

CCCGGTCTGG AGACGGGGAG CGCGCCAGCG ACGCAGGATA AGAAGGCGAC GACCGCGCCT	60
CCGAGCCAGG CCCAGGACAG CAGGAGAACT CGCCACGCGC AAGCAGCACG CCCGATCGAC	120
AGTGTCCCGC TCTGCCACA GCACTCTGCA ACCATGATGA TGAAGCAGTA CCTCCAGTAC	180
CTCGCGGCCG CGCTGCCGCT CGTCGGCCTC GCCGCCGGCC AGCGCGCTGG TAACGAGACG	240
CCGAGAACC ACCCCCCGCT CACCTGGCAG AAGTGCACGG CCCCGGGCAA CTGCCAGACC	300
GTGAACGCCG AGGTCGTCAT TGACGCCAAC TGGCGCTGGC TGCACGACGA CAACATGCAG	360
AACTGCTACG ACGGCAACCA GTGGACCAAC GCCTGCAGCA CCGCCACCGA CTGCGCTGAG	420
AAGTGCATGA TCGAGGGTGC CGGCGACTAC CTGGGCACCT ACGGCGCCTC GACCAGCGGC	480
GACGCCCTGA CGCTCAAGTT CGTCACCAAG CACGAGTACG GCACCAACGT CGGCTCGCGC	540
TTCTACCTCA TGAACGGCCC GGACAAGTAC CAGATGTTCA ACCTCATGGG CAACGAGCTT	600
GCCTTTGACG TCGACCTCTC GACCGTCGAG TCGGGCATCA ACAGCGCCCT GACTTTCGTC	660
GCCATGGAGG AGGACGGCGG CATGGCCAGC TACCCGAGCA ACCAGGCCGG CGCCCGGTAC	720
GGCACTGGGG TGAGTTGAGC TCCGCTTTGT TTCGAGTCGC AACGAGGCAC TTTCTGGGCG	780
CCGGCTAACT CTCTCGATTC CTCCGACAGT ACTGCGATGC CCAATGCGCT CGTGATCTCA	840
AGTTCGTTGG CGGCAAGGCC AACATTGAGG GCTGGAAGTC GTCCACCAGC GACCCCAACG	900
CTGGCGTCGG CCCGTACGGC AGCTGCTGCG CTGAGATCGA CGTCTGGTGA GTGCGAGACC	960
GTCCACCCAG GTTCGGATGC GGGGTGGAAG TTTGCGGCT AACGGAGCAC CCCCAGGGA	1020
GTCGAATGCC TATGCCTTCG CTTTCACGCC GCACGCGTGC ACGACCAACG AGTACCACGT	1080
CTGCGAGACC ACCAACTGCG GTGGCACCTA CTCGGAGGAC CGCTTCGCCG GCAAGTGCGA	1140
CGCCAACGGC TCGACTACA ACCCCTACCG CATGGGCAAC CCCGACTTCT ACGGCAAGGG	1200
CAAGACGCTC GACACCAGCC GCAAGTTCAC GTGCGTGACC CCTTGTGGCG CAACCTTCT	1260

CTGCCTGCCT GGACACACTG AAAGTACAC GTCGTTTTCG GCTGCAGCGT CGTCTCCCGC 1320
 TTCGAGGAGA ACAAGCTCTC CCAGTACTTC ATCCAGGACG GCCGCAAGAT CGAGATCCCG 1380
 CCGCCGACGT GGGAGGGCAT GCCCAACAGC AGCGAGATCA CCCCCGAGCT CTGCTCCACC 1440
 ATGTTTCGATG TGTTC AACGA CCGCAACCGC TTCGAGGAGG TCGGCGGCTT CGAGCAGCTG 1500
 AACAAACGCC TCCGGGTTCC CATGGTCCTC GTCATGTCCA TCTGGGACGA CGTAAAGTACC 1560
 CGCCGACCTC CCTAGCCACA CAAGCCGCAT CCGGCGAGGC ACGCCATCGC TGCTGCTAAC 1620
 ACGAGACCGT TCGTAGCACT ACGCCAACAT GCTCTGGCTC GACTCCATCT ACCCGCCCGA 1680
 GAAGGAGGGC CAGCCCGGCG CCGCCCGTGG CGACTGCCCC ACGGACTCGG GTGTCCCCGC 1740
 CGAGGTCGAG GCTCAGTTCC CCGACGCGTA AGACTTGCCC CCGACCCCAA GCTTCCACTT 1800
 CTGGATGCCG AATGCTAACA CGCGAAACAG CCAGGTCGTC TGGTCCAACA TCCGCTTCGG 1860
 CCCCATCGGC TCGACCTACG ACTTCTAAGC CGTCCATGC ACTCGCAGCC CTGGGCCCGT 1920
 CACGCCCGCC ACCTCCCTC GCGGAAACTC TCCGTGCGTC GCGGGCTCCA AAGCATTTTG 1980
 GCCTCAAGTT TTTTTCGTTT 2000

5 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID NO: 35:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 452 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

10 (C) TIPO DE CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO MOLECULA: proteína

15 (vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: Melanocarpus albomyces

(B) CADENA: ALKO4237

(ix) CARACTERÍSTICAS:

20 (A) NOMBRE/CLAVE: Proteína

(B) LOCALIZACIÓN: 1..452

(D) INFORMACIÓN ADICIONAL: /etiqueta= 50K-celulasa-B

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO:35:

Met Met Met Lys Gln Tyr Leu Gln Tyr Leu Ala Ala Ala Leu Pro Leu
 1 5 10 15

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

25 His Pro Pro Leu Thr Trp Gln Arg Cys Thr Ala Pro Gly Asn Cys Gln

ES 2 525 677 T3

	325		330		335										
Trp	Glu	Gly	Met	Pro	Asn	Ser	Ser	Glu	Ile	Thr	Pro	Glu	Leu	Cys	Ser
			340					345					350		
Thr	Met	Phe	Asp	Val	Phe	Asn	Asp	Arg	Asn	Arg	Phe	Glu	Glu	Val	Gly
		355					360				365				
Gly	Phe	Glu	Gln	Leu	Asn	Asn	Ala	Leu	Arg	Val	Pro	Met	Val	Leu	Val
	370					375					380				
Met	Ser	Ile	Trp	Asp	Asp	His	Tyr	Ala	Asn	Met	Leu	Trp	Leu	Asp	Ser
385					390					395					400
Ile	Tyr	Pro	Pro	Glu	Lys	Glu	Gly	Gln	Pro	Gly	Ala	Ala	Arg	Gly	Asp
				405					410					415	
Cys	Pro	Thr	Asp	Ser	Gly	Val	Pro	Ala	Glu	Val	Glu	Ala	Gln	Phe	Pro
			420					425					430		
Asp	Ala	Gln	Val	Val	Trp	Ser	Asn	Ile	Arg	Phe	Gly	Pro	Ile	Gly	Ser
	435						440					445			
Thr	Tyr	Asp	Phe												
	450														

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID NO: 36:

- 5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 - (A) LONGITUD: 887 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) TIPO DE CADENA: simple
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
- 10 (ii) TIPO MOLECULA: ADN (genómico)
- 15 (vi) FUENTE ORIGINAL:
 - (A) ORGANISMO: Melanocarpus albomyces
 - (B) CADENA: ALKO4237
- 20 (ix) CARACTERÍSTICAS:
 - (A) NOMBRE/CLAVE: exón
 - (B) LOCALIZACIÓN: 351..455
 - (D) INFORMACIÓN ADICIONAL: /producto= "proteína con CBD"
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO:36:

CCATGGACGC	GAAGTGGGAC	GTCTTCTGCC	CCGAGCTGAA	GACCCAGAGC	ATCCAGACCG	60
GCAACCAGTG	CACCCAGGAG	ATGAAGGTCT	ACGAGAACAT	TGACGGCTGG	CTCGACAGCC	120
TGCCCCGGCAA	CGTCCCCATC	ACCGGTCCGC	AGCCCGGCTC	TGGTAAGTCA	AAGAGATGAT	180

GCCTACCTAC CTTCCACCT TCCCACCCAG CCGCAAATAC CTTTCTCCCT CCCCCTGCCC 240
 CGTATTCTTT CAACGCCCG AGACTGACAG ACCCGCTCGT CCCAGGCGGC AACCCCGGCA 300
 ACGGCGGCGG CAGCAACCCG GGCAACGGCG GCGGCGGCGG CTGCACCGTC CAGAAGTGGG 360
 GCCAGTGCGG CGGCATCGGC TACTCGGGCT GCACCACCTG CAAGGCCGGC TCGACCTGCC 420
 CGGCCAGAA CGAGTACTAC TCGCAGTGCC TGTAAGCGG CCGTGGGCTA GGTGGCCGAG 480
 CGGGGGGGTT TCTTCATTGG TTGAGCAAAT AGAACAGGAT TTCCGGCTCG TTGGCAGCGG 540
 CGCGCCGCGG GGATGGTGTT GTACAATTCA AGACCTCAGT ACCGAGGGAC CTGGAAAGGA 600
 GTCAGTCTGC TTGTACGGAG GCTGGCTGCC CCGTGGCGGC GCTGGCAAGG TAGATAGCCC 660
 TTCATTGCTG TAACTAGTAT GCTATATAACC TCTGCACATT TGCAGCCCCA TGGTGTGAAC 720
 AACAAAGTGAC AAGGCTTCCA GTTCCAGCCT CGCGCAATTG TCACGATATC CTTGGTCCAT 780
 CTATATGTAT GGGCATGAGC GAGTCGAGAA AATGTACCGC GAAAAATCGT AGTGACCTGC 840
 GCACTGCGCC GTTCTACCAC CGTAGGATTG AAGTGAATCT CGAATTC 887

5

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID NO: 37:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 34 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) TIPO DE CADENA:
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

10

(ii) TIPO MOLECULA: péptido

15

(vi) FUENTE ORIGINAL:

- (A) ORGANISMO: Melanocarpus albomyces
- (B) CADENA: ALKO4237

20

(ix) CARACTERÍSTICAS:

- (A) NOMBRE/CLAVE: Proteína
- (B) LOCALIZACIÓN:1..34
- (D) INFORMACIÓN ADICIONAL:/etiqueta= proteína con CBD

25

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO:37:

Gln Lys Trp Gly Gln Cys Gly Gly Ile Gly Tyr Ser Gly Cys Thr Thr
 1 5 10 15
 Cys Lys Ala Gly Ser Thr Cys Pro Ala Gln Asn Glu Tyr Tyr Ser Gln
 20 25 30
 Cys Leu

REIVINDICACIONES

1. Una secuencia de nucleótidos aislada que codifica un polipéptido que tiene la actividad enzimática de la celulasa, estando dicha secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en:
 - 5 (a) una secuencia de nucleótidos aislada que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 31 o 33, o de la Figura 19 o 21;
 - (b) una secuencia de nucleótidos aislada que comprende la secuencia de codificación de la secuencia de nucleótidos de SEC ID N° 30 o 32, o de la Figura 19 o 21;
 - (c) una secuencia de nucleótidos aislada que comprende la secuencia de codificación del inserto de ADN contenido en DSM 11024, DSM 11012, DSM 11025 o DSM 11014;
 - 10 (d) una secuencia de nucleótidos aislada, cuya secuencia de codificación difiere de la secuencia de codificación de la secuencia de nucleótidos de uno cualquiera de (a) a (c) debido a la degeneración del código genético; y
 - 15 (e) una secuencia de nucleótidos aislada que codifica un polipéptido que tiene actividad de celulasa y que tiene una secuencia de aminoácidos que muestra al menos 80 % de identidad con la secuencia de SEC ID N° 31 o 33, o la Figura 19 o 21.
2. La secuencia de nucleótidos de la reivindicación 1, que es ARN.
3. La secuencia de nucleótidos de la reivindicación 1, que es ADN.
4. El ADN de la reivindicación 3, que es ADN genómico o ADNc.
5. Un vector que contiene la secuencia de nucleótidos de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
- 20 6. El vector de la reivindicación 5, en el que la secuencia de nucleótidos está ligada operativamente a las secuencias de control de la expresión que permiten la expresión en células huésped procariotas o eucariotas.
7. Una célula huésped transformada con el vector de la reivindicación 5 o 6.
8. La célula huésped de la reivindicación 7, que pertenece a hongos filamentosos.
9. La célula huésped de la reivindicación 7 u 8, que pertenece al género *Trichoderma* o *Aspergillus*.
- 25 10. La célula huésped de la reivindicación 9, que es *Trichoderma reesei*.
11. Un proceso de producción de un polipéptido que tiene actividad de celulasa que comprende las etapas de cultivar la célula huésped de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10 y recuperar la proteína del medio de cultivo.
- 30 12. Un polipéptido que tiene la actividad de celulasa y que está codificado por la secuencia de nucleótidos de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o el vector de la reivindicación 5 o 6 y que se obtiene mediante el proceso de la reivindicación 11.
13. Una preparación enzimática que comprende un polipéptido que tiene actividad de celulasa codificado por la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la reivindicación 1.
14. La preparación enzimática de la reivindicación 13 que es líquida.
- 35 15. La preparación enzimática de la reivindicación 13 o 14 que está seca.
16. Un método de biolavado a la piedra que comprende la etapa de añadir la preparación enzimática de una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15 a tejidos o prendas que contienen algodón.
17. El método de la reivindicación 16, en el que el tejido o las prendas son de tela vaquera
- 40 18. El método de la reivindicación 16 o 17, en el que la preparación comprende uno o más de los polipéptidos de la reivindicación 12.

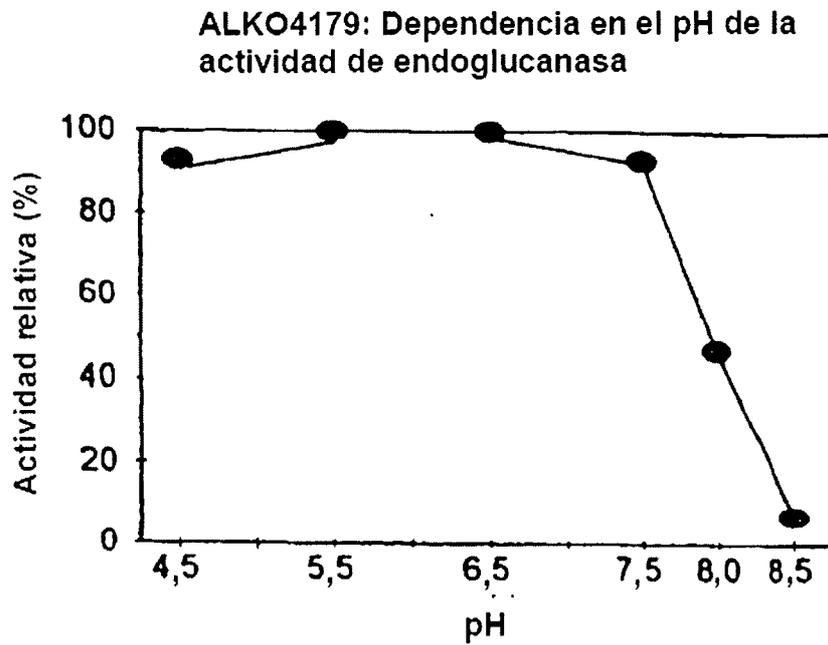


Fig. 1A

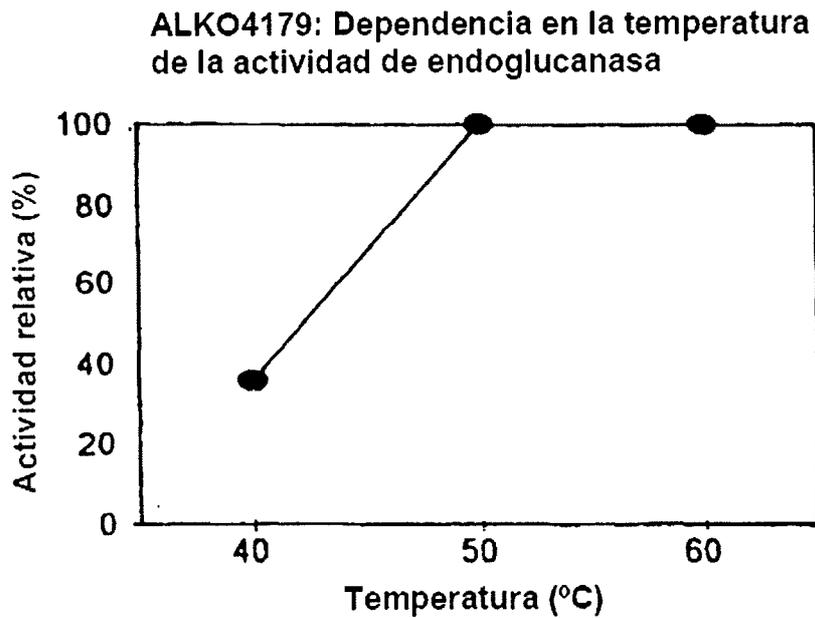


Fig. 1B

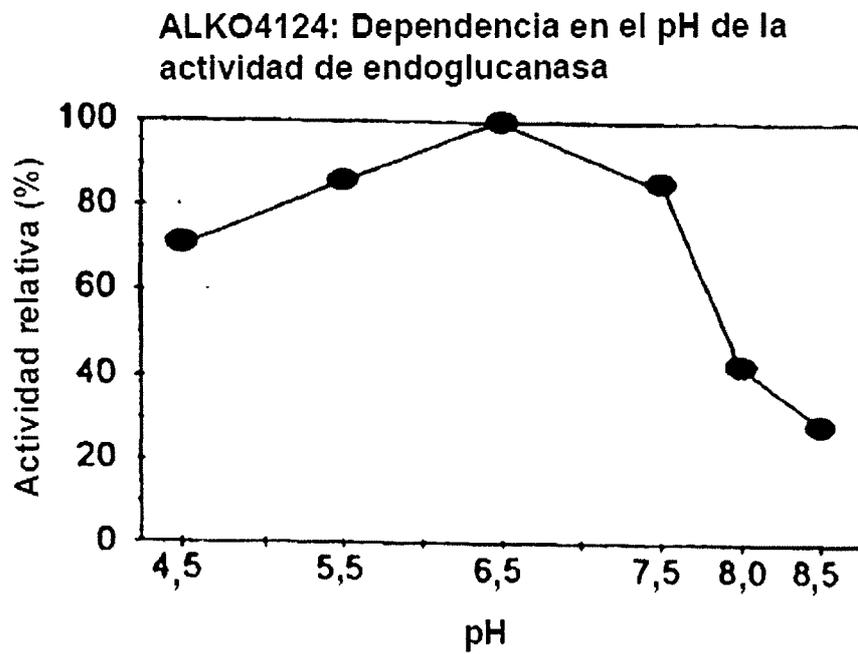


Fig. 2A

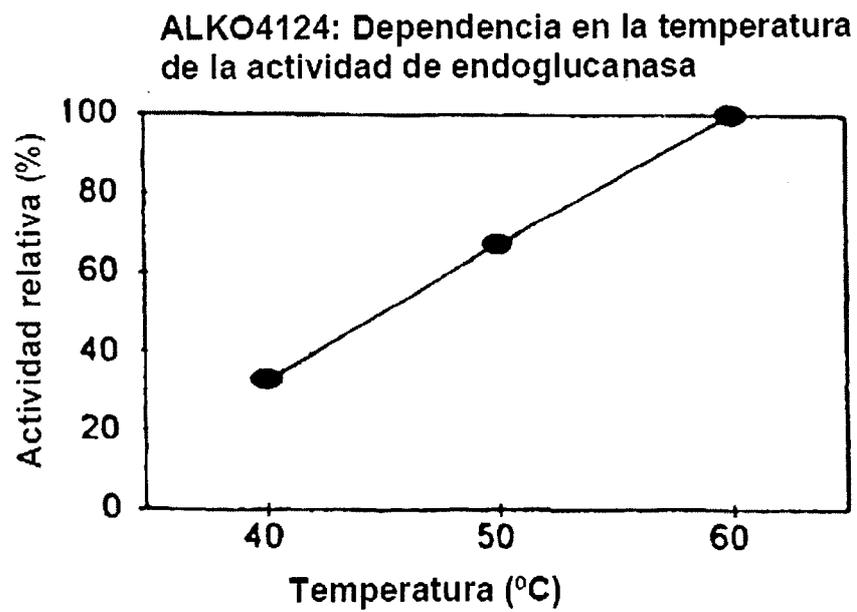


Fig. 2B

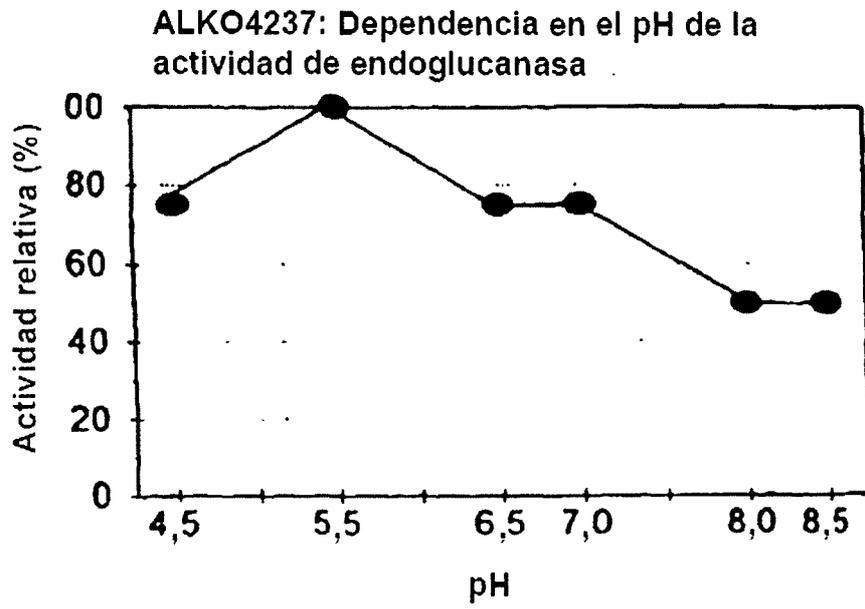


Fig. 3A

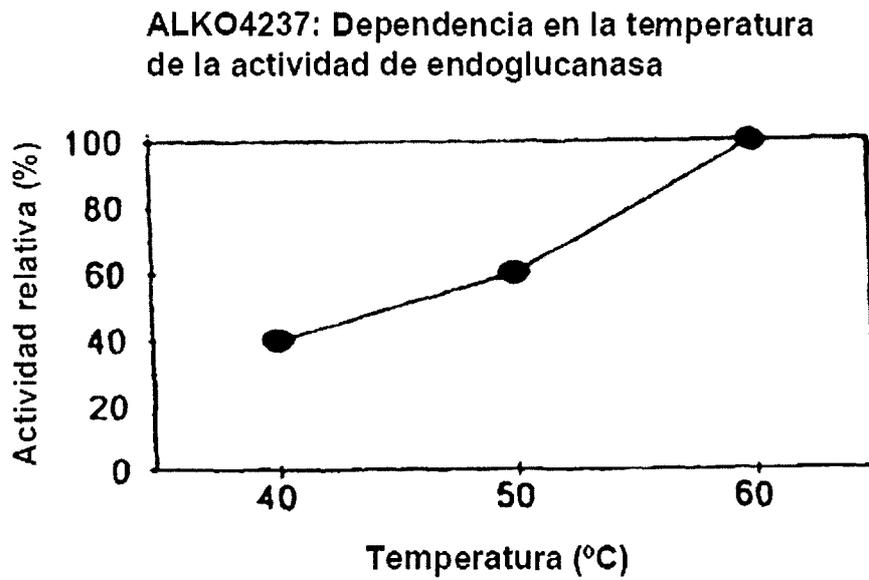


Fig. 3B

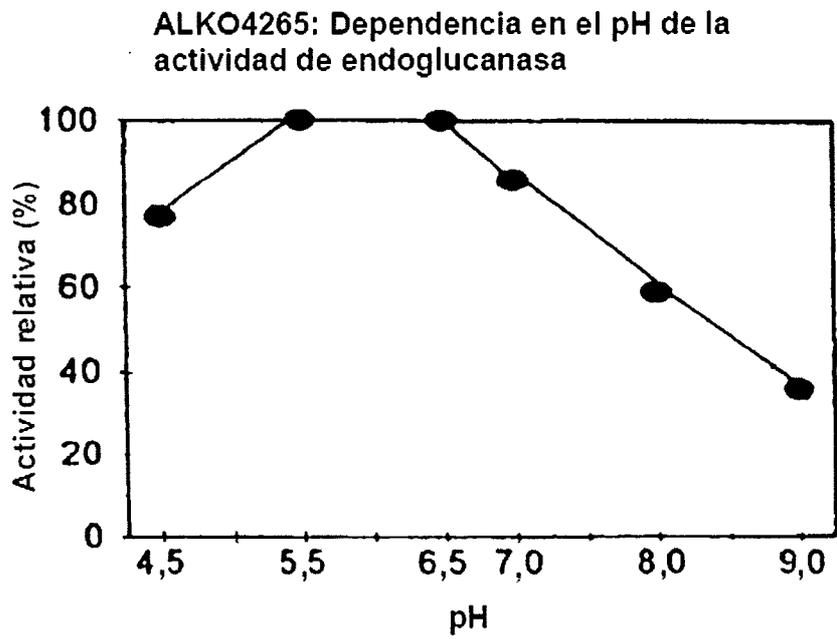


Fig. 4A

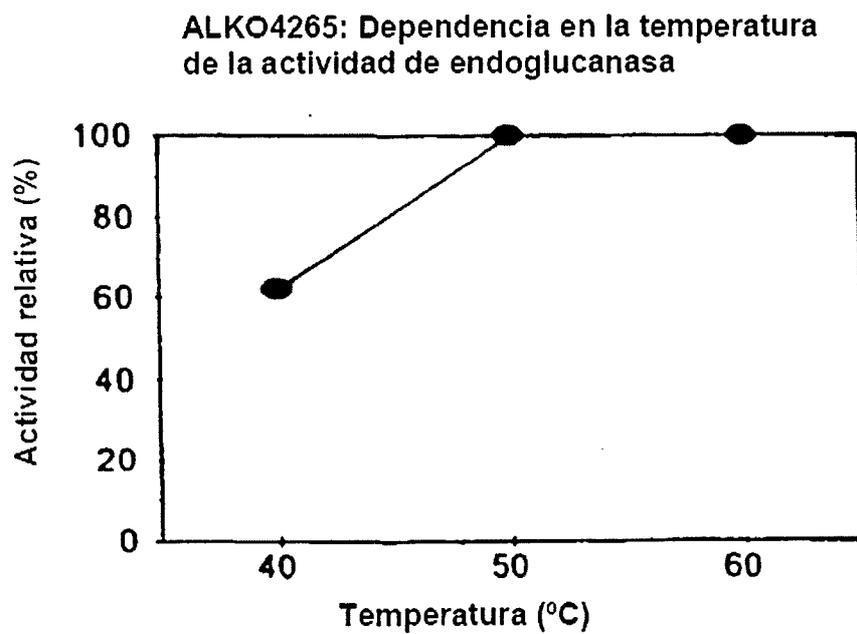


Fig. 4B

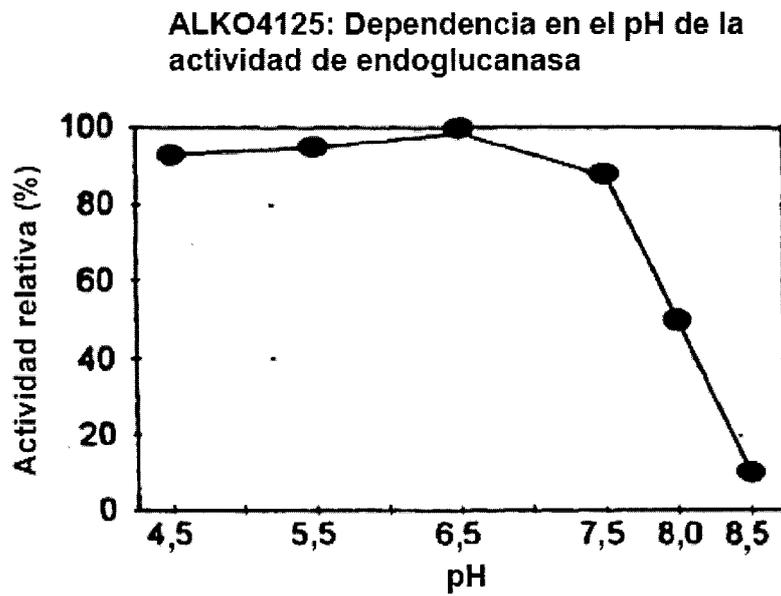


Fig. 5A

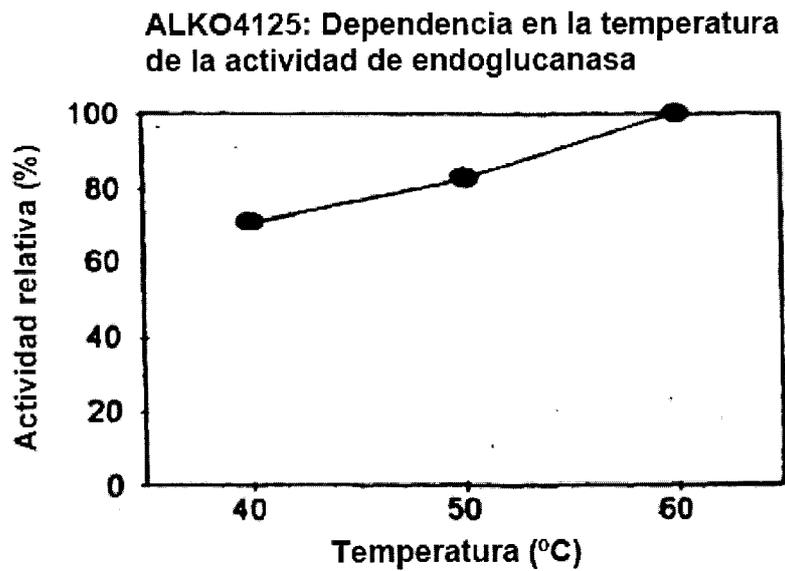


Fig. 5B

**EFFECTO DEL LAVADO Y RETROTINCIÓN CON
CELULASAS NEUTRAS**

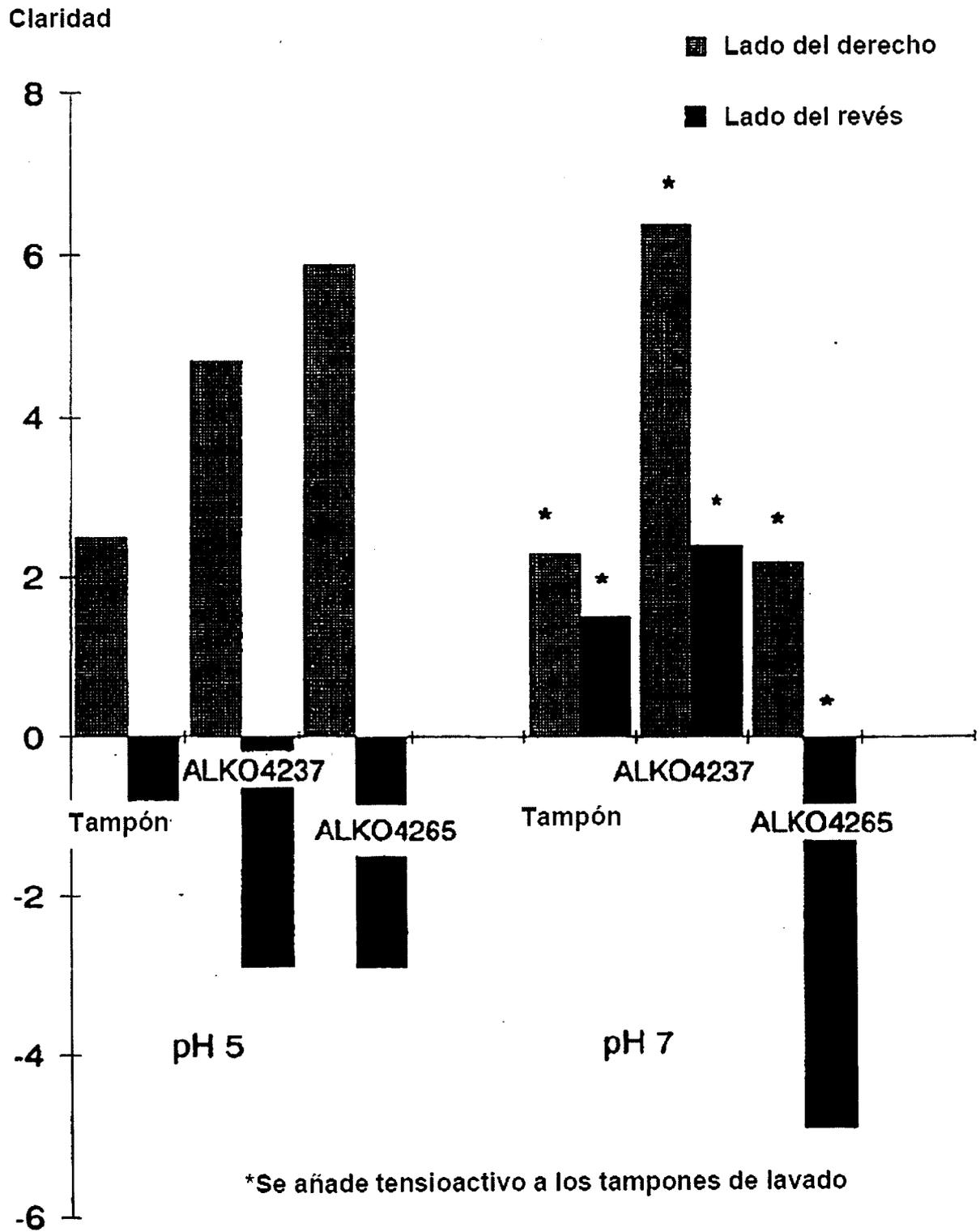


Fig. 6A

COLORACIÓN AZUL CON LAS CELULASAS NEUTRAS

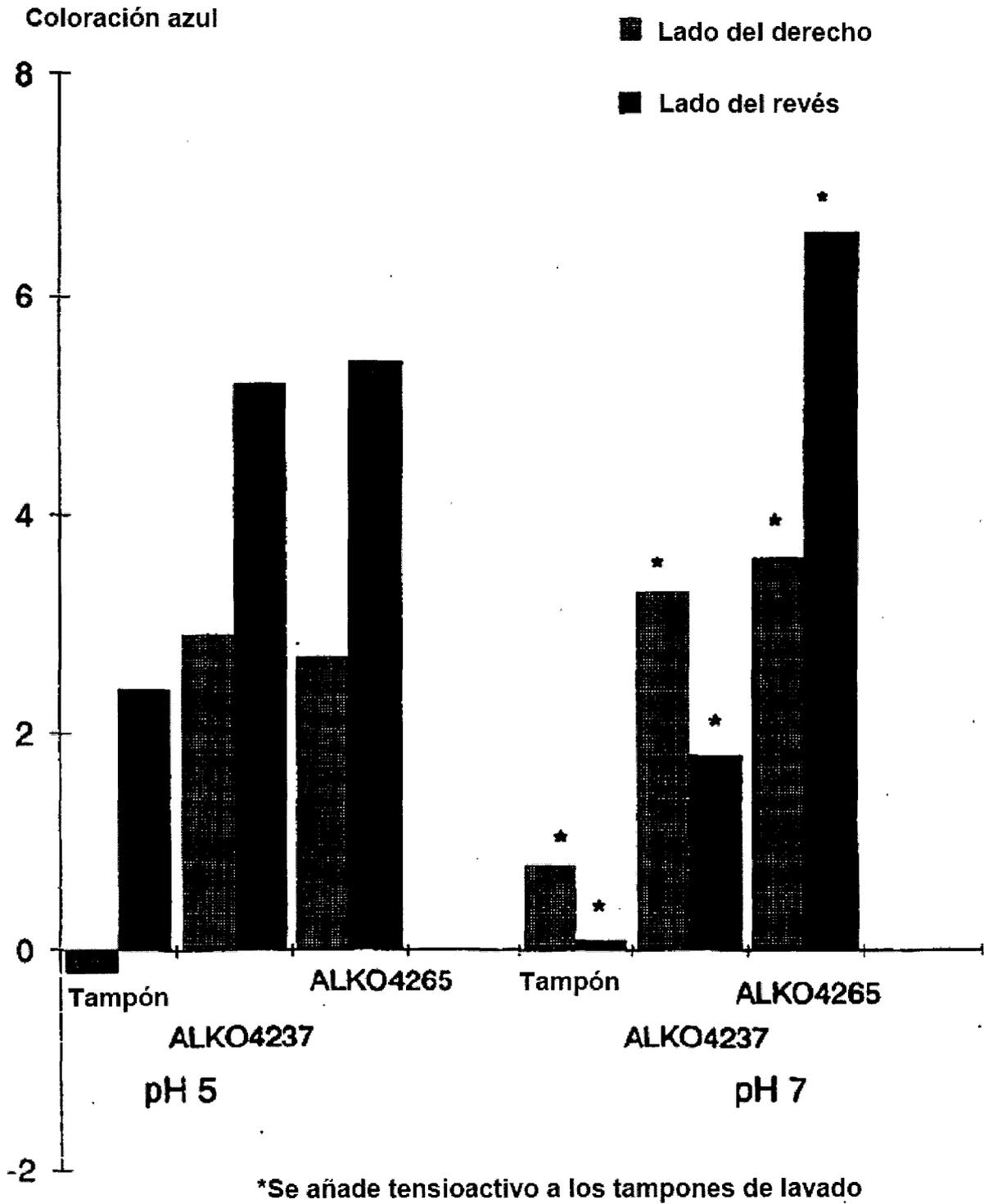


Fig. 6B

EFFECTO DEL LAVADO Y RETROTINCIÓN CON ECOSTONE L

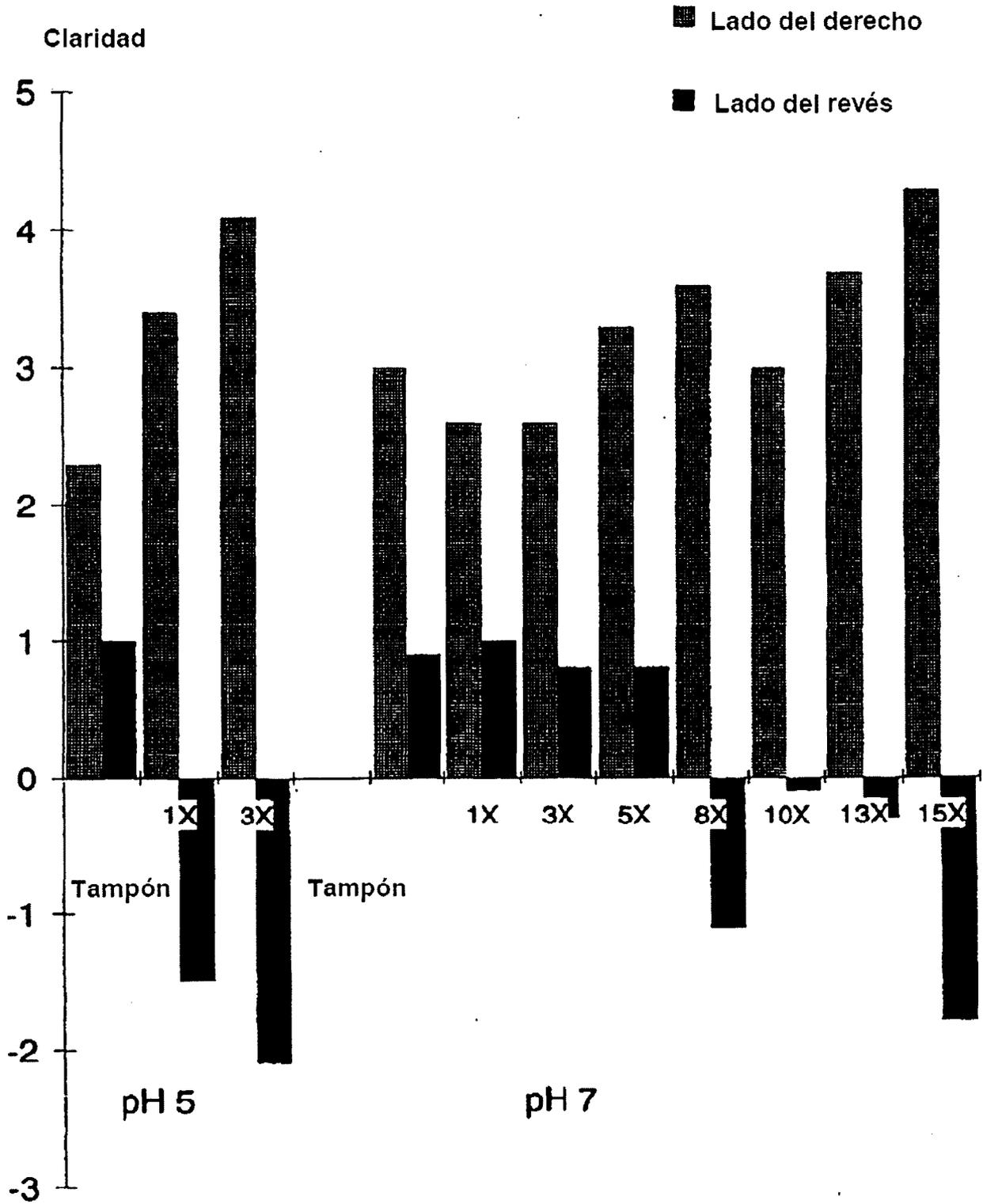


Fig. 7A

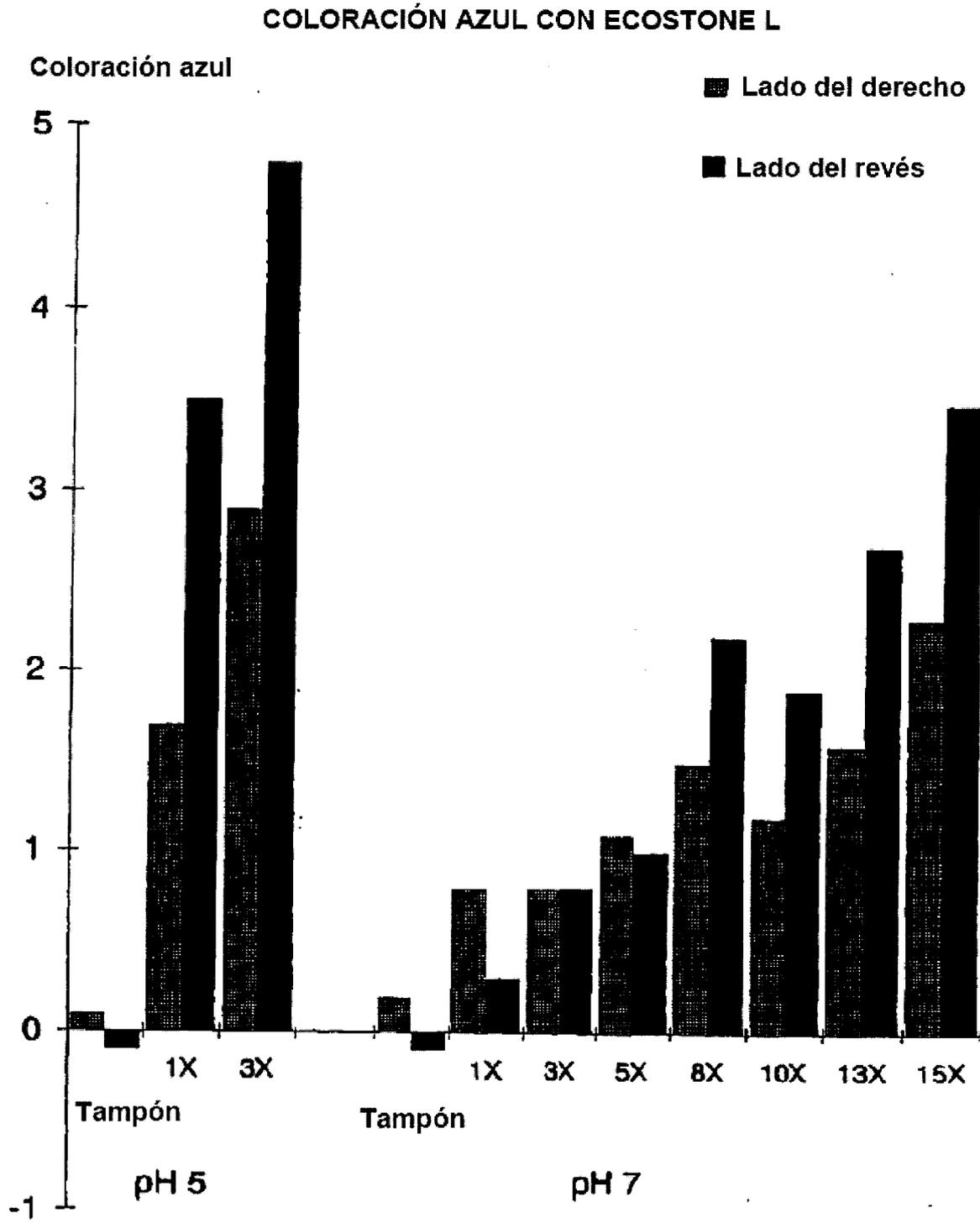


Fig. 7B

Purificación de celulasa 20 K del Pico II mediante cromatografía sobre SP-Sepharose

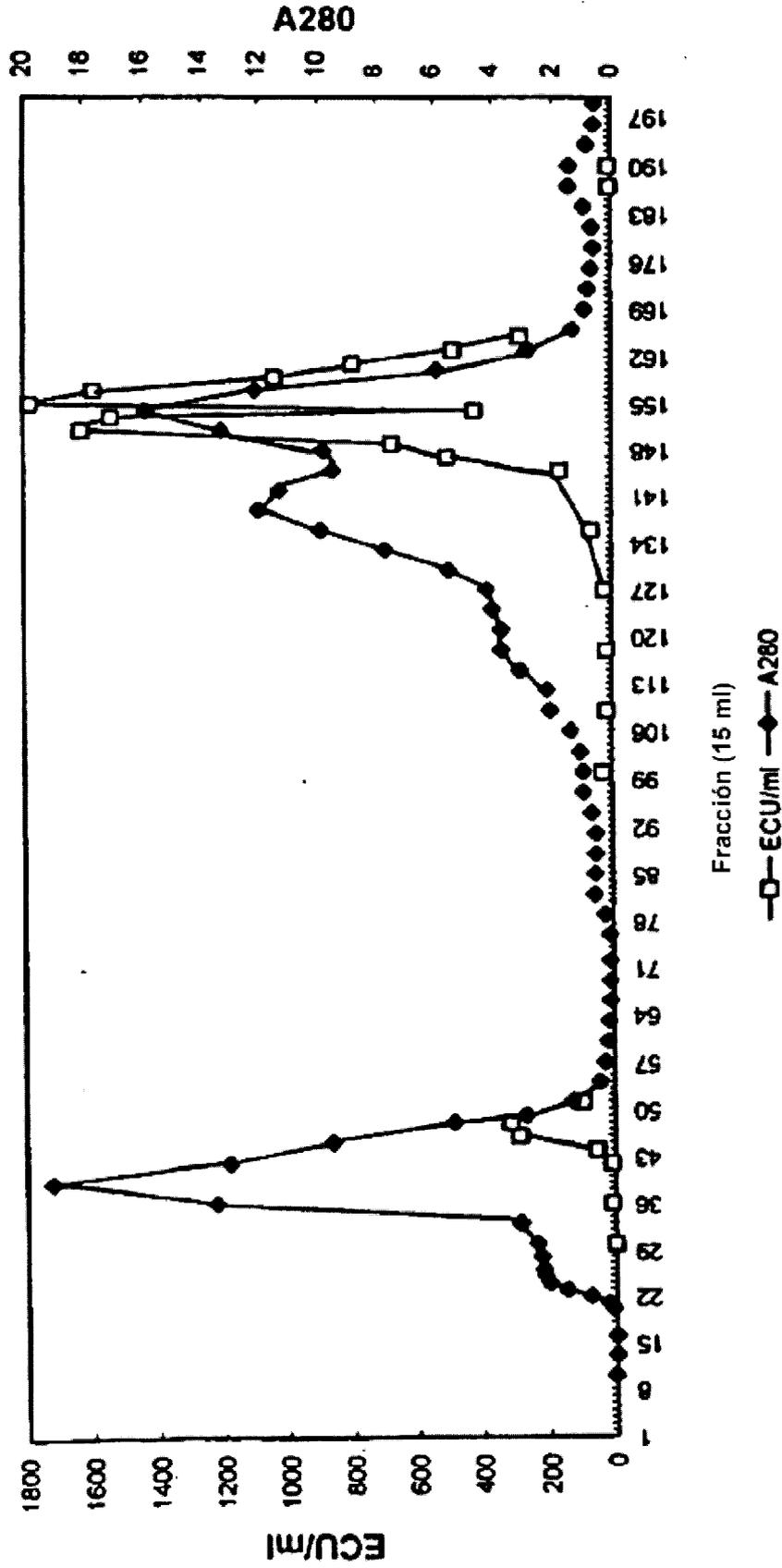


Fig. 8

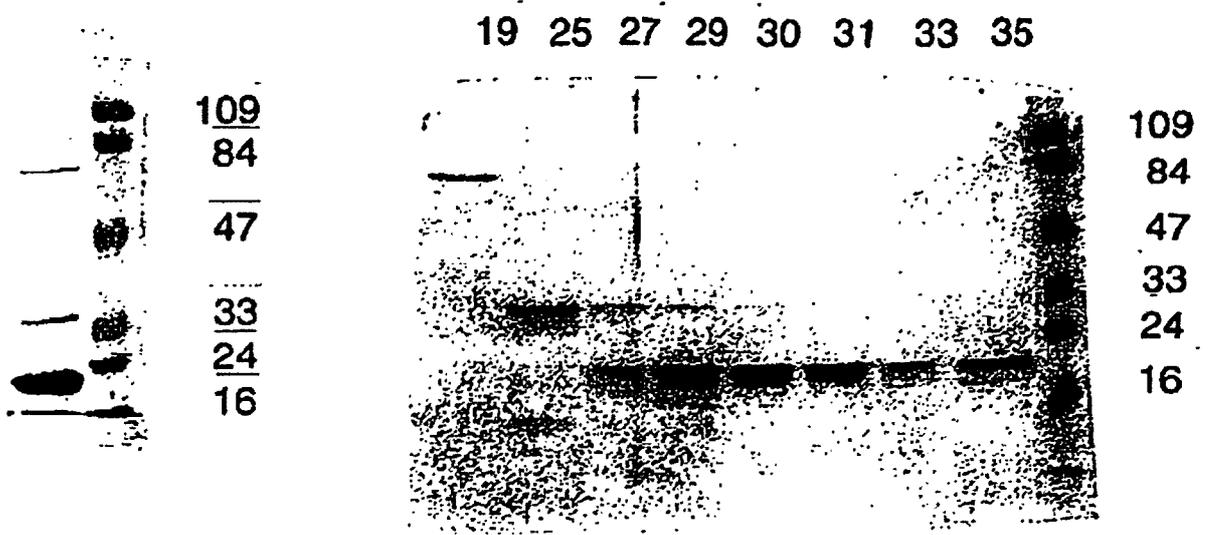


Fig. 9A

Fig. 9B

Separación de celulasa 50 K y celulasa B 50 K del Pico III/IV mediante cromatografía sobre SP-Sepharose

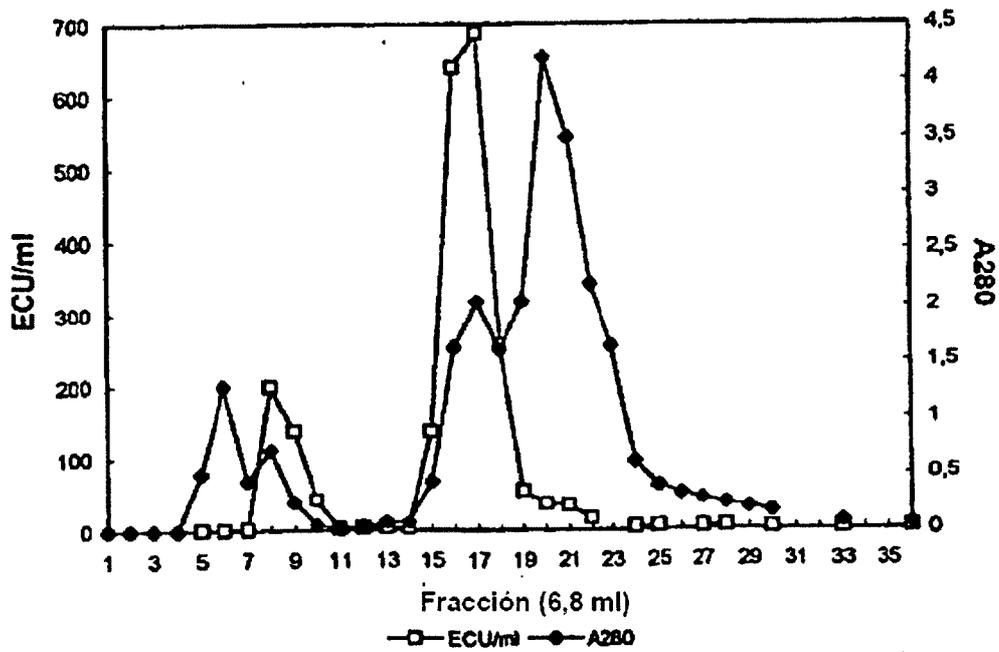


Fig. 10

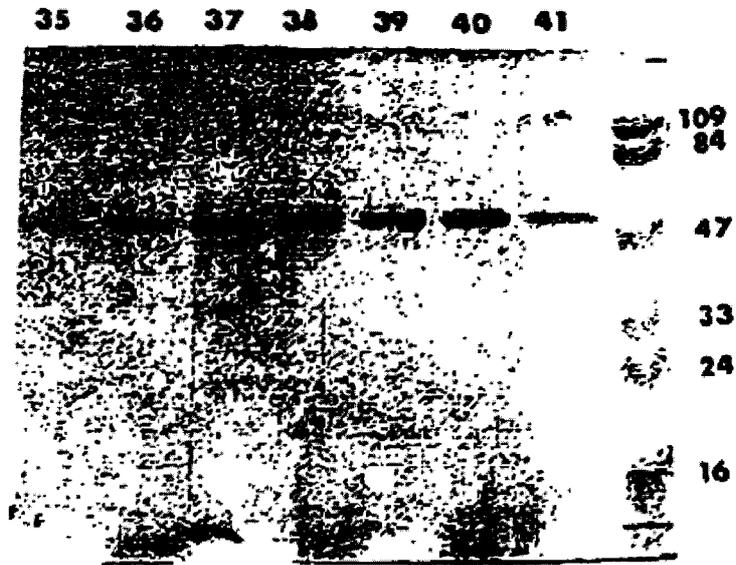


Fig. 11A

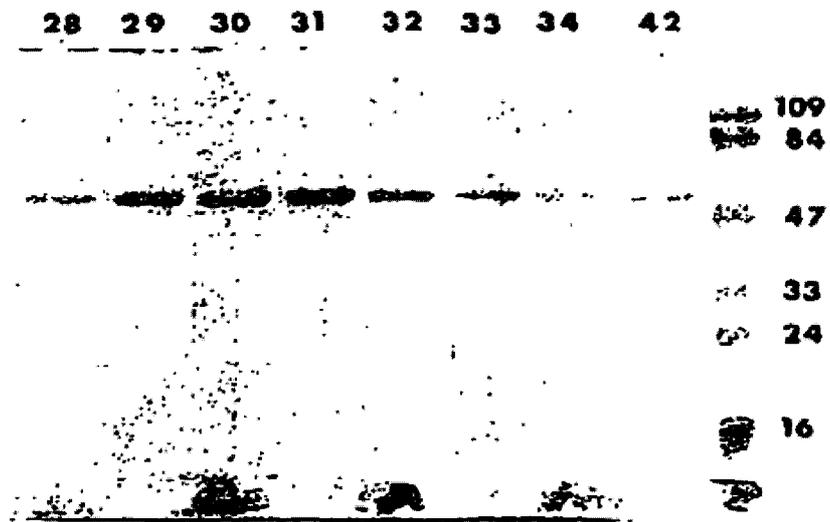


Fig. 11B

Dependencia en la temperatura de la actividad de endoglucanasa de celulasa 50 K a pH 7,0

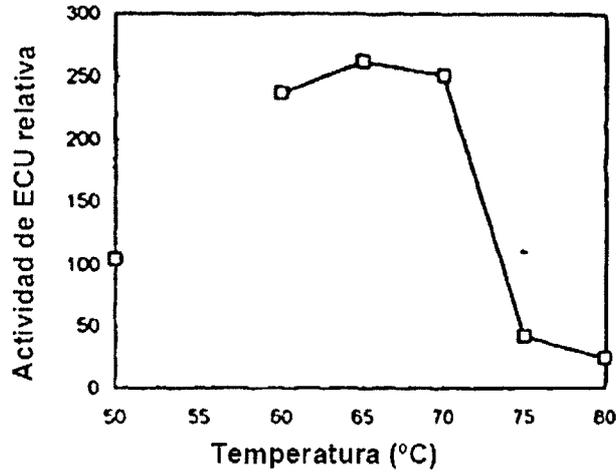


Fig. 12

Dependencia en el pH de la actividad de endoglucanasa de celulasa 50 K a 50 °C y 70 °C

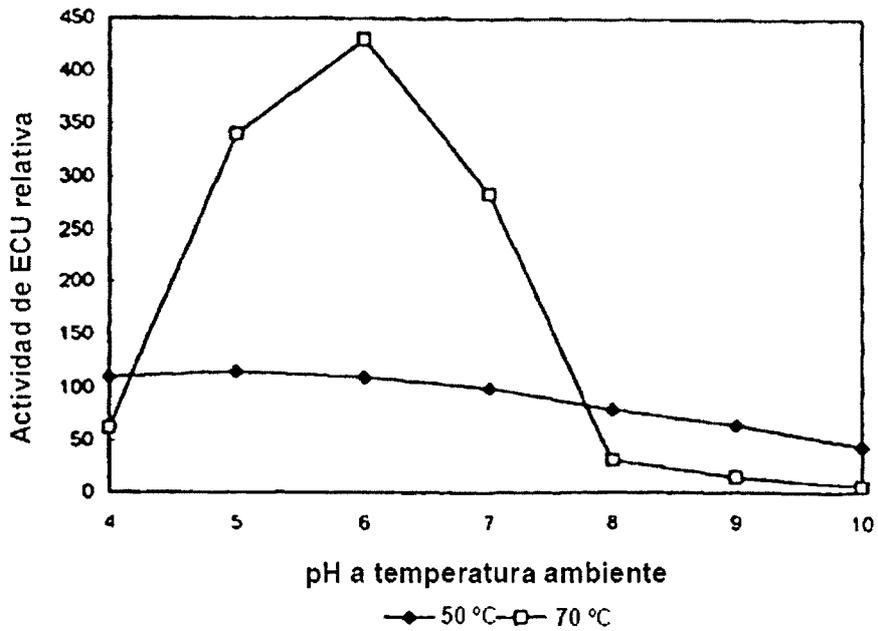


Fig. 13

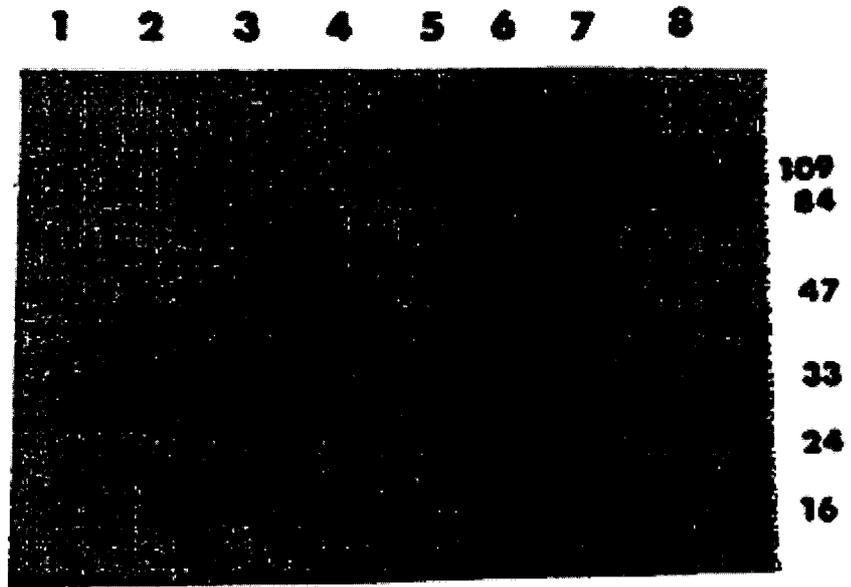


Fig. 14

Celulasa 20 K: dependencia en la temperatura de la actividad de endoglucanasa a pH 7,0 (tiempos de reacción de 10 min)

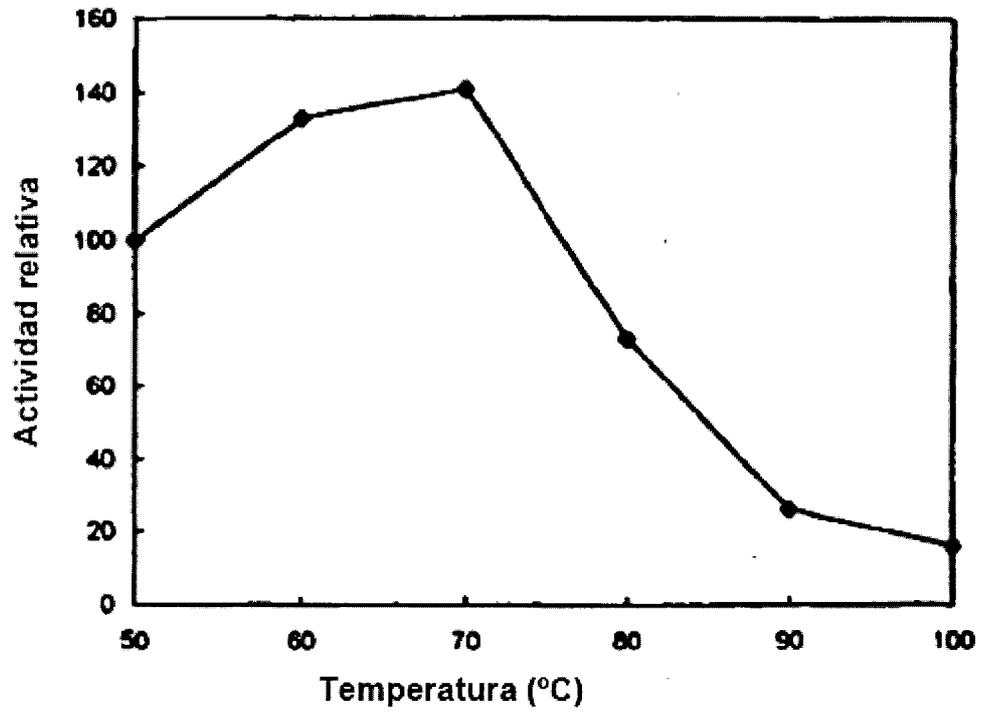


Fig. 15

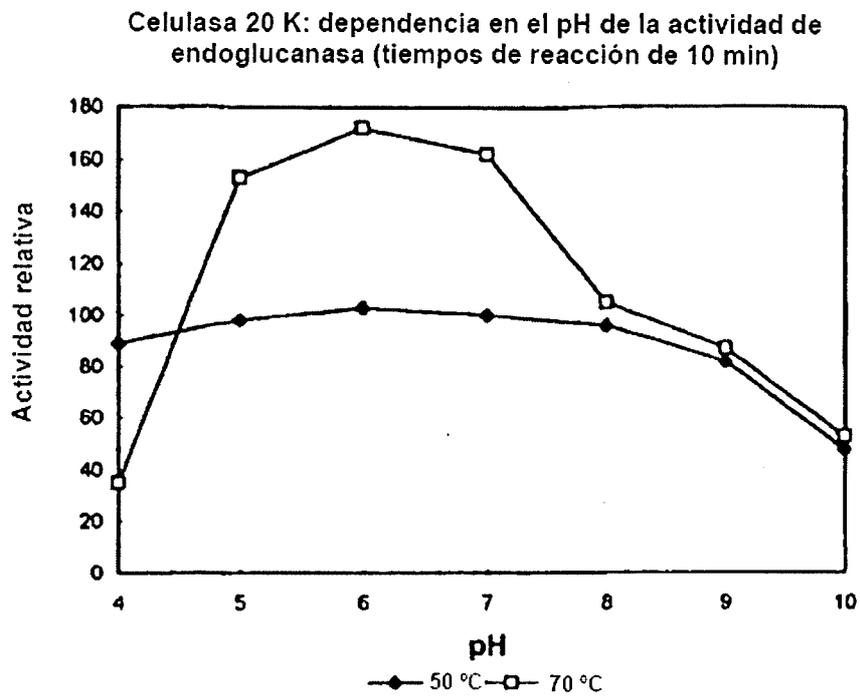


Fig. 16A

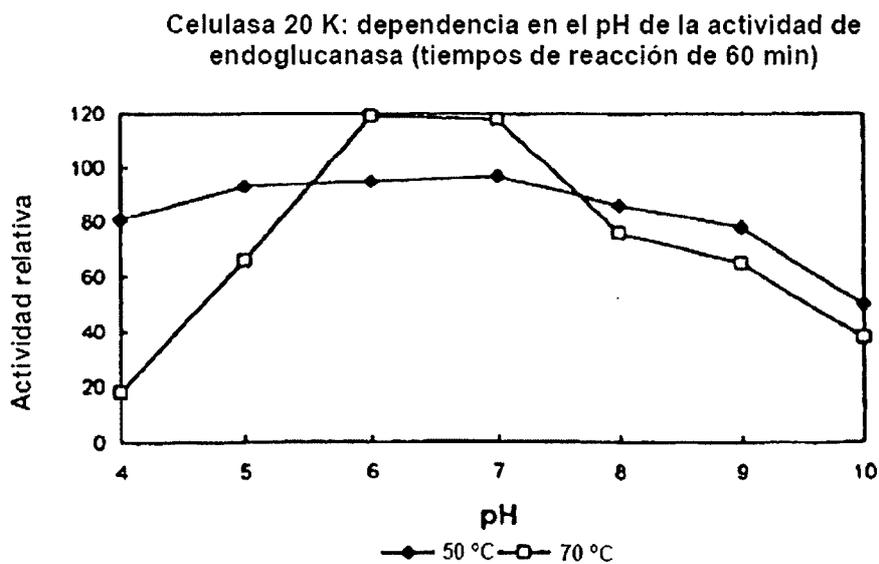


Fig. 16B

429
ANGQSTRYWDCCCKPSCGWRGKGPVNQPVYS

430
YGGISSR

431
CGWR

432
PSCGWR

433
YWDCCCK

439
QECDSFPEPLKPGCQWR

fr 9
RHDDGGFA

fr 14
YWDCCCKP

fr 16
GKGPVNQPVYSCDANFQR

fr 17
VQCPEELVAR

fr 28
DWFQNADNPSFTFER

fr 30
TMVVQSTSTGGDLGSNHFDLNIPGGGVGLF

Fig. 17

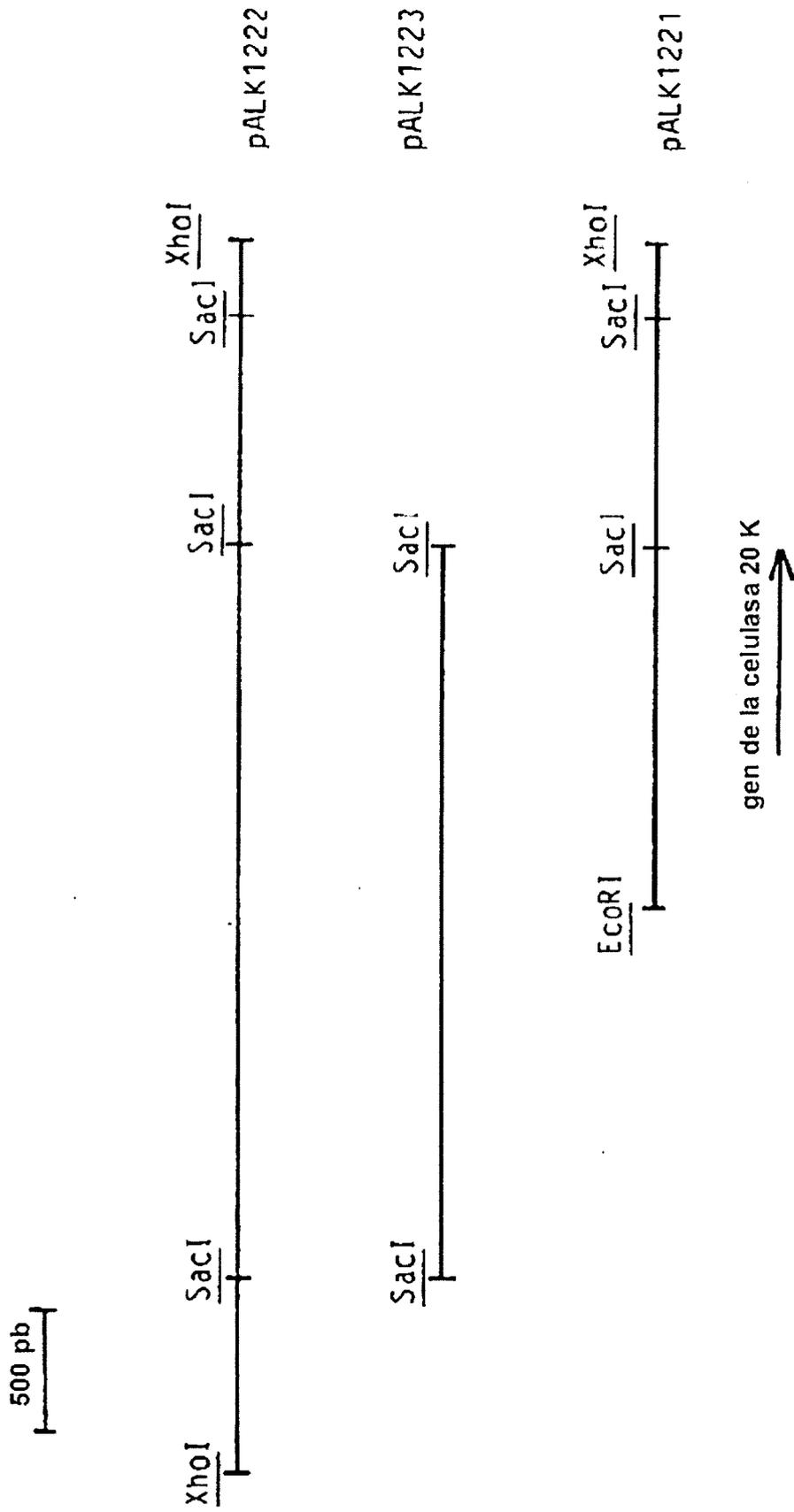


Fig. 18

```

-30          -10          10          30          50
TCGCCCCTAACCGAGAACCAAGACTCCAGAAATGGCGTCTACTCCCGTTCTCCGGGGCCCTCTCGGGCCGAGCATTGCCCCCTCGGGCCCTCGCCGCCAA
70          90          110          130          150
      H R S T P V L R A L L A A A L P L G A L A A N
CGCTCAGTCCACGAGgtaactgatcaacecegeectattacgegtgacgaccggaccgggttcaggggctcactgctcaaccgcatccagATACIGGSACTGCT
170        G Q S T R          190        210        230        250
      Y W D C C
GCAAGCCGTGTCGGGGTGGCGGGAAGGGCCCGTGAACAGAGCCCGTCTACTCGTGGACGGCAACTCCAGGCATCCACGACTTCGATGCCGCTC
270        K P S C G W R G K G P V N Q P V Y S C D A N F Q R I H D F D A V S
      290        310        330        350
GGCTCCGAGGGCCCGCTTCTCGTGGCCGACACAGCCCTGGCCATTATGACAACTCTCGTACGGCTTCGGGGGACTGCACCTCAGCGGC
370        G C E G G P A F S C A D H S P W A I N D N L S Y G F A A T A L S C
      390        410        430        450
CAGACCGAGGAGTCGTGCTGCTGCCCTGCTACGCGtgggtgcttggcccaacgtgggtgattccggggttcagaccactgaccaccagcgcaccggctc
470        Q T E S W C C A C Y A          510        530        550
ggcagTGTGACCTTACATCGGTCCCGTGGCCGGCAAGACCCTGGTCCAGTCCAGCCAGCAGGGCGGACCTCGGCAGCAACCACCTCGACCTCA
570        L T F T S G P V A G K T M V V Q S T S T G G D L G S N H F D L N
      590        610        630        650
ACATCCCGGGGGCGTCCGCTCTTCGACGGTGCACCTCCAGTTCGGCGCTCCCGGGCACGGTACGGCGCATCTCGTCCGGCCAGAGTG
670        I P G G G V G L F D G C T P Q F G G L P G A R Y G G I S S R Q E C
      690        710        730        750
CGACTGTTCCCGAGCCGCTCAAGCCGGCTGCCAGTGGCGCTTCAGACCGCCCGACACCCCGTCCCTTACCTTCGAGGGGTCCAGTGC
770        D S F P E P L K P G C Q W R F D W F Q N A D N P S F T F E R V Q C
      790        810        830        850
CCCGAGAGCTGGTCCCTCGGACCGCTGCAGGCCACGACGGCGCTTCGCCGTCTTCAAGGCCCCAGCCGCTGANTCCGTTTTTGGSCAGTGC
870        P E E L V A R T G C R R H D D G G F A V F K A P S A
      890
CGTGTACCGCAGCTACGTGGNACGACCTGGAGCTC

```

Fig. 19

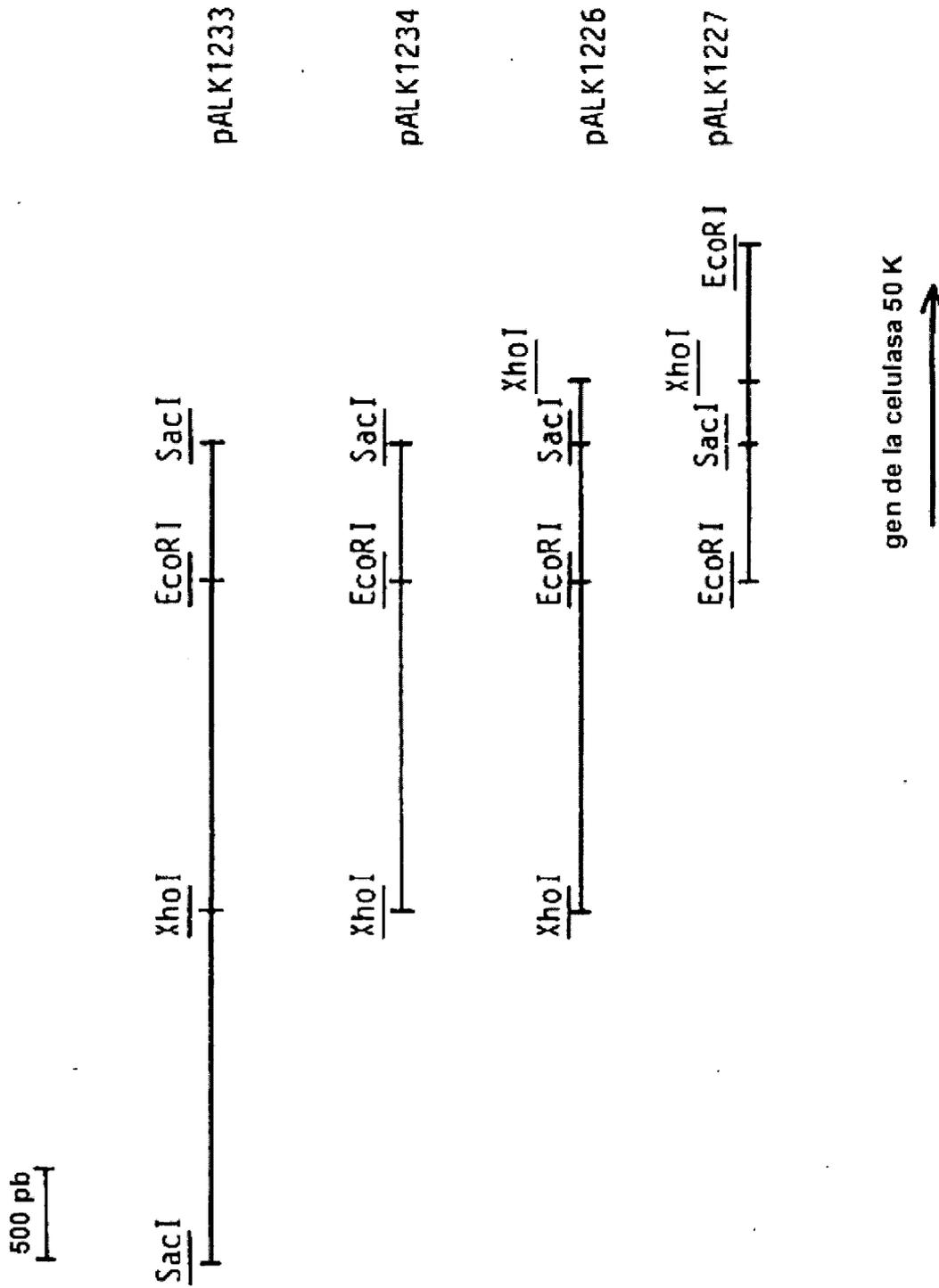


Fig. 20

-230 -190 -170 -150
 GAATTGGGGGTTGCCAGGGAGTCTACAGGGTGGTGGAGGGGATGGAGGGAAGCA TATATGGGACCTTTTGCTCTC
 -130 -110 -90 -70
 GCCGGTCCCTCTGCCACGTTCCCTTCCCTTCCCTGGTGTGTTGTTGCTTCCCTTCCATCCGACAAACCAACCTGCTCCGGGTGAACTCGCA
 -30 -10 30 50
 GAGCGCTTCGGAGCAGACAGACAGACGACATCGCAACATCGCCCTCTGGCGGGGTCTGGGCTCTGGGCTCTGGCCACGGCCAGAAAGC
 M T R N I A L L G A S A L L G L A H G A Q K P
 70 90 110 130 150
 CGGGCAGACGCCCGAGGTGCCCCAGCTGACCGAGCTTCCGGTCCACCAAGCGGGTCCAGCCCGGACCAACTACATTGCTGGACTGGCT
 G E T P E V H P Q L T T F R C T K A D G C Q P R T N Y I V L D S L
 170 190 210 230 250
 CTCGCACCCGGTGCACAGGTGGACAACGACTACAACTGGCGGACTGGGGCAGAGCCCAACCGGACGGGTGCCCGGACGTGCGAGTCTGCGCGCGC
 S H P V H Q V D N D Y N C G D W C Q K P N A T A C P D V E S C A R
 270 290 310 330 350
 AACTGCATCTGACGGCGCTGCCACTACGCCAGCACCGGCTCACCGACCGGACACCTGCTGCTCCCTCCCTGACGAGCTGCTGAGCGCCGCTGCA
 N C I H E G V P D Y S Q H C V T T S D T S L R L Q L V D C R L V T
 370 390 410 430 450
 CGCCGGCGTCTACTGCTCAGAGACCGGACCGCTACGAGATGATGACCTGACCGCGGAGGTTCAGCTTTGAGGTGACGCCACCAAGCTGCCC
 P R V Y L L D E T E H R Y E M H H L T G Q E F T F E V D A T K L P
 470 490 510 530 550
 CTGGGCATGAACAGCGCCCTTACCTGTCCGAGATGGACCGACCGGCGGAGCGGAGCTCAACCCCGGCGGTGCCCTACTACGGCACCCGGCTACTGCG
 C G M N S A L Y L S E H D P T G A R S E L N P G G A Y Y G T G Y C
 570 590 610 630 650
 GACGCCAGTCTGTGGCCATTCATCAAGGCATTGTGTGTGCTCCCTTGGCCCCCTGAAATAGATGTACCTGGGTGCTAACCCCGGGG
 D A O C F V T P F I N G I 710 730 750
 TgtgcaccbaaacagGCCAACATCGAGGGCAAGCGCTCGTCTGCAACGAGATGGACATGCGGACCGCCCACTCGGGCCGACCGCCTGGCGCCGAC
 G N I E C K G S C C N E M D I W E A N S R A T H V A P H
 770 790 810 830 850
 ACGTGAACAGCGGTCTGTACATGTGGAGCGCCGAGTGGAGTACAGCGCTGTGCGACAAAGGAGCGGTGCGGGTGAACCCCGTACCGGGTCA
 T C N Q T G L Y M C E G A E C E Y D G V C D K D G C G W N P Y R V N

Fig. 21A

```

870          890          910          930          950
AATCACCAGTACTACGGCAACTCGGACCGGTTCCCGGTCGACACGGCGGGCCCTTCACCGTGGTGACCGCAGTTCCCGCGGACCGCCGGAGGCGCGGCT
I T D Y Y G N S D A F R V D T R R P F T V V T Q F P A D A E G R L
970          990          1010          1030          1050
CGAGAGCATCCACGGGTGTACGTGCAGGACGGCAAGGTGATCGAGTGTACGTGCGTGCAGCGCGGGCCCTGCCCGGGACCGGACTCGCTCAACGACGAG
E S I H R L Y V Q D G K V I E S Y V V D A P G L P R T D S L N D E
1070          1090          1110          1130          1150
TTCTCGCGCCACGGCGGCTACCTCGACCTCGGGCGCACGGGGCATGGGGCAGCCATGACGGGGCATGGTCTGGCCATGAGCATCT
F C A A T G A A R Y L D L G G T A G M G D A M T R G H V L A M S I W
1170          1190          1210          1230          1250
GGTGGACGAGTCCGGCTTCATGAACTGGCTCGACAGCGGGCGAGCGGGCCCTGCCCTGCCCGGACCGAGGGCCCAAGAACATTTGTC AAGGTCGAGCC
W D E S G F H N W L D S G E A G P C L P D E G D P K N I V K V E P
1270          1290          1310          1330          1350
CAGCCCCGAGTCCACCTACAGCAACTCGGCTGGGGGAGATCGGTCGACCTTGGAGCGCGGAGTCCGACGACGGCGGACCGCGGACGCTGCTAGATA
S P E V T Y S N L R W G E I G S T F E A E S D D D G D G D D C
1370          1390          1410          1430          1450
ACTAACTAGTGGCGGAAAGGGGGGATGCGTAACTTACATACAGCCCGGAGTTGTTTTGAGTGTAGAGTATTGAGCTTTCGATGTGTTAGTTGAGTG
1470          1490          1510          1530          1550
GAATGGAAAATTCCGGCTCTTTGCCCGGTTGGGATAAACAAATAGTCGGCTGGTGCAATTTGTGACACTTCAATTTGGCTGTGGCTGGTGACAGACA
1570          1590          1610          1630          1650
CGGAGCGGTGATGCCCGACACCCAGAAATAATTCCGCATGGTTGTTATTGCTTTAAATCGGAGGCTGATGCTCATCTCTTCGAATTC

```

Fig. 21B

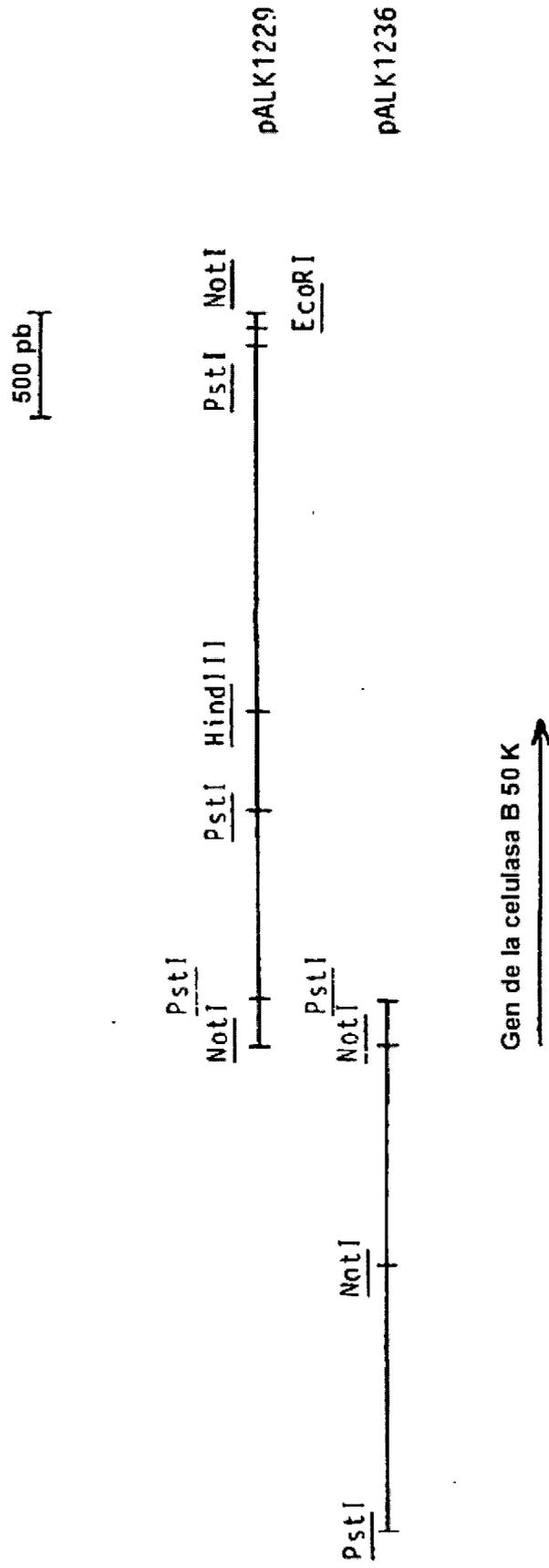


Fig. 22


```

950          970          990          1010          1030
GTGCCCTACTCGGAGGACCCGCTTCGCGGGCAAGTGGCGACCCCAACGGCTCGGACTACAACCCCTACCGCATGGGCAACCCCGACTTCTACGGCAAGGG
G T Y S E D R F A G K C D A N G C D Y N P Y R M G N P D F Y G K G
1050          1070          1090          1110          1130
CAAGACGCTCGACACCCAGCCCAAGTTCACGtgctgaccccttgtggcgcaacctttctctctgctgacctgaaactgacaactgcaactgcaactgcttcttctg
K T L D T S R K F T
1150          1170          1190          1210          1230
gctgcbgCGTCTCCCGTTCGAGGAGACAAGCTCTCCCACTTCCAGGACGGCCGCAAGATCGAGATCCCGCCCGGACGTGGGAGGGCAT
V V S R F E E N K L S Q Y F I Q D G R K I E I P P P T W E G M
1250          1270          1290          1310          1330
GCCAACAGCAGGAGATCACCCCGAGCTCTGCTCCACCATGTTCCGATGTGTCAACGACCCGCAACCGCTTCGAGGAGGTCGGCGCTTCGAGCAGCTG
P N S S E I T P E L C S T M F D V F N D R N R F E E V G G F E Q L
1350          1370          1390          1410          1430
AACAAAGCCCTCCGGGTTCCCATGGTCCGTCATGTCCATCTGGACGACgtaagtaaccggcgacctccttagccacaacaagcgcgcaccccggggagggc
N N A L R V P M V L V M S I W D D
1450          1470          1490          1510          1530
acgccatcgctgctgctaacaacggagaccgcttctgtagCACIACGCCAACATGCTCTGGCTCGACTCCATCTACCCCGCCGAGAGGGCCAGCCCGCGCG
H Y A N M L W L D S I Y P P E K E G Q P G A
1550          1570          1590          1610          1630
CCGCCCCGTGGGACTGCCCGGACTCGGGTGTCCCGCGGAGGCTCAGTTCGCGGCGtaagacttgcccccgaccccccaagcttccactt
A R G D C P T D S G V P A E V E A Q F P D A
1650          1670          1690          1710          1730
ctggatgccgaatgctaacaacggaacagCCAGGTCGTCTGGTCCAACATCCCGTTCGGCCCCCATCGGCTCGACCTACGACTTCTAAGCCCGGTCCATGC
Q V V W S N I R F G P I G S T Y D F
1750          1770          1790          1810          1830
ACTCGACGCCCTGGGGCCGTCACGCCCCCGCCCTCCCGGGAACACTCTCCGTCGGGGGCTCCAAAGCATTTTGGCCCTCAAGTTTTTTTCGTTT

```

Fig. 23B

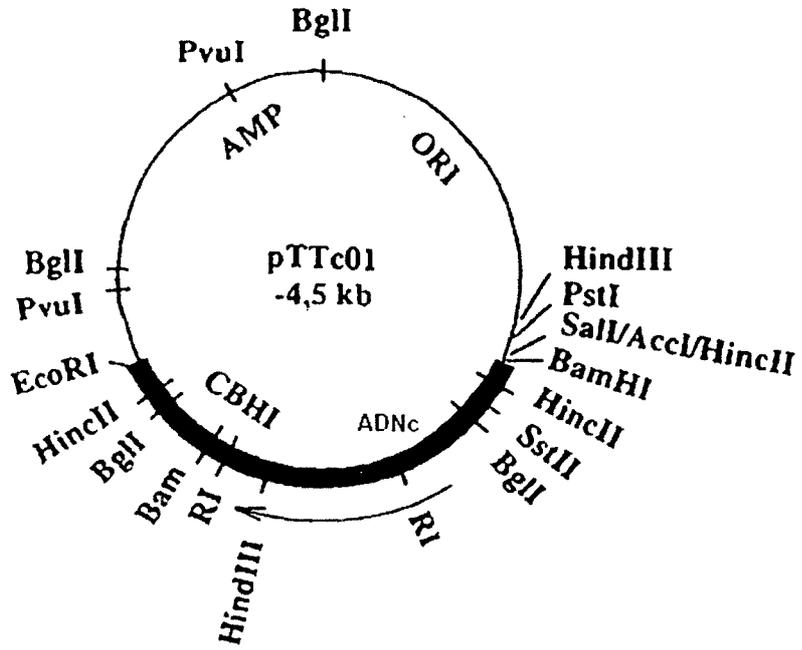


Fig. 24

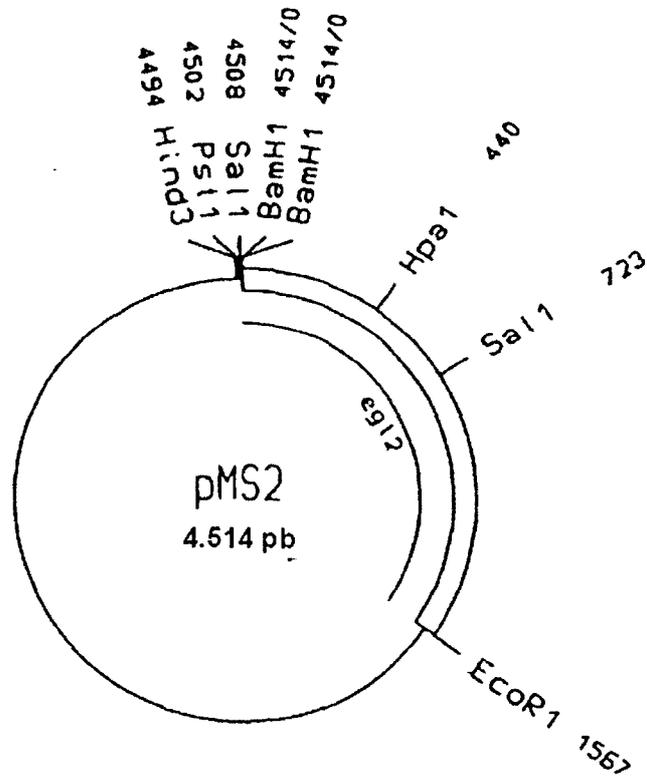


Fig. 25

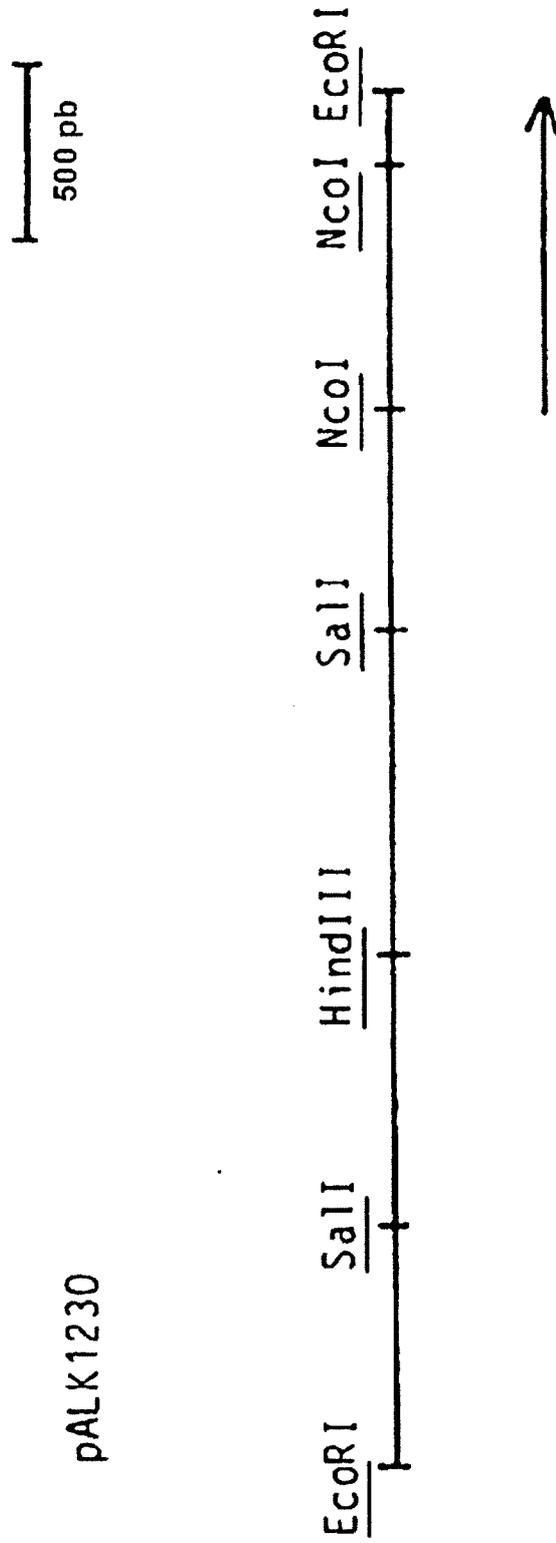


Fig. 26

10 30 50 70 90
 CCATGGACCGNACTGGGACGCTTCTGGCCCGAGCTGAAAGACCCAGAGCATCCAGACCCGGCAACCAGTGCACCCAGGAGATGAAGGTCACGAGAACAT
 110 130 150 170 190
 TGACGGCTGGCTGACAGCCCTGCCCGGCAACGTCGCCATACACGGTCCGACCCCGGCTCTGGTAAGTCAAGAGAGATGATGCCCTACCTACCTCCACCT
 210 230 250 270 290
 TCCCACCCAGCCGCAATACTTTCTCCCTCCCGTGCCTTATCTTCAACGCCCGGACACTGACAGACCCCGCTCGTCCCGAGCCGGCAACCCCGGCA
 310 330 350 370 390
 ACGCGCGGCGCAGCNAACCCGGGCAACGGGGGGGGGGTGCACCGTCCACAAAGTGGGGCCAGTGGCGGCGCATCGGCTACTCGGGCTGACCCACCCTG
 410 430 450 470 490
 CAAGCGCGCTCGACCTGCCCGGCCAGAACGACTACTCTGCAGTGCCTGTAAAGCGCCGCTGGCTAGCTGGCCGAGCCGGGGGTTCTTCAATTGG
 K A G S T C P A Q N E Y S Q C L *
 510 530 550 570 590
 TTGAGCAATAGAACAGGATTTCCGGCTCGTTGGCAGCGCGCGGGGATGGTGTGTACAAATTCAAAGACCTCAGTACCGAGGGACCTGGAAAGGA
 610 630 650 670 690
 GTCAGTCTGCTGTACGGAGGCTGGCTGCCCGCGTGGCGGCTGGCAAGGTAGATAGCCCTTCATTGCTGTAAGTACTAGTATGCTATATACCCTGACCATI
 710 730 750 770 790
 TCCAGCCCCATGGTGTGAACACMGTAGCAGGCTTCCAGTTCCAGCCCTGGGCAATTGTCACGATATCTCTGGTCCACTATATGATATGGGCAATGAGC
 810 830 850 870
 GAGTCGAGAAATGTACCCGGNAATCGTAGTGACCTGGCCACTGGCCGTTCTACCAACCGTAGGATGAAAGTGAATCTCGAATTC

Fig. 27

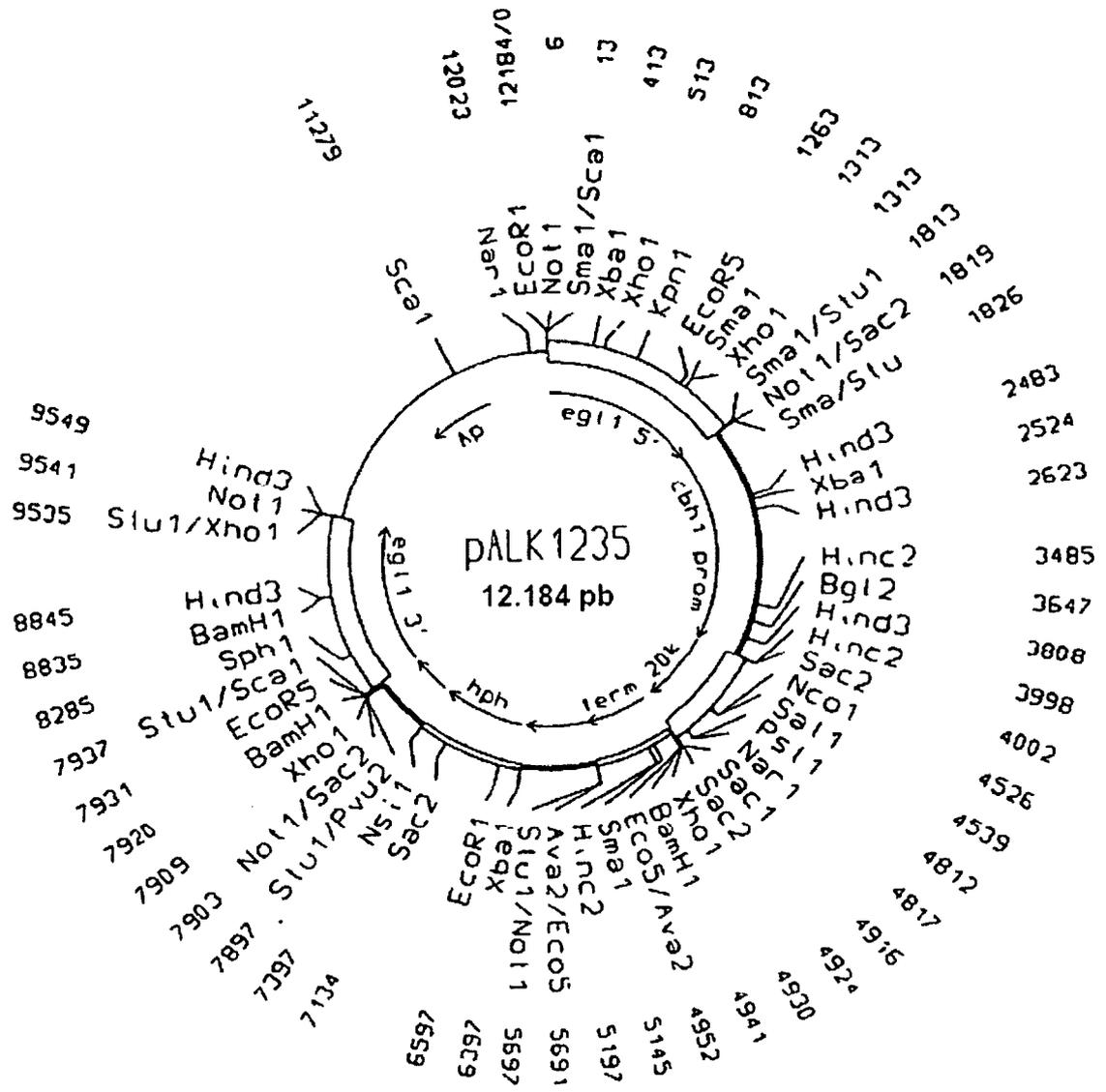


Fig. 29

1 2 3 4 5 6



Fig. 30

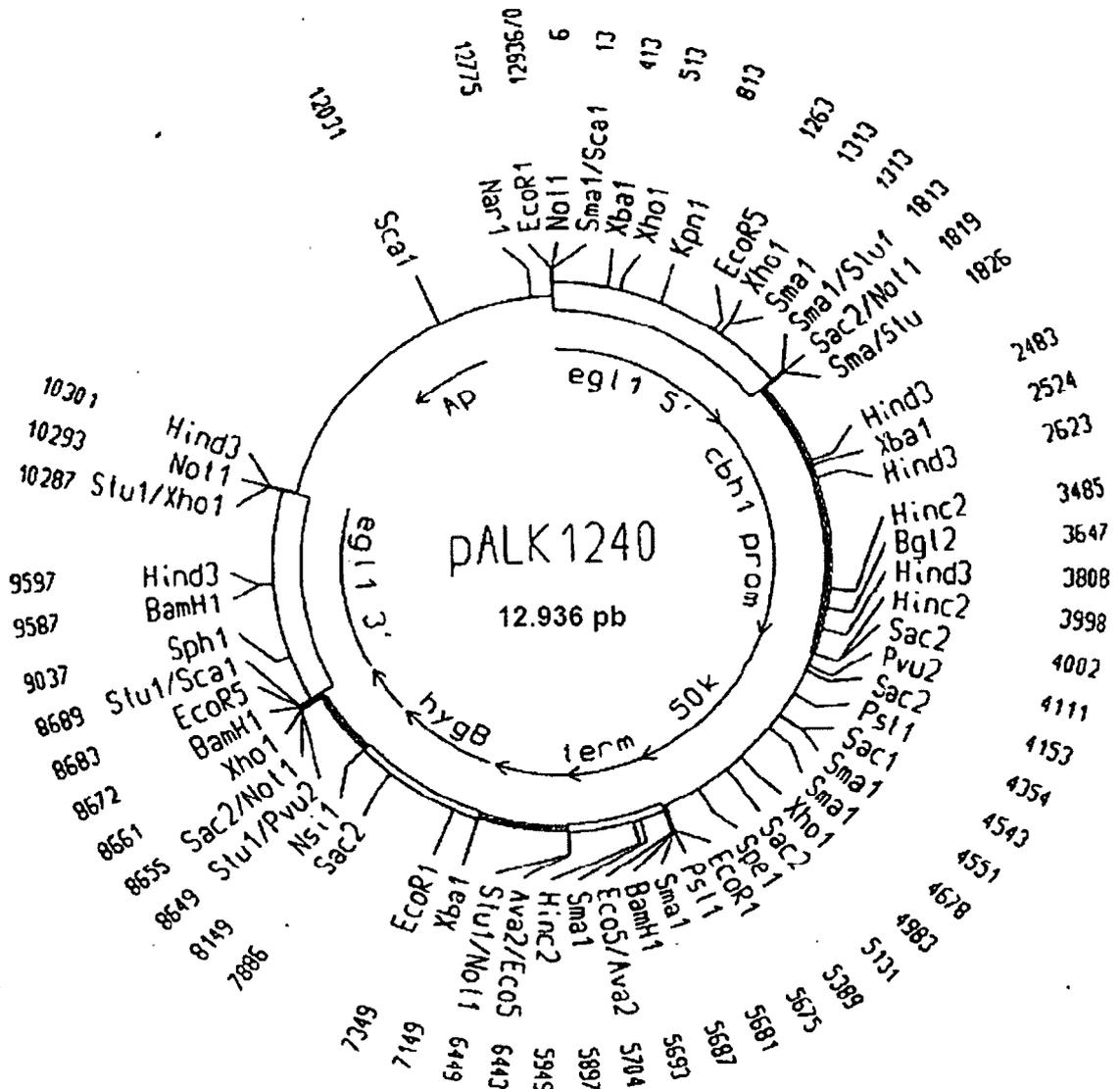


Fig. 32