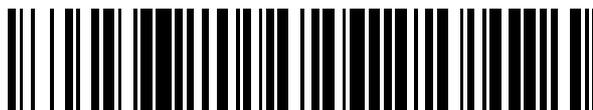


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 542 135**

51 Int. Cl.:

C12N 9/42 (2006.01)

C11D 3/386 (2006.01)

D06M 16/00 (2006.01)

C12N 1/15 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.11.2001 E 01997189 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.06.2015 EP 1344820**

54 Título: **Endoglucanasa originada a partir de zigomicetos que carece del dominio de enlace a celulosa**

30 Prioridad:

21.11.2000 JP 2000354296

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

31.07.2015

73 Titular/es:

**MEIJI SEIKA PHARMA CO., LTD. (100.0%)
4-16, KYOBASHI 2-CHOME, CHUO-KU
TOKYO 104-8002, JP**

72 Inventor/es:

**NAKANE, AKITAKA;
BABA, YUKO,;
KOGA, JINICHIRO y
KUBOTA, HIDETOSHI**

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 542 135 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

Endoglucanasa originada a partir de zigomicetos que carece del dominio de enlace a celulosa

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a una enzima endoglucanasa, cuyo dominio de enlace a celulosa ha sido suprimido, con efectos mejorados en el tratamiento de tejidos que contienen celulosa y con aplicaciones relacionadas con detergentes o pasta de papel, un método para producir la misma, y una preparación de celulasa con efectos mejorados.

10 Antecedentes de la técnica

15 El tratamiento de tejidos que contienen celulosa con celulasa se lleva a cabo para proporcionarle a los tejidos propiedades deseadas. Por ejemplo, el tratamiento con celulasa se realiza en la industria textil con el fin de mejorar la sensación al tacto y la apariencia de los tejidos que contienen celulosa o para dar a los tejidos coloreados que contienen celulosa un aspecto de material "lavado a la piedra", es decir, cambio parcial del color (Patente Europea No. 307.564).

20 Se sabe que los textiles que contienen celulosa teñida forman pelusa después de lavados repetidos y pierden su viveza. La incorporación de celulasa en un detergente puede quitar la pelusa y hacer que el color de los tejidos sea más vivo, es decir, aclara el color (Patente Europea No. 220.016). Por lo tanto, los detergentes que contienen celulasa se encuentran comercialmente disponibles, principalmente en Europa y América.

25 En la solicitud antes mencionada, se usan principalmente celulasas derivadas de *Trichoderma* o *Humicola* (ambos son hongos que pudren la madera). Las preparaciones de celulasa utilizadas recientemente se producen mediante el aislamiento de endoglucanasas, que son muy activas en el tratamiento de tejidos, a partir de estos componentes de celulasa y mejoran sus efectos mediante ingeniería genética con el fin de mejorar la eficiencia comercial. Ejemplos de estas endoglucanasas altamente activas incluyen: EG V derivada de *Humicola insolens* (WO 91/17243) y NCE4 (WO 98/03640) que actúan fuertemente en tejidos de algodón; y RCE I, RCE II, y RCE III derivadas de *Rhizopus oryzae*, MCE I y MCE II derivadas de *Mucor circinelloides*, y PCE I derivada de *Phycomyces nitens* (WO 00/24879) que actúan fuertemente en telas de liocel.

30 Entre las endoglucanasas utilizadas en las aplicaciones mencionadas, se presume que EG V (WO 91/17243), NCE4 (WO 98/03640), y RCE I, RCE II, RCE III, MCE I, MCE II, y PCE I (WO 00/24879) pertenecen a la misma familia (familia 45) a causa de sus secuencias de aminoácidos, y estas enzimas tienen propiedades estructurales comunes. Específicamente, cada una de estas endoglucanasas comprende un dominio de enlace a celulosa para unión a la celulosa como su sustrato (en lo sucesivo denominado "DEC"), un dominio catalítico activo como un centro activo (denominado en lo sucesivo "DCA"), y un dominio enlazador con un alto contenido de residuos de aminoácidos hidrofílicos para el enlazamiento de estos dos dominios.

35 40 EG V, una endoglucanasa que pertenece a la familia 45, fue estudiada usando una enzima, cuyo dominio DEC había sido suprimido (publicación de la patente japonesa (traducción PCT) No. 9-500667, y Enzyme and Microbial Technology, 27 (2000), 325-329). Sin embargo, no se ha reportado ninguna mejora con respecto a la actividad endoglucanasa para quitar la pelusa de las telas de celulosa a través de la eliminación del dominio de enlazamiento a celulosa (DEC). Todavía hay muchas cuestiones sin aclarar relativas al papel del dominio de enlace a celulosa de la endoglucanasa en la exposición de la actividad endoglucanasa, y la investigación de los mismos está limitada a la celulasa derivada de un hongo específico, a saber, *Trichoderma* (Kiovuia, A. y colaboradores, *Trichoderma Gliocladium*, 2, (1998), 3-23). No ha habido una investigación detallada sobre el dominio de enlace a celulosa de la endoglucanasa derivada de *Zygomycetes*.

45 50 Hasta el presente, se han desarrollado varias estrategias con el fin de mejorar el efecto o el desempeño de la celulasa en las aplicaciones anteriores. Por ejemplo, se aplicó una mutación a una enzima para mejorarla, o se modificaron las condiciones de cultivo con el fin de mejorar la productividad de la enzima. Sin embargo, debido al alto coste de celulasa que se va a utilizar, se debe mejorar aún más el efecto de la celulasa con el fin de proporcionar una preparación de celulasa que valga la pena utilizar a nivel industrialmente práctico. Las preparaciones de celulasa utilizadas recientemente se producen reforzando únicamente la endoglucanasa, que es altamente activa en el tratamiento de tejidos, mediante ingeniería genética con el fin de mejorar la eficiencia comercial. Por consiguiente, es deseable mejorar aún más la actividad de tal celulasa altamente activa.

55 Descripción de la invención

60 Un objetivo de la presente invención es proporcionar una endoglucanasa con actividad mejorada, una preparación de celulasa que la contenga, y diferentes métodos para el tratamiento de tejidos que contienen celulosa utilizando la misma.

Los presentes inventores han realizado estudios concentrados en la endoglucanasa derivada de *Zygomycetes* relacionados con el papel de un dominio de enlace a celulosa cuando actúa sobre tejidos que contienen celulosa. Como resultado, han encontrado que una endoglucanasa que carece del dominio de enlace a celulosa tiene mucho mayor actividad de eliminación de pelusa de algodón, liocel, o similares, en comparación a una endoglucanasa que tiene un dominio de enlace a celulosa. Esto llevó a la culminación de la presente invención.

Específicamente, la presente invención se refiere a una endoglucanasa de *Zygomycetes* (algunas veces llamada aquí como endoglucanasa derivada de *Zygomycetes*) que tiene efectos mejorados para la eliminación de pelusa de los tejidos que contienen celulosa (por ejemplo, una enzima que comprende secuencias de aminoácidos de RCE I, RCE II, RCE III, MCE I, MCE II, y PCE I, que alcanza mejores efectos de eliminación de pelusa de los tejidos que contienen celulosa a través de la supresión del dominio de enlace a celulosa, y que exhibe actividad endoglucanasa, una proteína modificada de la misma que muestra actividad endoglucanasa y una preparación de celulasa que comprende tal endoglucanasa. La presente invención se refiere también a una endoglucanasa que fue producida en una célula huésped transformada con un gen que codifica tal endoglucanasa, y se refiere además a un método para tratar tejidos que contienen celulosa utilizando la endoglucanasa, que alcanzó una mejor actividad a través de la supresión del dominio de enlace a celulosa o la preparación de celulasa.

Más específicamente, la presente invención incluye lo siguiente.

(1) Una proteína que es una endoglucanasa que carece del dominio de enlace a celulosa de la secuencia de aminoácidos de una endoglucanasa de *Zygomycetes* y que exhibe actividad endoglucanasa, en donde la proteína tiene al menos dos veces mayor actividad de eliminación de pelusa de los tejidos que contienen celulosa que la proteína original que tiene el dominio de enlace a celulosa y en donde es una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en las SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 7, 9, o 11, en donde el dominio de enlace a celulosa ha sido suprimido de la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 7, 9, o 11, y que exhibe actividad endoglucanasa, o que es una proteína modificada de la misma que exhibe actividad endoglucanasa y que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90% de identidad con dicha secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 7, 9, o 11, en donde el dominio de enlace a celulosa ha sido suprimido de la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 7, 9, o 11.

(2) Una proteína de acuerdo con (1) que es una endoglucanasa perteneciente a la familia 45 que carece del dominio de enlace a celulosa de la secuencia de aminoácidos de una endoglucanasa de *Zygomycetes* y que muestra actividad endoglucanasa.

(3) La proteína de acuerdo con (1) o (2), en donde los *Zygomycetes* son microorganismos seleccionados del grupo que consta de los que pertenecen a *Rhizopus*, *Mucor* y *Phycomyces*.

(4) La proteína de acuerdo con (3), en donde los *Zygomycetes* son microorganismos que pertenecen al *Rhizopus*.

(5) Un gen que codifica la proteína, o una proteína modificada de la misma, de acuerdo con uno cualquiera de (1) a (4).

(6) Un vector de expresión que comprende el gen de acuerdo con (5).

(7) Una célula huésped transformada con el vector de expresión de acuerdo con (6).

(8) La célula huésped de acuerdo con (7), que es un hongo filamentoso.

(9) La célula huésped de acuerdo con (8), que es un microorganismo que pertenece a *Humicola*.

(10) Un método para producir una proteína que comprende las etapas de cultivar la célula huésped de acuerdo con uno cualquiera de (7) a (9) y la recolección a partir de la célula huésped obtenida por la etapa de cultivo o su producto de cultivo la proteína, o proteína modificada del mismo, de acuerdo con uno cualquiera de (1) a (4).

(11) Una proteína producida por el método de acuerdo con (10).

(12) Una preparación de celulasa que comprende la proteína, o una proteína modificada de la misma, de acuerdo con uno cualquiera de (1) a (4) y (11).

(13) Un método para tratar tejidos que contienen celulosa que comprende una etapa de poner en contacto tejidos que contienen celulosa con la proteína, o una proteína modificada de la misma, de acuerdo con uno cualquiera de (1) a (4) y (11) o la preparación de celulasa de acuerdo con (12).

(14) Un método para reducir la velocidad a la que los tejidos que contienen celulosa forman pelusa o reducir la formación de pelusa en los tejidos que contienen celulosa que comprende una etapa de poner en contacto los tejidos que contienen celulosa con la proteína, o una proteína modificada de la misma, de acuerdo con uno cualquiera de (1) a (4) y (11) o la preparación de celulasa de acuerdo con (12).

(15) Un método de tratamiento de pérdida de peso de tejidos que contienen celulosa para mejorar la sensación táctil y la apariencia de los mismos que comprende una etapa de poner en contacto los tejidos que contienen celulosa con la proteína, o una proteína modificada de la misma, de acuerdo con uno cualquiera de (1) a (4) y (11) o la preparación de celulasa de acuerdo con (12).

(16) Un método de clarificación del color de tejidos coloreados que contienen celulosa que comprende una etapa de tratamiento de tejidos coloreados que contienen celulosa con la proteína, o una proteína modificada de la misma, de acuerdo con uno cualquiera de (1) a (4) y (11) o la preparación de celulasa de acuerdo con (12).

(17) Un método para proporcionar tejidos coloreados que contienen celulosa con un cambio parcial de color que comprende una etapa de tratar tejidos coloreados que contienen celulosa con la proteína o una proteína modificada de la misma, de acuerdo con uno cualquiera de (1) a (4) y (11) o la preparación de celulasa de acuerdo con (12).

(18) Un método para reducir la velocidad a la que los tejidos que contienen celulosa se vuelven rígidos o reducir la rigidez en los tejidos que contienen celulosa que comprende una etapa de tratamiento de tejidos que contienen celulosa con la proteína o una proteína modificada del mismo, de acuerdo con uno cualquiera de (1) a (4) y (11) o la preparación de celulasa de acuerdo con (12).

(19) El método de acuerdo con uno cualquiera de (13) a (18), en el que los tejidos son tratados a través de remojo, lavado, o enjuague de los mismos.

(20) Un aditivo para detergente que comprende la proteína, o una proteína modificada de la misma, de acuerdo con uno cualquiera de (1) a (4) y (11) o la preparación de celulasa de acuerdo con (12) en una forma granular no pulverulenta o una forma líquida estabilizada.

(21) Una composición detergente que comprende la proteína, o una proteína modificada de la misma, de acuerdo con uno cualquiera de (1) a (4) y (11) o la preparación de celulasa de acuerdo con (12).

(22) Un método de destintado de papel de desecho usando un agente de destintado en el que la proteína o una proteína modificada de la misma, de acuerdo con uno cualquiera de (1) a (4) y (11) o la preparación de celulasa de acuerdo con (12) se utiliza en una etapa de destintado de papel de desecho.

(23) Un método para mejorar el drenaje de la pasta de papel que comprende una etapa de tratamiento de la pasta de papel con la proteína, o una proteína modificada de la misma, de acuerdo con uno cualquiera de (1) a (4) y (11) o la preparación de celulasa de acuerdo con (12).

(24) Un método para mejorar la digestibilidad de los alimentos para animales que comprende una etapa de tratamiento de los alimentos para animales con la proteína, o una proteína modificada de la misma, de acuerdo con uno cualquiera de (1) a (4) y (11) o la preparación de celulasa de acuerdo con (12).

1. Endoglucanasa que carece de dominio de enlazamiento de celulosa

La presente invención se refiere a una proteína que es una endoglucanasa de *Zygomycetes* que carece del dominio de enlace a celulosa y que exhibe actividad endoglucanasa.

En esta descripción, "*Zygomycetes*" se refiere a microorganismos que pertenecen al filo *Zygomycota*, es decir, los hongos que generan zigosporas a través de la cópula gametangial sobre gametogonia. El filo *Zygomycota* incluye *Zygomycetes* y *Trichomycetes*. Los *Zygomycetes* utilizados en la presente invención no están particularmente limitados. Se prefieren los microorganismos pertenecientes a *Zygomycetes*, los pertenecientes a los *Mucorales* son más preferibles, aquellos que pertenecen a *Rhizopus*, *Mucor*, o *Phycomyces* son aún más preferibles, y los que pertenecen a los *Rhizopus* son los más preferibles.

En esta descripción, "actividad endoglucanasa" se refiere a la actividad CMCasa. Además, "actividad CMCasa" se refiere a una actividad para hidrolizar carboximetilcelulosa (CMC, Tokyo Kasei Kogyo, Japón), y una unidad se define como la cantidad de una enzima que produce azúcares reductores que corresponden a 1 μmol de glucosa por minuto mediante la medición de cantidades de los azúcares reductores liberados después de la incubación de una proteína de ensayo con una

Los ejemplos de la endoglucanasa derivada de *Zygomycetes* de acuerdo con la presente invención incluyen enzimas que exhiben actividad endoglucanasa derivada de *Rhizopus*, *Phycomyces*, o *Mucor* descritas en la publicación internacional WO 00/24879, es decir, RCE I (SEQ ID NO: 1), RCE II (SEQ ID NO: 3), RCE III (SEQ ID NO: 5), MCE I (SEQ ID NO: 7), MCE II (SEQ ID NO: 9), y PCE I (SEQ ID NO: 11). Las ubicaciones de cada uno de los dominios en la secuencia de aminoácidos de estas enzimas son como se muestran en la Tabla 1 a continuación.

Tabla 1

	DEC	Una porción en el dominio enlazador	DCA
SEQ ID NO: 1	3 a 38	99 a 108	109 a 315
SEQ ID NO: 3	3 a 38	127 a 136	137 a 343
	50 a 85		
SEQ ID NO: 5	3 a 40	122 a 131	132 a 337
SEQ ID NO: 7	3 a 40	104 a 113	114 a 316
SEQ ID NO: 9	3 a 40	153 a 162	163 a 365
	52 a 89		
SEQ ID NO: 11	3 a 40	115 a 124	125 a 327

Las secuencias de aminoácidos en los terminales N de RCE I, MCE I y PCE I son respectivamente identificados como se muestra en las SEQ ID Nos: 14,15, y 16 (WO 00/24879).

La proteína de acuerdo con la presente invención no debe comprender un dominio de enlace a celulosa en la endoglucanasa anteriormente mencionada. Con tal de que la proteína tenga actividad endoglucanasa, no hay ninguna limitación particular sobre la estructura de otros dominios. Por consiguiente, la proteína de la presente invención puede o no puede comprender un dominio enlazador. La proteína puede comprender alternativamente una porción de un dominio enlazador, y es preferible si la proteína retiene un fragmento de un dominio enlazador que comprende aproximadamente 10 residuos de aminoácidos.

El otro aspecto de la presente invención se refiere a una proteína que comprende cualquiera de las secuencias de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 1 (RCE I), SEQ ID NO: 3 (RCE II), SEQ ID NO: 5 (RCE III), SEQ ID NO: 7 (MCE I), SEQ ID NO: 9 (MCE II), o SEQ ID NO: 11 (PCE I), en donde el dominio de enlace a celulosa ha sido suprimido de la misma, y que presenta actividad endoglucanasa. La presente invención se refiere además a una proteína modificada y un homólogo de dicha proteína que exhibe actividad endoglucanasa.

En esta descripción, el término "proteína modificada" se refiere a una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una modificación tal como adición, inserción, disminución, supresión, o sustitución de uno o varios aminoácidos en la secuencia de aminoácido de RCE I, RCE II, RCE III, MCE I, MCE II, o PCE I, que carece del dominio de enlace a celulosa. El número de los aminoácidos que están involucrados con tal modificación no está particularmente limitado, siempre y cuando la proteína modificada tenga actividad endoglucanasa. El número de los mismos es preferiblemente de 1 hasta aproximadamente 50, más preferiblemente de 1 hasta aproximadamente 30, y aún más preferiblemente de 1 a 9.

El término "homólogo" usado aquí se refiere a un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos codificada por un gen (secuencia de nucleótidos) que hibrida en condiciones rigurosas con ADN que tiene cualquier secuencia de nucleótidos como se muestra en la SEQ ID NO: 2 o 13 (RCE I), SEQ ID NO: 4 (RCE II), SEQ ID NO: 6 (RCE III), SEQ ID NO: 8 (MCE I), SEQ ID NO: 10 (MCE II), o SEQ ID NO: 12 (PCE I), donde una porción que codifica un dominio de enlace a celulosa ha sido removida y también tiene actividad endoglucanasa. El término "condiciones rigurosas" se refiere a las condiciones bajo las que, mientras que una sonda que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica una parte o la totalidad de las secuencias de aminoácidos de RCE I, RCE II, RCE III, MCE I, MCE II y PCE I que carecen del dominio de enlace a celulosa o una secuencia de aminoácidos de su proteína modificada hibrida con un gen que codifica un homólogo, esta sonda es controlada hasta un grado tal que no hibrida con el gen NCE4 de la endoglucanasa (SEQ ID NO: 18) de acuerdo con el documento WO 98/03640 o el gen SCE3 de la endoglucanasa (SEQ ID NO: 19) de acuerdo con el documento WO 98/54332 (en donde la cantidad de ADN utilizada es igual a la del gen que codifica el gen NCE4, el gen SCE3, o un homólogo). Un ejemplo específico de "condiciones rigurosas" es el siguiente. Se utiliza una sonda marcada que tiene una secuencia de ADN de longitud completa que codifica secuencias de aminoácidos tales como las de RCE I, que carece del dominio de enlace a celulosa. De acuerdo con el método del sistema de detección de marcación de ADN/ARN directo ECL (Amersham), se lleva a cabo una hibridación previa a 42°C durante 1 hora, se añade la sonda, y luego se lleva a cabo la hibridación a 42°C durante 15 horas. Después de eso, se usa 0,5x SSC (1x SSC; citrato trisódico 15 mM, cloruro de sodio 150 mM) que comprende 0,4% de SDS y urea 6M para realizar el lavado dos veces a 42°C durante 20 minutos. Posteriormente, se usa 5x SSC para realizar el lavado dos veces a temperatura ambiente (aproximadamente 25°C) durante 10 minutos.

- 5 Ejemplos de tales proteínas o homólogos modificados incluyen una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene preferiblemente al menos 70%, más preferiblemente al menos 80%, aún más preferiblemente al menos 90%, incluso más preferiblemente al menos 95%, y lo más preferible al menos 98% de identidad con la secuencia de aminoácidos de RCE I, RCE II, RCE III, MCE I, MCE II, o PCE I, que carece del dominio de enlace a celulosa. Los valores numéricos que indican la identidad se pueden determinar utilizando un programa para la búsqueda de identidad que es conocido por una persona experta en la técnica. Preferiblemente, estos valores numéricos se determinan utilizando parámetros predeterminados (ajuste inicial) en FASTA3 (Science, 227, 1435-1441 (1985); Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 85, 2444-2448 (1988); <http://www.ddbj.nig.ac.jp/E-mail/homology-j.html>).
- 10 La proteína de la presente invención no comprende un dominio de enlace a celulosa. En consecuencia, la proteína modificada no debe contener un dominio de enlace a celulosa. Esto se puede confirmar mediante la investigación de la secuencia de aminoácidos de la proteína objetivo y si la secuencia de consenso (Hoffren, A. -M y colaboradores, Protein Engineering 8: 443-450, 1995; SEQ ID NO: 17) está presente allí o no.
- 15 Además, la proteína de la presente invención tiene actividad endoglucanasa. En consecuencia, la proteína modificada debe tener también actividad endoglucanasa. Esto se puede confirmar mediante la investigación de la actividad endoglucanasa de la proteína objetivo mediante el método antes mencionado.
- 20 La proteína de la presente invención puede ser producida como una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que no contiene un dominio de enlace a celulosa mediante un método conocido por una persona experta en la técnica con base en la secuencia de aminoácidos de una endoglucanasa conocida derivada de *Zygomycetes*. Ejemplos de tal método incluyen un método que es llevado a cabo por la descomposición en un dominio enlazador usando proteasa durante el cultivo de *Zygomycetes* que produce endoglucanasa para causar la supresión del dominio de enlace a celulosa y un método que se lleva a cabo expresando artificialmente endoglucanasa que no tiene un dominio de enlace a celulosa debido a las técnicas de modificación por ingeniería genética. Entre las proteínas de la presente invención, en particular, se puede preparar la proteína modificada usando ADN que codifica sus secuencias de aminoácidos mediante una técnica de ingeniería genética que es conocida por una persona experta en la técnica.
- 25 La proteína de la presente invención puede producir un efecto mayor que la endoglucanasa original, que tiene un dominio de enlace a celulosa en el tratamiento de tejidos u otras aplicaciones en detergentes o pasta de papel. Particularmente, se puede lograr un efecto mucho mayor en la actividad de eliminación de pelusa de un tejido de celulosa reproducido tal como liocel (por peso de proteína) y en la actividad de eliminación de pelusa del tejido de algodón tal como algodón de punto (por peso de proteína). La proteína de la presente invención es preferiblemente dos veces o más, más preferiblemente 2,5 veces o más, y lo más preferible 3 veces o más activa en la eliminación de pelusa del tejido de celulosa reproducido (tal como liocel) (por peso de proteína) que una endoglucanasa purificada que tiene el dominio de enlace a celulosa. O bien, la proteína es preferiblemente 5 veces o más, más preferiblemente 15 veces o más, y lo más preferible 20 veces o más en la actividad de eliminación de pelusa del tejido de algodón tal como algodón de punto (por peso de proteína) que una endoglucanasa purificada que tiene el dominio de enlace a celulosa.
- 30 2. Gen, vector de expresión, célula huésped transformada con el vector de expresión, y producción de endoglucanasa que carece el dominio de enlace a celulosa usando la célula huésped
- 35 La presente invención se refiere a un gen que codifica la proteína de la presente invención, o una proteína modificada de la misma, y un vector de expresión que comprende el gen.
- 40 El gen de la presente invención puede ser cualquier gen, siempre y cuando codifique la proteína de la presente invención, o una proteína modificada de la misma.
- 45 Los detalles específicos de sus secuencias de nucleótidos no están particularmente limitados. Ejemplos de genes que pueden utilizarse con el fin de expresar RCE I, RCE II, RCE III, MCE I, MCE II o PCE I, que carecen del dominio de enlace a celulosa, en tanto que la proteína de la presente invención incluya aquellas secuencias de nucleótidos que los contienen como se muestra en la SEQ ID NO: 2 (RCE I), SEQ ID NO: 4 (RCE II), SEQ ID NO: 6 (RCE III), SEQ ID NO: 8 (MCE I), SEQ ID NO: 10 (MCE II), o SEQ ID NO: 12 (PCE I).
- 50 Específicamente, el gen de la presente invención comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en las SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 7, 9, o 11, en donde el dominio de enlace a celulosa ha sido suprimido de la misma, y codifica una proteína que exhibe actividad endoglucanasa, una proteína modificada de la misma que exhibe actividad endoglucanasa.
- 55 El gen de la presente invención comprende ADN como se describe en los siguientes (a) o (b).
- 60

(a) ADN que tiene una secuencia de nucleótidos como se muestra en las SEQ ID NOs: 2 o 13, 4, 6, 8, 10, o 12, en donde una porción que codifica un dominio de enlace a celulosa ha sido eliminada de la misma.

5 (b) ADN que se hibrida bajo condiciones rigurosas con el ADN que tiene una secuencia de nucleótidos como se muestra en las SEQ ID NOs: 2 o 13, 4, 6, 8, 10, o 12, en donde una porción que codifica un dominio de enlace a celulosa ha sido eliminada de la misma.

El término "condiciones rigurosas" significa las condiciones descritas en el apartado 1 anterior.

10 Las secuencias de nucleótidos de los genes mencionados anteriormente se pueden optimizar dependiendo del tipo de célula huésped utilizada en la transformación posterior. Estas secuencias de nucleótidos se pueden optimizar con respecto, por ejemplo, al uso del codón en una célula huésped o la secuencia de reconocimiento del intrón en una célula huésped. El uso del codón puede ser optimizado mediante, por ejemplo, la modificación de secuencias de nucleótidos a fin de que contengan la mayor cantidad de codones utilizados en una célula huésped en una frecuencia tan alta como sea posible sin cambiar la
15 secuencia de aminoácidos que va a ser codificada. Esto puede mejorar la eficiencia de la traducción de genes en proteínas. La secuencia de reconocimiento de un intrón puede ser optimizada, por ejemplo, mediante la modificación de secuencias de nucleótidos de manera que no tenga una secuencia de ADN, que pueda ser reconocida como un intrón en una célula huésped, o para tener tan pocas secuencias como sea posible sin cambiar la secuencia de aminoácidos que va a ser codificada. Esto puede mejorar la estabilidad del ARNm que es un transcripto de un gen objetivo. Las secuencias de
20 reconocimiento del intrón varían dependiendo de los tipos de células huésped. Ejemplos de secuencias de reconocimiento del intrón de hongos filamentosos que pertenecen a hongos imperfectos incluyen secuencias de ADN tales como GTAGN, GTATN, GTAAN, GTACGN, GTGTN, GCACGN y GTTCGN ("N" significa A, T, C, o G en cada secuencia).

25 En esta descripción, el término "gen de codón optimizado" se refiere a un gen que se obtiene mediante la optimización del uso del codón y/o de la secuencia de reconocimiento del intrón. Preferiblemente, el gen de codón optimizado es un gen obtenido mediante la optimización el uso del codón, y más preferiblemente un gen obtenido mediante la optimización del uso del codón y la secuencia de reconocimiento del intrón. Este gen de codones optimizados se optimiza preferiblemente para la expresión en hongos filamentosos que pertenecen a los hongos imperfectos. Ejemplos de tales genes de codón optimizado incluyen un gen que carece de una porción que codifica un dominio de enlace a celulosa en el gen de codón optimizado de endoglucanasa RCE I (SEQ ID NO: 13) como se describe en el documento WO 00/24879.
30

El vector de expresión de la presente invención comprende un gen objetivo (un gen que codifica la proteína de la presente invención, una proteína modificada de la misma, o un homólogo de la proteína o de la proteína modificada) en un estado que es replicable en una célula huésped y expresable de la proteína de la presente invención, o una proteína modificada de la misma.
35

Este vector de expresión puede ser construido con base en un vector de autorreplicación, es decir, un vector que existe como una entidad extracromosómica y se replica independientemente del cromosoma, por ejemplo, un plásmido. Alternativamente, el vector de expresión puede ser un vector que se integra en el genoma de la célula huésped tras la introducción en su interior y se replica junto con el cromosoma en el que se ha incorporado. Para la construcción del vector de la presente invención, se pueden utilizar los procedimientos y métodos convencionales usados en el campo de la ingeniería genética.
40

Para la expresión de la proteína de la presente invención, o una proteína modificada de la misma, tras la introducción en la célula huésped, es deseable que el vector de expresión de la invención contenga secuencias de ADN para regular la expresión y marcadores de genes, etc., para seleccionar transformantes, además del gen que codifica la proteína de la presente invención, una proteína modificada de la misma.
45

Ejemplos de secuencias de ADN reguladoras de la expresión incluyen promotores, terminadores y secuencias de ADN que codifican péptidos señal. Los promotores y los terminadores no están particularmente limitados, siempre que muestren actividad de transcripción en la célula huésped. Se pueden obtener como secuencias de ADN, que controlan la expresión de un gen que codifica una proteína homogénea o heterogénea a la célula huésped. Los péptidos señal no están particularmente limitados, siempre y cuando contribuyan a la secreción de proteína en la célula huésped. Se pueden obtener a partir de secuencias de ADN derivadas de un gen que codifica una proteína homogénea o heterogénea a la célula huésped. Los marcadores genéticos de la invención pueden ser apropiadamente seleccionados dependiendo del método para la selección de los transformantes. Por ejemplo, se pueden usar genes que codifican resistencia a los fármacos o genes que complementan la autótrofa. Cada una de estas secuencias de ADN y de los marcadores genéticos está unida operativamente al vector de expresión de la presente invención.
50
55

Además, la presente invención se refiere a una célula huésped que se transforma con el vector de expresión. El vector de expresión introducido en una célula huésped debe ser replicable en ella. Por lo tanto, la célula huésped que se utiliza en el
60

presente documento varía dependiendo del tipo de vector utilizado en la producción del vector de expresión. Alternativamente, de acuerdo con el tipo de célula huésped utilizada, se puede producir un vector de expresión de manera que sea replicable en la misma. Específicamente, con el fin de obtener un transformante que exprese la proteína de la presente invención, o una proteína modificada de la misma, se deben combinar adecuadamente una célula huésped y un vector de expresión. Tal combinación se conoce como un sistema huésped-vector. El sistema huésped-vector que se utiliza en la presente invención no está particularmente limitado. Ejemplos de los mismos incluyen sistemas que utilizan microorganismos tales como *Escherichia coli*, *Actinomycetes*, levadura y hongos filamentosos como células huésped, y se prefiere un sistema que utiliza hongos filamentosos. Se puede utilizar un sistema de expresión para una proteína de fusión con otra proteína.

Cuando se utilizan hongos filamentosos como células huésped, se puede utilizar cualquier tipo de hongos filamentosos, y los ejemplos preferidos de los mismos incluyen aquellos que pertenecen a *Humicola*, *Aspergillus*, o *Trichoderma*. Ejemplos particularmente preferidos de estos hongos filamentosos incluyen *Humicola insolens*, *Aspergillus niger* o *Aspergillus oryzae*, y *Trichoderma viride*.

Una célula huésped puede ser transformada con el vector de expresión de la presente invención de acuerdo con métodos convencionales utilizados en el campo de la ingeniería genética.

El transformante obtenido de este modo (célula huésped transformada) se cultiva en un medio adecuado, y la proteína de la presente invención, o una proteína modificada de la misma, pueden ser aisladas y obtenidas a partir del producto de cultivo. En consecuencia, otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para producir una proteína que comprende etapas de cultivo de la célula huésped de la presente invención y la recolección de la proteína de la presente invención, o una proteína modificada de la misma, a partir de la célula huésped obtenida por la etapa de cultivo o un producto de cultivo de la misma. Los métodos de cultivo y otras condiciones para los transformantes pueden ser sustancialmente los mismos que para los microorganismos que van a ser utilizados. Los transformantes pueden ser cultivados y se puede recolectar luego la proteína objetivo por un método convencional de este campo técnico.

3. Preparación de celulasa

La presente invención se refiere a una preparación de celulasa que comprende la proteína de la presente invención, o una proteína modificada de la misma, o una proteína producida por el método para producir una proteína de acuerdo con la presente invención.

En general, una preparación de celulasa es un polvo, líquido, o similar, que comprende, por ejemplo, un excipiente (por ejemplo, lactosa, cloruro de sodio, o sorbitol), un conservante, o un agente surfactante no iónico, además de una enzima celulasa. Por ejemplo, se formula como un polvo, en forma de partículas, granulada, granulada no pulverulenta, o como una preparación líquida. La preparación de celulasa de la presente invención comprende, como la enzima celulasa, la proteína de la presente invención, o una proteína modificada de la misma, o una proteína producida mediante el método para producir una proteína de la presente invención (en lo sucesivo denominadas "las proteínas de la presente invención"). Además, la preparación de celulasa de la presente invención puede comprender, además de las proteínas de la presente invención, otras enzimas celulasas, por ejemplo, celobiohidrolasa, β -glucosidasa, o endoglucanasa que no están involucradas en la presente invención.

Un tipo de preparación de celulasa, una preparación granulada no pulverulenta, puede ser preparada por un método convencional de granulación en seco. Específicamente, las proteínas en polvo de la presente invención se mezclan con uno o varios de entre: sales inorgánicas neutras que no afectan la actividad endoglucanasa representadas por sulfato de sodio, cloruro de sodio, o similares; minerales que no afectan la actividad endoglucanasa representados por bentonita, montmorillonita, o similares; o sustancias orgánicas neutras representadas por almidón, celulosa en partículas, o similares. Se añade luego a la misma un polvo o suspensión fina de uno o varios surfactantes no iónicos, seguido de la mezcla completa o amasado. Dependiendo de la situación, se añade convenientemente un polímero sintético representado por polietilén glicol para la unión de materia sólida o un polímero natural tal como almidón y se amasa adicionalmente. Después de eso, se lleva a cabo la granulación por extrusión utilizando, por ejemplo, un Granulador de Disco, y a los gránulos extrudidos se les da luego forma esférica usando el Marumerizador, seguido de secado. Por lo tanto, se pueden producir gránulos no pulverulentos. La cantidad de uno o varios surfactantes no iónicos que se añaden no está particularmente limitada. La cantidad es preferiblemente de 0,1% a 50% en peso, más preferiblemente de 0,1% a 30% en peso, y aún más preferiblemente de 1% a 20% en peso, con base en la preparación completa de celulasa de acuerdo con la presente invención. La permeación de oxígeno o penetración de agua pueden ser regulados mediante el recubrimiento de las superficies de los gránulos con un polímero, etc.

En contraste, una formulación líquida se puede preparada mediante la incorporación de un estabilizador para la enzima endoglucanasa tal como un polímero sintético, un polímero natural, o similares en una solución que comprende las proteínas

de la presente invención y la adición de sales inorgánicas o conservantes sintéticos de acuerdo con la necesidad. En este caso, se pueden incorporar también uno o varios surfactantes no iónicos. La cantidad que se añade de uno o varios surfactantes no iónicos no está particularmente limitada. Los cantidad es preferiblemente de 0,1% a 50% en peso, más preferiblemente de 0,1% a 30% en peso, y aún más preferiblemente de 1% a 20% en peso, con base en la preparación completa de celulasa de acuerdo con la presente invención.

4. Aplicación de las proteínas de la presente invención y la preparación de celulasa de la presente invención

La presente invención se refiere a un método para tratar tejidos que contienen celulosa. Este método comprende una etapa de poner tejidos que contienen celulosa en contacto con las proteínas de la presente invención o la preparación de celulasa de la presente invención. Las condiciones tales como la temperatura de contacto o las cantidades de las proteínas o la preparación de la celulasa pueden determinarse adecuadamente con respecto a otras diversas condiciones.

El método antes mencionado se puede utilizar para reducir la velocidad a la que los tejidos que contienen celulosa forman pelusa o para reducir la formación de pelusa en tejidos que contienen celulosa. En esta aplicación, las proteínas o la preparación de celulasa con una concentración de proteína de 0,001 a 1 mg/l se usan preferiblemente aproximadamente a 30°C a 60°C.

El método antes mencionado puede ser utilizado en el tratamiento de la pérdida de peso de tejidos que contienen celulosa para mejorar la sensación al tacto y el aspecto de la misma. En esta aplicación, mejorar la sensación táctil significa reducir la velocidad a la que la sensación se deteriora. En esta aplicación, las proteínas o la preparación de celulasa en una concentración de proteína de 0,001 a 100 mg/l se utilizan preferiblemente aproximadamente a 30°C - 60°C.

El método antes mencionado puede ser utilizado para la clarificación del color de tejidos coloreados que contienen celulosa.

El método antes mencionado se puede utilizar para proporcionar tejidos coloreados que contienen celulosa con el cambio parcial de color. En esta aplicación, por ejemplo, los tejidos de color que contienen celulosa (por ejemplo, mezclilla) pueden tener una apariencia de material lavado a la piedra. En esta aplicación, las proteínas o la preparación de celulasa con una concentración de proteínas de 0,01 a 100 mg/l se usa preferiblemente aproximadamente a 40°C - 60°C.

Las concentraciones de proteína de diferentes endoglucanasas se calcularon a partir del área del pico a UV 280 nm de la endoglucanasa respectiva eludida con un gradiente lineal de 0% a 80% de concentración de acetonitrilo en 0,05% de TFA (ácido trifluoroacético) con un caudal de 1,0 ml/min en análisis de HPLC utilizando una columna de TMS-250 de gel TSK (4,6 mm de diámetro interno x 7,5 cm, TOSOH, Japón). El estándar utilizado fue la NCE4 purificada, que fue analizada en HPLC bajo las mismas condiciones, cuya concentración de proteína había sido medida en forma preliminar por un kit de ensayo de proteínas (BioRad Laboratories). La NCE4 purificada se purifica a partir de un producto de cultivo de *Humicola insolens* MN 200-1, que se depositó en el Depositario Internacional de Organismos para Patente del Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial Avanzada (Tsukuba Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki, Japón) bajo el número de acceso de PERM BP-5977 (depósito inicial: PERM P-15736, fecha del depósito inicial: 15 Julio, 1996), de acuerdo con el método descrito en el documento WO 98/03640. El estándar usado para medir la concentración de proteína usando el kit de ensayo de proteínas es el estándar de albúmina (albúmina de suero bovino, fracción V, PIERCE).

El método antes mencionado se puede utilizar para reducir la velocidad a la que los tejidos que contienen celulosa se vuelven rígidos o para reducir la rigidez en tejidos que contienen celulosa. En esta aplicación, los tejidos que contienen celulosa pueden ser suavizados.

En las aplicaciones mencionadas, los tejidos que contienen celulosa pueden ser tratados mediante remojo, lavado, o enjuague de los tejidos. Específicamente, el método antes mencionado de la presente invención puede llevarse a cabo mediante tratamiento de los tejidos que contienen celulosa durante el lavado. En algunas ocasiones, sin embargo, el tratamiento de los tejidos puede llevarse a cabo durante el remojo o el enjuague mediante la adición de las proteínas o la preparación de celulasa de la presente invención en el agua donde se remojan o se van a remojar los tejidos.

La presente invención se refiere a un aditivo para detergente que comprende las proteínas o la preparación de celulasa de la presente invención en una forma granulada no pulverulenta o una forma líquida estabilizada. La presente invención se refiere además a una composición detergente que comprende las proteínas o la preparación de celulasa de la presente invención.

Esta composición detergente también puede contener un agente surfactante (que puede ser aniónico, no iónico, catiónico, anfótero, o un surfactante zwitteriónico, o una mezcla de los mismos). Además, esta composición detergente puede contener otros componentes detergentes conocidos en la técnica, tales como constructores, agentes blanqueadores, activadores de blanqueo, inhibidores de corrosión, agentes secuestrantes, polímeros disociadores de la suciedad,

5 compuestos aromatizantes, otras enzimas (por ejemplo, proteasa, lipasa, o amilasa), estabilizadores de enzimas, auxiliares de formulación, agentes abrillantadores fluorescentes, promotores de espuma, etc. Ejemplos de surfactantes aniónicos representativos incluyen alquil benceno sulfonato lineal (LAS), sulfato de alquilo (AS), sulfonato de α -olefina (AOS), sulfato de polioxietilén alquil éter (AES), metil éster de ácido graso α -sulfonato (α -SFMe), y sales de metales alcalinos de ácidos grasos naturales. Ejemplos de surfactantes no iónicos incluyen polioxietilén alquil éter (AE), alquil polietilén glicol éter, nonilfenol polietilenglicol éter, etoxilato del éster metílico de ácido graso, ésteres de ácidos grasos de sacarosa o glucosa, y ésteres de alquil glucósido y alquil glucósido polietoxilado.

10 El uso de las proteínas o la preparación de celulasa de la presente invención en una composición detergente puede mejorar el desempeño con respecto a la eliminación de suciedad en partículas, aclaramiento del color, prevención de la formación de pelusa, la eliminación de la pelusa, y la reducción de rigidez.

15 La presente invención se refiere a un procedimiento de destintado de papel de desecho usando un agente de destintado en el que se utilizan las proteínas o la preparación de celulasa de la presente invención en una etapa de destintado de papel de desecho con un agente de destintado.

20 Cuando la proteína o la preparación de celulasa de la presente invención actúa sobre el papel residual, mejora la eficiencia del destintado, y por lo tanto, la proteína o la preparación de celulasa de la presente invención es útil en el proceso de la fabricación de papel reciclado a partir de papel de desecho. Este método de destintado puede disminuir significativamente las fibras que aún contienen tinta. Por lo tanto, se puede mejorar la blancura del papel residual.

25 La "agente de destintado" mencionado anteriormente no está particularmente limitado con tal de que sea un agente comúnmente usado cuando se hace el destintado de papel usado. Ejemplos de los mismos incluyen un álcali tal como NaOH o Na₂CO₃, silicato de sodio, peróxido de hidrógeno, fosfatos, surfactantes aniónicos, surfactantes no iónicos, agentes de captura tales como ácido oleico, y los ejemplos de ayuda incluyen estabilizadores del pH, agentes quelantes, y agentes dispersantes.

30 El papel de desecho, que puede ser tratado por el método de destintado anterior, no está particularmente limitado siempre que pueda ser generalmente denominado como papel usado. Ejemplos de residuos de papel son: papel impreso usado que contiene pulpa mecánica y pulpa química tal como papel periódico usado, papel de revistas usadas y papel impreso usado de bajo grado o de grado medio, papel usado no proveniente de madera compuesto de pasta química; y papel alisado de la misma. Además, el método de destintado anterior se puede aplicar a cualquier papel en el que se ha depositado tinta si el papel no se conoce generalmente como papel de desecho.

35 Además, la presente invención se refiere a un método para mejorar el drenaje de la pasta de papel. Este método comprende una etapa de tratar la pulpa de papel con las proteínas o la preparación de celulasa de la presente invención.

40 De acuerdo con este método, el drenaje de la pasta de papel se puede mejorar notablemente sin deterioro significativo en la resistencia del papel. La pulpa, que puede ser tratada por este método, no está particularmente limitada, y ejemplos de la misma incluyen pulpa de papel residual, pulpa de cartón reciclado, pulpa Kraft, pulpa al sulfito, pulpa procesados o termomecánica, y otra pulpa de alto rendimiento.

45 La presente invención se refiere además a un método para mejorar la digestibilidad de los alimentos para animales. Este método comprende una etapa de tratamiento de los alimentos para animales con las proteínas o la preparación de celulasa de la presente invención.

De acuerdo con este método, los pesos moleculares de los glucanos en los alimentos para animales convenientemente bajaron. De este modo, se puede mejorar la digestibilidad de los alimentos para animales.

50 5. La deposición de microorganismos

La cepa CP96001 de *Rhizopus oryzae* fue depositada en el Depositario Internacional de Organismos para Patente del Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial Avanzada (Tsukuba Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki, Japón) bajo el número de acceso PERM BP-6889 el 21 de abril de 1997.

55 La cepa CP99001 de *Mucor circinelloides* fue depositada en el Depositario Internacional de Organismos para Patente del Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial Avanzada (Tsukuba Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki, Japón) bajo el número de acceso FERM BP-6890 el 2 de julio de 1999.

La cepa CP99002 de *Phycomyces nitens* fue depositada en el Depositario Internacional de Organismos para Patente del Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial Avanzada (Tsukuba Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki, Japón) bajo el número de acceso FERM BP-6891 el 2 de julio de 1999.

5 La cepa JM 109 de *Escherichia coli* que se transformó con el vector de expresión pMKD01 utilizado en la presente invención se depositó en el Depositario Internacional de Organismos para Patente del Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial Avanzada (Tsukuba Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki, Japón) bajo el número de registro FERM BP-5974 (depósito inicial: FERM P-15730, fecha del depósito inicial: 12 de julio de 1996).

10 La cepa MN 200-1 de *Humicola insolens* que puede ser un anfitrión para el vector de expresión de la presente invención se depositó en el Depositario Internacional de Organismos para Patente del Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial Avanzada (Tsukuba Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki, Japón) bajo el número de acceso FERM BP-5977 (depósito inicial: PERM P-15736, fecha del depósito inicial: 15 de julio de 1996).

15 Esta descripción incluye parte o la totalidad de los contenidos que se divulgan en la descripción de la solicitud de patente japonesa No. 2000-354296, que es un documento de prioridad de la presente solicitud.

Mejores modos de llevar a cabo la presente invención

20 La presente invención se describe en más detalle con referencia a los siguientes ejemplos y ejemplos de referencia, pero no se limita a ellos.

25 En la siguiente descripción, "actividad endoglucanasa" se refiere a la actividad CMCasa. Además, la "actividad CMCasa" medida por la cantidad de los azúcares reductores liberados después de la incubación de una solución de enzima celulasa y una carboximetilcelulosa (CMC, Tokio Kasei Kogyo, Japón) durante un período determinado de tiempo y una unidad se define como la cantidad de una enzima que produce azúcares reductores correspondiente a 1 μ mol de glucosa por minuto.

30 En la implementación de las siguientes pruebas, se hace referencia a los ejemplos descritos en WO 98/03667 y WO 00/24879.

[Ejemplos de Referencia]

Ejemplo de Referencia 1: clonación de ADNc de celulasa NCE5

35 (1) Aislamiento de ADNc y preparación de la biblioteca

En el cribado del gen que codifica NCE5, el componente de celulasa, se preparó ARNm a partir de la cepa MN 200-1 de *Humicola insolens* (FERM BP-5977), y se sintetizó el ADNc mediante una transcriptasa inversa para preparar una biblioteca.

40 (i) Preparación de ARN total

45 Se cultivó la cepa MN 200-1 de *Humicola insolens* (FERM BP-5977) en medio (N) (5,0% de Avicel, 2,0% de extracto de levadura, 0,1% de polipeptona, 0,03% de cloruro de calcio, 0,03% de cloruro de magnesio, pH 6,8) durante 2 días, y se recolectaron las células por centrifugación (3500 rpm, 10 minutos). Entre las células recogidas, se lavaron 3 g de las mismas con agua esterilizada, se congelaron en nitrógeno líquido, y luego se molieron en nitrógeno líquido utilizando un mortero y una mano de mortero. Se aisló el ARN total de las células molidas utilizando ISOGEN (Nippon Gene) de acuerdo con el manual adjunto del mismo, y se confirmó el ARN total por electroforesis en gel de agarosa de formaldehído como una figura cromática.

50 (ii) Preparación de una cola poli(A) + ARN (=ARNm)

Entre el ARN total preparado en (i), se aplicó 1 mg del mismo sobre la columna de oligo(dT) celulosa para eluir y aislar el ARNm utilizando el kit de purificación de ARNm (Amersham Pharmacia Biotech) de acuerdo con el manual adjunto. Además, se confirmó el ARNm por electroforesis en gel de agarosa de formaldehído como una figura cromática de frotis.

55 (iii) Síntesis de ADNc

El ADNc se sintetizó a partir de 5 μ g del ARNm preparado en (ii) usando el kit de síntesis de ADNc ahorrador de tiempo (Amersham Pharmacia Biotech) de acuerdo con el manual adjunto.

60 (iv) Preparación de una biblioteca de ADNc

El adaptador *EcoRI-NotI* contenido en el kit de síntesis de ADNc ahorrador de tiempo se ligó al extremo romo del ADNc total sintetizado de acuerdo con el manual adjunto. La cantidad total de este fragmento de ADN se ligó en el vector de fago y el brazo de *EcoRI* del kit de clonación λZAPII (Stratagene) usando el kit de ligación de ADN Ver. 2 (Takara Shuzo Co., Ltd.), seguido de precipitación con etanol. A continuación, se disolvió el fragmento de ADN en un regulador de TE (clorhidrato de Tris 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM). El vector de fago recombinante así obtenido se sometió a un empaquetamiento *in vitro* utilizando el extracto de empaquetamiento Gigapack III Plus (Stratagene) de acuerdo con el manual adjunto. Después de eso, se infectó este vector de fago recombinante con XL1-Blue MRF' de *Escherichia coli* y se cultivó en placa para la formación de plaquetas. De este modo, se obtuvo una biblioteca de fagos. Con el uso de la misma, se clonó un gen objetivo.

(2) Amplificación y análisis de ADN por PCR

Se amplificó el ADN por PCR usando el ADNc preparado en (1) - (iii) como una plantilla con base en la información concerniente a las secuencias parciales de aminoácidos de la celulasa NCE5.

Se prepararon los siguientes oligonucleótidos sintéticos como cebadores.

Terminal N: 5'-TAY TGG GAY TGY TGY AAR CC-3' (20 mer) (SEQ ID NO: 36)

T-43.0: 5'-TCI GCR TTI ARR AAC CAR TC-3' (20 mer) (SEQ ID NO: 37)

(En estas secuencias de nucleótidos, R indica G o A; Y indica T o C, e I indica inosina.)

La PCR se llevó a cabo en 50 µl de solución de reacción utilizando 1 µg de ADNc como plantilla, 1,25 unidades de Taq ADN polimerasa LA (Takara Shuzo Co., Ltd.) y su regulador adjunto, dNTP 0,2 mM, 10% de DMSO, y 1 µM de cada uno de los anteriores cebadores bajo las siguientes condiciones: a 94°C durante 1 minuto, (a 94,0°C durante 30 segundos, 55,0°C durante 30 segundos y 72,0°C durante 1 minuto) x 25 veces, y 72,0°C durante 5 minutos.

Se amplificaron aproximadamente 500 pb de ADN por esta reacción, y se sometió el ADN amplificado a secuenciación usando el Kit de premezcla de secuenciación del ciclo de terminación DYEnamic ET (Amersham Pharmacia Biotech) y el analizador genético ABI PRISM 310 (PE Applied Biosystems) de acuerdo con los protocolos adjuntos. Como resultado, la secuencia de aminoácido, que se dedujo de la secuencia de nucleótidos determinada, contenía todas las secuencias de aminoácidos parciales de la celulasa NCE5. Por lo tanto, se utilizó la secuencia de aminoácidos deducida como sonda en el siguiente proceso de selección.

(3) Clonación del gen que codifica NCE5, el componente de celulasa

(i) Cribado por hibridación de plaquetas

El fragmento de ADN de 500 pb (100 ng) amplificado por PCR fue marcado previamente con el sistema de detección de marcación directo de ADN/ARN ECL (Amersham Pharmacia Biotech).

La placa de fago preparada en (1) - (iv) se transfirió a la membrana de transferencia de nailon Hybond-N+ (Amersham Pharmacia Biotech) y se la sometió a tratamiento alcalino con hidróxido de sodio 0,4 N. Se desnaturalizó el ADN del fago recombinante sobre la membrana en una sola hebra. Después de eso, se lavó la membrana de nailon con 5x SSC (1x SSC: citrato trisódico 15 mM, cloruro de sodio 150 mM) y luego se secó al aire para inmovilizar el ADN sobre la misma. Después de eso, se hibridó la membrana de nailon de acuerdo con el manual del kit, se hizo la detección, y se la expuso a una película de rayos X Fuji Medical (Fuji Photo Film) para producir 6 clones positivos.

(ii) Preparación de ADN de fago

Se preparó ADN de los clones positivos como ADN de plásmido de acuerdo con el manual adjunto al kit.

Se preparó un plásmido en el que se clonó un fragmento de ADN en pBluescript SK(-) a partir de SOLR^{MR} de *Escherichia coli* resistente a ampicilina. Usando este plásmido como plantilla, se llevó a cabo la PCR utilizando los cebadores del terminal N y T-43.0 usados en (2) en las mismas condiciones como se describió anteriormente. Como resultado, se obtuvo un producto de amplificación de 500 pb de un plásmido. Por lo tanto, se deduce que el ADN objetivo fue clonado en este plásmido. Este plásmido se digirió con *EcoRI* y después se sometió a electroforesis en gel de agarosa.

Como resultado, se encontró que el plásmido contenía aproximadamente un fragmento de *EcoRI* de 1 kpb.

(4) Determinación de la secuencia de nucleótidos de ADNc

Se determinó una secuencia de nucleótidos del fragmento de EcoRI de aproximadamente 1 kpb que se insertó en un plásmido pBluescript SK(-) recombinante positivo obtenido en (3) - (ii) de la misma forma como se describió anteriormente utilizando cebadores para secuenciación T3 y T7. Como resultado, se encontró que esta secuencia de nucleótidos contenía un marco de lectura abierto (ORF) de 672 pb. Las secuencias de aminoácidos deducidas de la secuencia de nucleótidos y el ORF se muestran en la SEQ ID NO: 39 y la SEQ ID NO: 38 en los listados de secuencias.

Además, se consideró que de 1 a 18 secuencias de aminoácidos en este ORF eran secuencias señal para secreción de la proteína en forma extracelular.

10 Ejemplo de Referencia 2: Expresión del gen de NCE5 en *Humicola insolens*

Se usó el plásmido pJD01 (véase el Ejemplo D1 (2) (b) en el documento WO 00/24879) como un vector de expresión en la cepa MN 200-1 de *Humicola insolens* (PERM BP-5977) y se construyó de la siguiente manera.

15 (1) Construcción del plásmido pJND-c5 que expresa NCE5

(i) Mutagénesis dirigida al sitio en el gen de NCE5

20 Con el fin de ligar el gen de NCE5 al sitio *Bam*HI del plásmido pJD01, se construyó un cebador con el fin de abarcar previamente el sitio *Bam*HI en una secuencia inmediatamente arriba del codón de inicio e inmediatamente abajo del codón de terminación, y se amplificó el gen de NCE5 por PCR. Los cebadores para la mutagénesis fueron diseñados como se muestra a continuación.
NCE5-N-*Bam*HI:

25 5'-GGGGATCCTGGGACAAGATGCAGCTCCCCCTGACCACG-3' (38 mer) (SEQ ID NO: 40);

NCE5-C-*Bam*HI:

30 5'-GGGGATCCTGCATTTAACGCGAGCAGCCGCTCTTGCC-3' (38 mer) (SEQ ID NO: 41).

35 Se llevó a cabo la PCR bajo las mismas condiciones como se describió anteriormente usando el plásmido pBluescript SK(-) recombinante positivo obtenido en el Ejemplo de Referencia 1 como plantilla. Como resultado, se confirmó un producto de amplificación de aproximadamente 670 pb del fragmento de ADN mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,0%. Se removió el material no reaccionado mediante columnas HR MicroSpin S-400 (Amersham Pharmacia Biotech), se lo precipitó con etanol, y luego se lo dirigió con *Bam*HI. Posteriormente, se sometió una cantidad total a electroforesis en gel de agarosa al 1,0%, se recolectó un fragmento de ADN de 670 pb usando el kit BandPrep de Sephaglas (Amersham Pharmacia Biotech) de acuerdo con el manual adjunto, y se subclonó el fragmento de *Bam*HI en el sitio *Bam*HI del plásmido pUC118 para producir el plásmido pNCE5Bam. Además, se determinó la secuencia de nucleótidos de este fragmento insertado y se confirmó mediante el método antes mencionado.

40 (ii) Preparación del plásmido pJND-c5

45 El plásmido anterior pJD01 fue digerido con *Bam*HI y se separó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8%. Se recolectó un fragmento de ADN de aproximadamente 8,0 kpb mediante el Kit BandPrep de Sephaglas, y se desfosforiló el fragmento de ADN recogido utilizando fosfatasa alcalina derivada de *Escherichia coli* (Takara Shuzo Co., Ltd.) de acuerdo con la manual adjunto. Del mismo modo, se digirió el plásmido pNCE5Bam obtenido en (i) con *Bam*HI, y se recolectaron los fragmentos de ADN de 670 pb y se ligó al fragmento de ADN anterior utilizando el kit de ligación de ADN Ver. 2 para obtener el plásmido de expresión pJND-c5.

50 (2) Transformación de *Humicola insolens* con el plásmido pJND-c5

55 Se cultivó la cepa MN 200-1 de *Humicola insolens* (FERM BP-5977) en medio (S) a 37°C durante 24 horas, y luego se recolectaron las células por centrifugación a 3000 rpm durante 10 minutos. El medio (S) se compone del medio (N) descrito en el Ejemplo de Referencia 1, que tiene una adición de glucosa (3,0%) y Avicel retirado del mismo. Las células recogidas se lavaron con sacarosa 0,5 M y se suspendieron en 10 ml de solución de la enzima para la preparación del protoplasto (3 mg/ml de β -glucuronidasa, 1 mg/ml de quitinasa, 1 mg/ml de zimoliasa, y 0,5 M de sacarosa) filtrado a través de un filtro de 0,45 μ m. Se agitó la suspensión a 30°C durante 60 a 90 minutos para suministrar los hilos de los hongos que se van a convertir en protoplastos. Se filtró esta suspensión y después se centrifugó a 2.500 rpm durante 10 minutos, y se recolectó el protoplasto y después se lo lavó con un regulador de SUTC (sacarosa 0,5 M, cloruro de calcio 10 mM, y clorhidrato de Tris 10 mM (pH 7,5)).

El protoplasto preparado de este modo se suspendió en 1 mL de regulador de SUTC, y se añadieron 10 µl de solución de ADN (TE) a la suspensión en cantidades de 10 µg por cada 100 µl de la suspensión. Se dejó en reposo la mezcla en hielo durante 5 minutos. Posteriormente, se añadieron 400 µl de solución de PEG (60% de PEG 4000, cloruro de calcio 10 mM, clorhidrato de Tris 10 mM (pH 7,5)) y se dejó reposar la mezcla en hielo durante 20 minutos. Después de eso, se añadieron 10 ml de regulador de SUTC, y se realizó la centrifugación a 2.500 rpm durante 10 minutos. El protoplasto recogido se suspendió en 1 ml de regulador de SUTC, se centrifugó a 4000 rpm durante 5 minutos, y finalmente se suspendió en 100 µl de regulador de SUTC.

El protoplasto tratado como anteriormente se superpuso en el medio YMG con adición de higromicina (200 µg/ml) (1% de glucosa, 0,4% de extracto de levadura, 0,2% de extracto de malta, 1% de agar (pH 6,8)), junto con agar YMG blando. Se incubó el cultivo a 37°C durante 5 días. Después de eso, se determinó que la colonia generada era un transformante.

[Ejemplo 1] Construcción del gen que expresa la variante H43 de RCE I, que carece del dominio de enlace a celulosa

El plásmido p18-1 que contiene el codón del gen optimizado de endoglucanasa RCE I (véase el Ejemplo D3 (1) g) en el documento WO 00/24879) fue digerido con la enzima de restricción *Bam*HI para preparar el plásmido pR1H4 en el que se clonó un fragmento que contenía el codón del gen optimizado de la endoglucanasa en el sitio *Bam*HI del plásmido pUC118. Este plásmido pR1H4 se utilizó como plantilla para llevar a cabo la primera fase de PCR usando dos ADN sintéticos, es decir, RC-43F y RC-43R, como cebadores y el kit de mutagénesis in vitro de la PCR LA de TaKaRa (Takara Shuzo Co., Ltd.). Las condiciones de reacción eran de conformidad con el manual adjunto al kit. Se separó una muestra después de la reacción por electroforesis en gel de agarosa para obtener un fragmento del gen 43-X2 de aproximadamente 650 pb.

Utilizando el plásmido pJND-c5 como plantilla, que comprende el gen de NCE5 que no tiene originalmente el dominio de enlazamiento a celulosa y que es una endoglucanasa de la familia 45 como se describe en el Ejemplo de Referencia 2, se llevó a cabo igualmente una primera fase de PCR utilizando dos ADN sintéticos, es decir, NX-43F y NX-43R, como cebadores y el kit de mutagénesis in vitro de la PCR LA de TaKaRa (Takara Shuzo Co., Ltd.). Las condiciones de reacción fueron de acuerdo con el manual adjunto al kit. Se separó una muestra después de la reacción por electroforesis en gel de agarosa para obtener un fragmento del gen 43-X1 de aproximadamente 120 pb.

RC-43F: CACCACGCGCTACTGGGACT (SEQ ID NO: 20);
 RC-43R: GGATCCTGCGTTTACTTGC (SEQ ID NO: 21);
 NX-43F: GGATCCTGGGACAAGATG (SEQ ID NO: 22);
 NX-43R: GCACGACGGCTTGCAGC (SEQ ID NO: 23)

Se llevó a cabo la hibridación y la segunda fase de PCR usando los fragmentos de PCR 43-X1 y 43-X2 y el kit de mutagénesis in vitro de la PCR LA de TaKaRa. Dos ADN sintéticos, es decir, NX-43F y RC-43R, se utilizaron como cebadores y las condiciones de reacción eran de acuerdo con el manual adjunto al kit. Se separó una muestra después de la reacción mediante electroforesis en gel de agarosa para obtener un fragmento de gen H43 de 700 pb. Se digirió este fragmento con la enzima de restricción *Bam*HI para preparar el plásmido pR1H43 ligado al sitio *Bam*HI del plásmido pUC118 utilizando el kit de ligación de ADN de TaKaRa Ver. 1. Las condiciones de reacción, tales como las relacionadas con las enzimas, estaban de acuerdo con el manual adjunto al kit. El plásmido pR1H43 obtenido fue sometido a secuenciación usando el kit de secuenciación Cy5-Auto Read (Amersham Pharmacia), y se analizó la secuencia usando el secuenciador de ADN ALFred (Amersham Pharmacia). Un cebador utilizado en la reacción fue el cebador M13, que se encontraba adjunto al kit. Como resultado, se confirmó que la secuencia estaba en la forma esperada, es decir, una señal de secreción en el lado del terminal N se deriva de NCE5 y el dominio activo catalítico restante (CAD) era una secuencia derivada de RCE I. La secuencia de aminoácidos de la variante H43 de RCE I deducida a partir de la secuencia de nucleótidos se muestra a continuación.

H43: MQLPLFTLLTLLPALAAQSGSGRITTRYWDCCKPSCSWPGKANVSSPVKSCNKDG
 VTALSDSNAQSGCNGGNSYMCNDNQPWAVNDNLAYGFAAAAISGGGESRWCCSCFELTF
 TSTSVAGKKMVVQVTNTGGDLGSSTGAHFDLQMPGGGVGIFNGCSSQWGAPNDGWGSR
 YGGISSASDCSSLPSALQAGCKWRFNWFKNADNPSMTYKEVTCPEITAKTGCSRK
 (SEQ ID NO: 24)

En esta secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 24), los residuos de aminoácidos 1 a 18 son péptidos señal derivados de NCE5, los residuos de aminoácidos 19 a 24 son secuencias del terminal N de NCE5, los residuos de aminoácidos 25 a 36 son secuencias derivadas de NCE5 o RCE I, y el residuo de aminoácido 37 y las secuencias siguientes se derivan del dominio activo catalítico de RCE I.

5 Cuando se lleva a cabo la reacción de acuerdo con el método anterior, dos tipos de secuencias, es decir, la secuencia como se muestra en la SEQ ID NO: 24 y la secuencia en la que el residuo de aminoácido 34 es alanina, se obtienen como secuencias de aminoácidos de la proteína codificada por la secuencia de nucleótidos del fragmento del gen H43. En el siguiente procedimiento, un fragmento de gen utilizado tiene una secuencia de nucleótidos, que codifica la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 24.

[Ejemplo 2] Construcción del gen que expresa la variante H45 de RCE I, que carece del dominio de enlace a celulosa

10 pR1H4 obtenido en el Ejemplo 1 se utilizó como plantilla para introducir una sustitución de aminoácidos en el gen de RCE I utilizando ADN sintético, RC-A121P, y el kit de mutagénesis in vitro de la PCR LA de TaKaRa (Takara Shuzo Co., Ltd.). Las condiciones de reacción eran de acuerdo con el manual adjunto al kit. Se separó una muestra después de la reacción de electroforesis en gel de agarosa para obtener un fragmento del gen L9 de aproximadamente 1 kpb. Este fragmento se digirió con la enzima de restricción *Bam*HI y se lo ligó al sitio *Bam*HI del plásmido pUC118 utilizando el kit de ligación de ADN TaKaRa Ver. 1 para preparar el plásmido pR1L9. Las condiciones de reacción, tales como las relacionadas con las enzimas, estaban de acuerdo con el manual adjunto al kit. El plásmido pR1L9 obtenido fue sometido a reacción de secuenciación usando el kit de secuenciación Cy5-Auto Read (Amersham Pharmacia), y se analizó la secuencia usando el secuenciador de ADN ALFred (Amersham Pharmacia). Un ADN sintético utilizado como cebador en esta reacción fue H4-R1. Como resultado, se confirmó que la secuencia estaba en la forma esperada, es decir, una alanina fue sustituida con prolina.

20 RC-A121P: GACTGCTGCAAGCCGTCGTGC (SEQ ID NO: 42);
H4-R1: GTTGACATGTAGGAGTTGC (SEQ ID NO: 43)

25 Usando este pR1L9 como plantilla, se amplificó un gen que codifica una porción de la secuencia señal de secreción en el gen de RCE I. Se llevó a cabo la PCR utilizando dos ADN sintéticos, es decir, RC-451F y RC-451R, como cebadores, la Taq polimerasa Ex TaKaRa (Takara Shuzo Co., Ltd.), y los reguladores adjuntos. La composición de la solución de reacción estaba de acuerdo con las condiciones especificadas en el manual adjunto. Las condiciones de temperatura para el termociclador (2400-R, Perkin Elmer) fueron 25 ciclos de 94°C durante 1 minuto, 50°C durante 2 minutos, y 72°C durante 1 minuto. Se separó una muestra después de la reacción por electroforesis en gel de agarosa para obtener un fragmento del gen 45-X1 de aproximadamente 100 pb.

35 Del mismo modo, se amplificó una región que codifica el dominio catalítico activo (CAD) del gen de RCE I utilizando el pR1L9 como plantilla. Se llevó a cabo la PCR utilizando dos ADN sintéticos, es decir, RC-452F y RC-452R, como cebadores, la Taq polimerasa Ex TaKaRa (Takara Shuzo Co., Ltd.), y los reguladores adjuntos. La composición de la solución de la reacción estaba de acuerdo con las condiciones especificadas en el manual adjunto. Las condiciones de temperatura para el termociclador (2400-R, Perkin Elmer) fueron 25 ciclos de 94°C durante 1 minuto, 50°C durante 2 minutos, y 72°C durante 1 minuto. Se separó una muestra después de la reacción por electroforesis en gel de agarosa para obtener un fragmento del gen 45-X2 de aproximadamente 630 pb.

40 RC-451F: GCGGATCCTGGGACAAGATG (SEQ ID NO: 25);
RC-451R: GCCTGCAGAGCGGCGGAGGCCATC (SEQ ID NO: 26);
RC-452F: GCCTGCAGGGAAAGTACAGCGCTGT (SEQ ID NO: 27);
RC-452R: GCGGATCCTGCGTTTACTTGC (SEQ ID NO: 28)

45 Los fragmentos PCR 45-X y 45-X2 fueron digeridos con la enzima de restricción *Pst*I, se los ligó utilizando el kit de ligación de ADN TaKaRa Ver. 1 y, a continuación, digeridos con la enzima de restricción *Bam*HI para obtener un fragmento de ADN de 45-X3. Se llevó a cabo la PCR utilizando 45-X3 como plantilla, dos ADN sintéticos, es decir, RC-451F y RC-452R, como cebadores, la Taq polimerasa Ex TaKaRa (Takara Shuzo Co., Ltd.), y los reguladores adjuntos. La composición de la solución de reacción estaba de acuerdo con las condiciones especificadas en el manual adjunto. Las condiciones de temperatura para el termociclador (2400-R, Perkin Elmer) fueron 25 ciclos de 94°C durante 1 minuto, 50°C durante 2 minutos, y 72°C durante 1 minuto. Se separó un ejemplo después de la reacción por electroforesis en gel de agarosa para obtener un fragmento del gen H45 de aproximadamente 700 pb. Este fragmento fue digerido con la enzima de restricción *Bam*HI y ligado al sitio *Bam*HI del plásmido pUC118 usando el kit de ligación de ADN TaKaRa Ver. 1 para preparar el plásmido pR1H45. Las condiciones de reacción fueron de acuerdo con el manual de adjunto con el kit. La secuencia de aminoácidos de la variante H45 de RCE I deducida de la secuencia de nucleótidos se muestra a continuación.

H45: MKFTIASSALLALALGTEMASAALQGKYSAVSGGASGNGVTRYWDCKPSCSW

PGKANVSSPVKSCNKDGVLTALSDSNAQSGCNGGNSYMCNDNQPWAVNDNLAYGFAAA
 AISGGGESRWCCSCFELTFTSTSVAGKKMVVQVTNTGGDLGSSTGAHFQDLQMPGGGVGIF
 NGCSSQWGAPNDGWGSRYGGISSASDCSSLPSALQAGCKWRFNWFKNADNPSMTYKEV
 TCPKEITAKTGCSRK (SEQ ID NO: 29)

En esta secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 29), los residuos de aminoácidos 1 a 23 son péptidos señal derivados de RCE1, el residuo de aminoácido 24 es una secuencia del terminal N de RCE I, los residuos de aminoácidos 25 y 26 son secuencias introducidas por un cebador utilizado, y el residuo de aminoácido 27 y las siguientes secuencias se derivan del dominio catalítico activo de RCE I.

[Ejemplo 3] Expresión del codón del gen optimizado de endoglucanasa RCE I y sus variantes RCE I-H43 y H45, que carecen de los dominios de enlace a celulosa, en *Humicola insolens*

El plásmido pJD01 (véase el Ejemplo D1 (2) (b) en el documento WO 00/24879) se digirió con *Bam*HI y se desfosforiló usando fosfatasa alcalina derivada de *Escherichia coli* (Takara Shuzo Co., Ltd.) de acuerdo con el manual adjunto. Los plásmidos pR1H43 y pR1H45 obtenidos en los Ejemplos 1 y 2, respectivamente, también fueron digeridos con *Bam*HI para producir fragmentos de ADN de alrededor de 700 pb. Los fragmentos obtenidos se ligaron respectivamente con el plásmido pJD01 mencionado anteriormente utilizando el kit de ligación de ADN Ver. 1 para producir los plásmidos de expresión pJND-H43 y pJND-H45.

Se transformó la cepa MN 200-1 de *Humicola insolens* (FERM BP-5977) con pJND-H43, pJND-H45, o pJ14D01, que comprende el codón del gen optimizado de RCE I (plásmido que comprende un codón del gen optimizados de RCE I para expresar la RCE I derivada de *Rhizopus* en *Humicola*, véase el Ejemplo D3 (3) en el documento WO 00/24879). Específicamente, se cultivó la cepa MN 200-1 de *Humicola insolens* (FERM BP-5977) en medio (S) (3,0% de glucosa, 2,0% de extracto de levadura, 0,1% de polipeptona, 0,03% de cloruro de calcio, 0,03% de cloruro de magnesio (pH 6,8)) a 37°C durante 24 horas, y luego se recolectaron las células por centrifugación a 3000 rpm durante 10 minutos. Las células recolectadas se lavaron con sacarosa 0,5 M y se suspendieron en 10 ml de solución de la enzima para la preparación de protoplastos (5 mg/ml de Novozyme 234 (Novo), 5 mg/ml de Celulasa Onozuka R-10 (Yakult), y sacarosa 0,5 M), se filtró a través un filtro de 0,45 µm. La suspensión se agitó a 30°C durante 60 a 90 minutos para suministrar los hilos de los hongos que se van a convertir en protoplastos. Se filtró esta suspensión y después se centrifugó a 2.500 rpm durante 10 minutos, y se recolectó el protoplasto y después se lo lavó con un regulador de SUTC (sacarosa 0,5 M, cloruro de calcio 10 mM, y clorhidrato de Tris 10 mM (pH 7,5)).

El protoplasto preparado de este modo se suspendió en 1 mL de regulador de SUTC, y se añadieron 10 µl de solución de ADN (TE) a la suspensión en cantidades de 10 µg por cada 100 µl de la suspensión. Se dejó en reposo la mezcla en hielo durante 5 minutos. Posteriormente, se añadieron 400 µl de solución de PEG (60% de PEG 4000, cloruro de calcio 10 mM, clorhidrato de Tris 10 mM (pH 7,5)) y se dejó reposar la mezcla en hielo durante 20 minutos. Después de eso, se añadieron 10 ml de regulador de SUTC, y se realizó la centrifugación a 2.500 rpm durante 10 minutos. El protoplasto recogido se suspendió en 1 ml de regulador de SUTC, se centrifugó a 4000 rpm durante 5 minutos, y finalmente se suspendió en 100 µl de regulador de SUTC.

El protoplasto tratado como anteriormente se superpuso en un medio YMG que contenía 200 µg/ml de higromicina B (1% de glucosa, 0,4% de extracto de levadura, 0,2% de extracto de malta, 1% de agar (pH 6,8)), junto con agar YMG blando. Se incubó el cultivo a 37°C durante 5 días. Después de eso, se determinó que la colonia generada era un transformante.

El transformante obtenido se cultivó en un medio (N) (5,0% de Avicel, 2,0% de extracto de levadura, 0,1% de polipeptona, 0,03% de cloruro de calcio, 0,03% de cloruro de magnesio, pH 6,8) a 37°C. Se determinó que un sobrenadante del cultivo del que se removió de la materia sólida por centrifugación era una muestra de enzima.

[Ejemplo 4] Aislamiento y purificación de una variante de RCE I del transformante de *Humicola insolens*

Se inocularon transformantes de *Humicola insolens* en un medio (N) (5,0% de Avicel, 2,0% de extracto de levadura, 0,1% de polipeptona, 0,03% de cloruro de calcio, 0,03% de cloruro de magnesio, (pH 6,8)) y se sometió el cultivo a agitación a 37°C. Los transformantes en los que se han introducido los plásmidos pJND-H43 y H45-pJND se cultivaron durante 5 a 6 días. Con respecto a los transformantes en los que se había introducido el plásmido pJ14D01, se cultivó una muestra durante 4 días para obtener una enzima RCE I, que no se degradó en su dominio enlazador, y que sustenta un dominio de enlace a celulosa. En contraste, se cultivó una muestra más de 4 días, es decir, durante 5 a 6 días, para la obtención de la enzima RCE I, que se degradó en su dominio enlazador y carecía del dominio de enlace a celulosa. Cada una de las soluciones de

cultivo resultantes se centrifugó a 7000 rpm durante 20 minutos para remover las células, y se determinó que el sobrenadante del cultivo era una preparación de celulasa cruda.

5 Se preparó una solución de sulfato de amonio a una concentración final de 1,5 M a partir de 100 ml de esta preparación de celulasa cruda y luego se aplicó a un caudal de 10,0 ml/min para cromatografía hidrófoba con soporte de Metil HIC Macro-Prep (270 ml en volumen de gel, BioRad Laboratories) que había sido equilibrada previamente con una solución de sulfato de amonio 1,5 M. Después se fraccionó mediante elución a un caudal de 10,0 ml/min en un método de elución por etapas en el que la concentración de sulfato de amonio se redujo en 0,3 M cada vez hasta 1,5 M. Se encontró que las fracciones que tienen una fuerte actividad en la remoción de pelusa en liocel fueron: una fracción obtenida a una concentración de sulfato de amonio de 1,2 M con respecto a una solución de cultivo del transformante en el que se había introducido el plásmido pJND-H43 (en lo sucesivo denominado como una "solución de cultivo H43"); una fracción obtenida a una concentración de sulfato de amonio de 0,9 M con respecto a una solución de cultivo del transformante en el que se había introducido el plásmido pJND-H45 (en lo sucesivo denominada como una "solución de cultivo H45"); una fracción obtenida a una concentración de sulfato de amonio de 0,6 M con respecto a una solución de cultivo del transformante en la que se había introducido el plásmido pJI4D01 y se cultivaron durante 4 días (en lo sucesivo, una "solución de cultivo H4"); y una fracción obtenida a una concentración de sulfato de amonio de 0,9 M con respecto a una solución de cultivo del transformante en la que se había introducido el plásmido pJI4D01 y para la cual se había ampliado el periodo de cultivo para acelerar su degradación (en lo sucesivo denominado como un "producto de degradación H4"). Por lo tanto, se fraccionaron 100 ml cada una de estas fracciones.

20 Se preparó una solución de sulfato de amonio a una concentración final de 1,5 M a partir de 100 ml de las fracciones activas obtenidas y luego se aplican de nuevo a un caudal de 10,0 ml/min para cromatografía hidrófoba con soporte de Metil HIC Macro-Prep (270 ml en volumen de gel, BioRad Laboratories) que había sido equilibrada previamente con una solución de sulfato de amonio 1,5 M. Después se fraccionó mediante elución a un caudal de 10,0 ml/min en un método de elución por etapas en el que la concentración de sulfato de amonio se redujo en 0,15 M cada vez hasta 1,5 M. Se encontró que las fracciones que tienen actividad en la remoción de pelusa en liocel fueron: una fracción obtenida a una concentración de sulfato amónico de 1,35 M con respecto a la solución de cultivo H43; una fracción obtenida a una concentración de sulfato amónico de 1,05 M con respecto a la solución de cultivo H45; una fracción obtenida a una concentración de sulfato de amonio de 0,75 M con respecto a la solución de cultivo H4; y una fracción obtenida a una concentración de sulfato amónico de 1,05 M con respecto al producto de degradación H4. Por lo tanto, se fraccionaron 40 ml de cada una de estas fracciones.

35 Se preparó una solución de sulfato de amonio a una concentración final de 1,5 M a partir de 40 ml de las fracciones activas obtenidas y luego se aplicó a un caudal de 4,0 ml/min para cromatografía hidrófoba con soporte de Metil HIC Macro-Prep (25 ml en volumen de gel, BioRad Laboratories) que había sido equilibrada previamente con solución de sulfato de amonio 1,5 M. Después se fraccionó mediante elución a un caudal de 4,0 ml/min en agua desionizada. Entre estas fracciones, se fraccionaron 8 ml de la fracción, que se había encontrado que tiene fuerte actividad de remoción de pelusas en liocel.

40 Se preparó un regulador de acetato (150 ml, 50 mM, pH 4,0) mediante la dilución de las fracciones activas obtenidas, y se aplicó luego el regulador resultante a una velocidad de flujo de 2 ml/min a la columna MonoS 10-/10-HR (Amersham Pharmacia), que había sido previamente equilibrada con regulador de acetato 50 mM (pH 4,0). Después se fraccionó mediante elución a un caudal de 2 ml/min en un método de elución por etapas en el que la concentración de NaCl en regulador de acetato 50 mM (pH 4,0) se incrementó en 0,1 M cada vez hasta NaCl 1 M en regulador de acetato 50 mM (pH 5,0). Las fracciones que se obtuvieron a una concentración de NaCl de aproximadamente 0,2 a 0,3 M se encontró que tienen actividad de eliminación de pelusa de liocel. Por lo tanto, se fraccionaron 6 ml de la fracción que se encontró que tienen la actividad más fuerte. Estas fracciones mostraron en SDS-PAGE una única banda de aproximadamente 25 KDa con respecto a las proteínas purificadas a partir de la solución de cultivo H43, la solución de cultivo H45, y el producto de degradación H4 y una única banda de aproximadamente 40 KDa con respecto a la proteína purificada a partir de la solución de cultivo H4.

50 Se llevó a cabo un SDS-PAGE utilizando el sistema de Tefco en el que se usaron un tanque de electroforesis (No. 03-101), una fuente (Modelo: 3540), 10% de gel (01-015), y un kit de regulador para SDS-PAGE (06-0301). La condición para electroforesis fue de 18 mA/10 min y luego 20 mA/90 min. En la detección de la proteína después de la electroforesis, se llevó a cabo una tinción con plata utilizando un reactivo de coloración II 2D-plata "DAIICHI" (Daiichi Pure Chemicals Co., Ltd.) para la electroforesis. Una proteína estándar utilizada como marcador fue la proteína de peso molecular estándar SDS-PAGE, Rango Bajo (161-0304, BioRad).

La actividad de eliminación de pelusa de liocel se midió de acuerdo con el siguiente método.

60 El tejido de punto teñido de liocel (Toyoshima Japón) fue sometido a la formación de pelusa en una gran lavadora junto con un surfactante y bolas de goma. Después de eso, se cosió en forma cilíndrica el tejido de punto con pelusa de liocel (Toyoshima Japón, 9 cm x 10 cm, aproximadamente 2 g de peso) y se lo sometió a un tratamiento de eliminación de pelusas

con varias enzimas en las condiciones que se exponen a continuación. Se calcularon las concentraciones de proteína necesarias para eliminar completamente la pelusa existente en el tejido cilíndrico mediante este tratamiento.

5 Se calcularon las concentraciones de proteína de varias endoglucanasas a partir del área del pico a UV 280 nm de la respectiva endoglucanasa elida con un gradiente lineal de 0% a 80% de concentración de acetonitrilo en 0,05% de TFA (ácido trifluoroacético) a un caudal de 1,0 ml/min en el análisis por HPLC utilizando una columna TMS-250 de gel TSK (4,6 mm de diámetro interno x 7,5 cm, TOSOH Japón). El estándar utilizado fue la NCE4 purificada, que fue analizada por HPLC en las mismas condiciones, la concentración de proteína de la cual había sido medida previamente por el kit de ensayo de proteínas (BioRad Laboratories). El estándar usado para medir la concentración de proteína por el kit de ensayo de proteína era un estándar de albúmina (albúmina de suero bovino, fracción V, PIERCE). Se aisló la NCE4 purificada (codificada por los nucleótidos 118-1088 en la SEQ ID NO: 18) y se la purificó a partir de una solución de cultivo de *Humicola insolens* de acuerdo con el método descrito en el documento WO 98/03640.

10 Máquina de prueba: Launder Meter L-12 (Daiei Kagaku Seiki MFG, Japón)
 Temperatura: 55°C
 15 Tiempo: 60 minutos
 Volumen de reacción: 40 ml
 pH de la reacción: pH 5 (regulador de acetato 10 mM)
 pH 6 (regulador de acetato 10 mM)

20 El líquido de tratamiento contenía 4 bolas de goma (alrededor de 16 g cada una) junto con la solución de endoglucanasa.

[Ejemplo 5] Identificación de las secuencias de aminoácidos del terminal N de la proteína variante de RCE I aislada y purificada a partir del transformante de *Humicola insolens*

25 Con el fin de determinar las secuencias de aminoácidos del terminal N de las proteínas purificadas obtenidas en el Ejemplo 4, se sometieron cada uno de las fracciones a SDS-PAGEmini (Tefco), electrotransferidas sobre una membrana de PVDF, teñidas con Azul de Coomassie Brillante R-250 (Nacalai Tesque, Inc.), se decoloraron, se lavaron con agua, y luego se secaron al aire. Se escindió de la misma una porción en la que la proteína objetivo había sido transferida y se la sometió a un secuenciador de proteínas (Modelo 492, PE Applied Biosystems) para analizar la secuencia de aminoácidos del terminal N. Las secuencias de aminoácidos fueron leídas de las enzimas que se purificaron a partir de la solución de cultivo H45, la solución de cultivo H4, y el producto de degradación H4 sin ningún problema. Sin embargo, en cuanto a la enzima purificada a partir de la solución de cultivo H43, no se generó ninguna señal por la degradación de Edman y se encontró que el aminoácido del terminal N estaba modificado y protegido. Por lo tanto, se sumergió esta enzima en una solución de pirrolidona de polivinilo al 0,5% (peso molecular: 40.000, Sigma) / ácido acético 100 mM a 37°C durante 30 minutos, y, después se bloqueó una porción no enlazada de proteína sobre la membrana, se trató esta enzima con piroglutamato aminopeptidasa Pfu (Takara Shuzo Co., Ltd.) a 50°C durante 5 horas para remover el residuo del terminal N modificado. Por lo tanto, se llevó a cabo la secuenciación una vez más. Las secuencias obtenidas fueron como se muestra a continuación.

30 La secuencia de aminoácidos del terminal N de RCEI-H43:

40 Gln-Ser-Gly-Ser-Gly-Arg-Thr (7 residuos) (SEQ ID NO: 30).

La secuencia de aminoácidos del terminal N de RCE I-H45:

45 Lys-Tyr-Ser-Ala-Val-Ser-Gly (7 residuos) (SEQ ID NO: 31); y
 Ala-Val-Ser-Gly-Gly-Ala-Ser (7 residuos) (SEQ ID NO: 32).

La secuencia de aminoácidos del terminal N de RCE I-H4 (25 kDa):

50 Ser-Ala-Val-Ser-Gly-Gly-Ala (7 residuos) (SEQ ID NO: 33); y
 Gly-Gly-Ala-Ser-Gly-Asn-Gly (7 residuos) (SEQ ID NO: 34).

La secuencia de aminoácidos del terminal N de RCE I-H4 (40 kDa):

55 Ala-Glu-(Cys)-Ser-Lys-Leu-Tyr (7 residuos) (SEQ ID NO: 35).

60 Como resultado de la identificación de secuencias de aminoácidos del terminal N, se constató que sólo la enzima purificada a partir de la solución de cultivo H4 (denominada en lo sucesivo "RCE I-H4 (40 KDa)") tenían un dominio de enlace a celulosa (DEC), mientras que cualquiera de las enzimas restantes purificadas a partir de la solución de cultivo H43 (denominada en lo sucesivo "RCE I-H43 (25 KDa)"), la enzima purificada a partir de la solución de cultivo H45 (denominada en lo sucesivo "RCE I-H45 (25 KDa)"), o la enzima purificada a partir del producto de degradación H4 (denominada en lo

sucesivo "RCEI-H4 (25 KDa)") no tenían dominio de enlace a celulosa (DEC), sino que tenían sólo los dominios catalíticos activos (DCA).

5 [Ejemplo 6] Comparación de la actividad específica de remoción de la pelusa del tejido de algodón entre RCE I, que carece del dominio de enlace a celulosa, y RCE I, que tiene el dominio de enlace a celulosa

10 Usando la endoglucanasa que se purificó de forma homogénea en el Ejemplo 5, se sometió un tejido de algodón de punto (un tejido de 6 cm x 8 cm de algodón de punto liso N° 3900, Nitto Boseki Co., Ltd., teñido de color marrón mediante colorante reactivo en Tsuyatomo Senko), que había formado pelusa en una lavadora grande, a eliminación de la pelusa bajo las siguientes condiciones. Se evaluó visualmente la cantidad de pelusa restante no removida, y se determinó la cantidad de enzima purificada que se añade de modo que la cantidad de pelusa remanente alcanzaría el 50%. La cantidad de proteína se determinó utilizando el Reactivo de Ensayo de Proteína BCA (PIERCE) de acuerdo con las condiciones descritas en el manual adjunto. El peso molecular estimado de la proteína purificada RCE I de 40 KDa (RCE I-H4 (40 KDa)) es aproximadamente 1,5 veces mayor que aquellos de las proteínas RCE I purificadas de 25 KDa (RCE I-H43 (25 KDa)), RCE I-H45 (25 KDa), y RCE I-H4 (25 KDa)). Por consiguiente, aunque las cantidades cuantificadas de las proteínas son iguales, el número de moléculas de enzima en la proteína purificada RCE I de 40 KDa es sólo alrededor de dos tercios de aquella en la proteína purificada RCE I de 25 KDa en términos del número de moléculas de enzima contenidos en la proteína.

15 Máquina de prueba: Launder Meter L-20 (Daiei Kagaku Seiki MFG, Japón)

20 Temperatura: 40°C o 55°C

Tiempo: 120 minutos

Volumen de reacción: 40 ml

pH de la reacción: Reaccionó a pH 7 (regulador de fosfato 1 mM, preparado usando agua desionizada).

25 El líquido de tratamiento contenía 4 bolas de goma (alrededor de 16 g cada una) junto con la solución de la enzima.

Los resultados se muestran en la Tabla 2 a continuación.

Tabla 2

	La cantidad de enzima añadida a 40°C	La cantidad de enzima añadida a 55°C
RCE I-H4 purificada (40 KDa)	390 µg o más	390 µg o más
RCE I-H4 purificada (25 KDa)	18 µg	53 µg

30 Como es evidente a partir de los resultados mostrados en la Tabla 2, la proteína de 25 KDa, que carece del dominio de enlace a celulosa (DEC), exhibe una actividad mucho mayor de eliminación de la pelusa de tejidos de algodón que la proteína de 40 kDa, que tiene el dominio de enlace a celulosa (DEC) aunque ambas proteínas se originan a partir de las mismas endoglucanasas RCE I derivadas de *Zygomycetes*.

35 [Ejemplo 7] Comparación de la actividad específica de remoción de la pelusa de tejido de liocel entre RCE I, que carece del dominio de enlace a celulosa, y RCE I, que tiene el dominio de enlace a celulosa

40 Usando la endoglucanasa que se purificó de forma homogénea en el Ejemplo 5, se sometió un tejido de liocel (6 cm x 8 cm, Toyoshima Japón) a eliminación de pelusas bajo condiciones mejoradas a partir del método descrito en el Ejemplo 4. Se evaluó visualmente la cantidad de pelusa restante no removida, y se determinó la cantidad de enzima purificada requerida para quitar completamente la pelusa. Se determinó la cantidad de proteína utilizando el reactivo de ensayo de proteína BCA (PIERCE) de acuerdo con las condiciones descritas en el manual adjunto. El peso molecular estimado de la proteína purificada RCE I de 40 KDa (RCE I-H4 (40 KDa)) es aproximadamente 1,5 veces mayor que el de aquellas proteínas purificadas RCE I de 25 KDa (RCE I-H43 (25 KDa)), RCE I-H45 (25 KDa), y RCE I-H4 (25 KDa)). Por consiguiente, aunque las cantidades cuantificadas de proteína son las mismas, el número de moléculas de enzima en la proteína purificada RCE I de 40 KDa es de sólo dos tercios de aquella en la proteína purificada RCE I de 25 KDa en términos del número de moléculas de enzima contenidas en la proteína.

45 Máquina de prueba: Launder Meter L-20 (Daiei Kagaku Seiki MFG, Japón)

50 Temperatura: 40°C

Tiempo: 90 minutos

Volumen de reacción: 50 ml

pH de la reacción: Reaccionó a pH 6 (regulador de acetato 10 mM, preparado usando agua desionizada).

55 El líquido de tratamiento contenía 4 bolas de goma (alrededor de 16 g cada una) junto con la solución de la enzima.

Los resultados se muestran en la Tabla 3 a continuación.

Tabla 3

La cantidad de enzima añadida	
RCE I-H4 purificada (40 KDa)	32 µg
RCE I-H4 purificada (25 KDa)	11 µg

Como se desprende de los resultados que se muestran en la Tabla 3, RCE I, que es una endoglucanasa derivada de *Zygomycetes*, exhibe una actividad específica más alta de eliminación de la pelusa de tejidos de liocel que la proteína de 25 KDa, que carece del dominio de enlace a celulosa (DEC), que aquella de la proteína de 40 KDa, que tiene el dominio de enlace a celulosa (DEC).

[Ejemplo 8] Comparación de la actividad específica de eliminación de la pelusa del tejido de algodón entre RCE I, que carece del dominio de enlace a celulosa, y RCE I, que tiene el dominio de enlace a celulosa, bajo condiciones alcalinas, baja temperatura, y surfactante presente

Usando la endoglucanasa que se purificó de forma homogénea en el Ejemplo 5, se sometió un tejido de algodón de punto (un tejido de 6 cm x 8 cm de algodón de punto liso N° 3900, Nitto Boseki Co., Ltd., teñido de color marrón mediante colorante reactivo en Tsuyatomo Senko), que había formado pelusa en una lavadora grande, a eliminación de la pelusa bajo las siguientes condiciones. Se evaluó visualmente la cantidad de pelusa restante no removida, y se determinó la cantidad de enzima purificada que se añade de modo que la cantidad de pelusa remanente alcanzaría el 50%. La cantidad de proteína se determinó utilizando el Reactivo de Ensayo de Proteína BCA (PIERCE) de acuerdo con las condiciones descritas en el manual adjunto. El peso molecular estimado de la proteína purificada RCE I de 40 KDa (RCE I-H4 (40 KDa)) es aproximadamente 1,5 veces mayor que aquellos de las proteínas RCE I purificadas de 25 KDa (RCE I-H43 (25 KDa)), RCE I-H45 (25 KDa), y RCE I-H4 (25 KDa)). Por consiguiente, aunque las cantidades cuantificadas de las proteínas son iguales, el número de moléculas de enzima en la proteína purificada RCE I de 40 KDa es sólo alrededor de dos tercios de aquella en la proteína purificada RCE I de 25 KDa en términos del número de moléculas de enzima contenidos en la proteína.

Máquina de prueba: Launder Meter L-20 (Daiei Kagaku Seiki MFG, Japón)

Temperatura: 30°C

Tiempo: 120 minutos

Volumen de reacción: 40 ml

pH de la reacción: Reaccionó a pH 10 (regulador de carbonato de sodio 5 mM, preparado usando agua desionizada).

El líquido de tratamiento contenía un agente surfactante no iónico Persoft NK-100 (NOF Corp.) a una concentración final de 100 ppm junto con la solución de la enzima y 4 bolas de goma (alrededor de 16 g cada una).

Los resultados se muestran en la Tabla 4 a continuación.

Tabla 4

La cantidad de enzima añadida	
RCE I-H4 purificada (40 KDa)	390 µg o más
RCE I-H4 purificada (25 KDa)	52 µg

Como se desprende de los resultados mostrados en la Tabla 4, debido a la baja temperatura, condiciones alcalinas, y presencia de surfactante bajo las cuales se utilizan realmente los detergentes, la proteína de 25 KDa, que carece del dominio de enlace a celulosa (DEC), exhibe una actividad mucho mayor de remoción de la pelusa de los tejidos de algodón que la proteína de 40 KDa, que tiene el dominio de enlace a celulosa (DEC), a pesar de que ambas proteínas se originan a partir de las mismas endoglucanasas RCE I, derivadas de *Zygomycetes*.

[Ejemplo 9] Comparación de la actividad específica de remoción de la pelusa del tejido de algodón entre diferentes proteínas purificadas RCE I, que carecen de los dominios de enlace a celulosa.

Usando la endoglucanasa que se purificó de forma homogénea en el Ejemplo 5, se sometió un tejido de algodón de punto (un tejido de 6 cm x 8 cm de algodón de punto liso N° 3900, Nitto Boseki Co., Ltd., teñido de color marrón mediante colorante reactivo en Tsuyatomo Senko), que había formado pelusa en una lavadora grande, a eliminación de la pelusa bajo las siguientes condiciones. Se evaluó visualmente la cantidad de pelusa restante no removida, y se determinó la cantidad de enzima purificada que se añade de modo que la cantidad de pelusa remanente alcanzaría el 50%. La cantidad de proteína se determinó utilizando el Reactivo de Ensayo de Proteína BCA (PIERCE) de acuerdo con las condiciones descritas en el manual adjunto. El peso molecular estimado de la proteína purificada RCE I de 40 KDa (RCE I-H4 (40 KDa)) es aproximadamente 1,5 veces mayor que aquellos de las proteínas RCE I purificadas de 25 KDa (RCE I-H43 (25 KDa)), RCE I-H45 (25 KDa), y RCE I-H4 (25 KDa)). Por consiguiente, aunque las cantidades cuantificadas de las proteínas son iguales, el número de moléculas de enzima en la proteína purificada RCE I de 40 KDa es sólo alrededor de dos tercios de aquella en la proteína purificada RCE I de 25 KDa en términos del número de moléculas de enzima contenidos en la proteína.

Máquina de prueba: Launder Meter L-20 (Daiei Kagaku Seiki MFG, Japón)

Temperatura: 40°C

Tiempo: 120 minutos

Volumen de reacción: 40 ml

pH de la reacción: Reaccionó a pH 7 (regulador de fosfato 1 mM, preparado usando agua desionizada).

5

El líquido de tratamiento contenía 4 bolas de goma (alrededor de 16 g cada una) junto con la solución de la enzima.

Los resultados se muestran en la Tabla 5 a continuación.

10

Tabla 5	
	La cantidad de enzima añadida
RCE I-H4 purificada (40 KDa)	390 µg o más
RCE I-H43 purificada (25 KDa)	26 µg
RCE I-H45 purificada (25 KDa)	18 µg
RCE I-H4 purificada (25 KDa)	18 µg

Como se desprende de los resultados mostrados en la Tabla 5, varias proteínas RCE I como RCE I-H43 (25 kDa), RCE IH-45 (25 KDa), y RCE I-H4 (25 KDa), que carecen de los dominios de enlace a celulosa, exhiben una actividad mucho mayor de eliminación de la pelusa de tejidos de algodón que la proteína de 40 KDa RCE I-H4 (40 KDa), que tiene el dominio de enlace a celulosa (DEC). Esto indica que la proteína RCE I, que carece del dominio de enlace a celulosa (DEC), exhibe una actividad mucho mayor de eliminación de pelusa de tejidos de algodón que la proteína de 40 KDa, que tiene el dominio de enlace a celulosa (DEC), independientemente de la longitud del dominio enlazador restante en el lado del terminal N del dominio catalítico activo. También, sea o no una deficiencia artificial o no artificial, la proteína RCE I, que carece del dominio de enlace a celulosa (DEC), exhibe mucha mayor actividad de eliminación de la pelusa de tejidos de algodón que la proteína de 40 KDa RCE I-H4 (40 KDa), que tiene el dominio de enlace a celulosa (DEC).

15

20

[Ejemplo 10] Comparación de la actividad específica de eliminación de la pelusa del tejido de liocel entre diversas proteínas purificadas RCE, que carecen de los dominios de enlace a celulosa

25

Usando la endoglucanasa que se purificó de forma homogénea en el Ejemplo 5, se sometió un tejido de liocel (6 cm x 8 cm, Toyoshima Japón) a eliminación de pelusas bajo condiciones mejoradas a partir del método descrito en el Ejemplo 4. Se evaluó visualmente la cantidad de pelusa restante no removida, y se determinó la cantidad de enzima purificada requerida para quitar completamente la pelusa. Se determinó la cantidad de proteína utilizando el reactivo de ensayo de proteína BCA (PIERCE) de acuerdo con las condiciones descritas en el manual adjunto. El peso molecular estimado de la proteína purificada RCE I de 40 KDa (RCE I-H4 (40 KDa)) es aproximadamente 1,5 veces mayor que el de aquellas proteínas purificadas RCE I de 25 KDa (RCE I-H43 (25 KDa)), RCE I-H45 (25 KDa), y RCE I-H4 (25 KDa)). Por consiguiente, aunque las cantidades cuantificadas de proteína son las mismas, el número de moléculas de enzima en la proteína purificada RCE I de 40 KDa es de sólo aproximadamente dos tercios de aquella en la proteína purificada RCE I de 25 KDa en términos del número de moléculas de enzima contenidas en la proteína.

30

35

Máquina de prueba: Launder Meter L-20 (Daiei Kagaku Seiki MFG, Japón)

Temperatura: 40°C

Tiempo: 90 minutos

Volumen de reacción: 40 ml

pH de la reacción: Reaccionó a pH 6 (regulador de acetato 10 mM, preparado usando agua desionizada).

40

El líquido de tratamiento contenía 4 bolas de goma (alrededor de 16 g cada una) junto con la solución de enzima.

Los resultados se muestran en la Tabla 6 a continuación.

45

Tabla 6	
	La cantidad de enzima añadida
RCE I-H4 purificada (40 KDa)	32 µg
RCE I-H43 purificada (25 KDa)	12 µg
RCE I-H45 purificada (25 KDa)	11 µg
RCE I-H4 purificada (25 KDa)	11 µg

Como se desprende de los resultados mostrados en la Tabla 6, varias proteínas RCE I como RCE I-H43 (25 kDa), RCE IH-45 (25 KDa), y RCE I-H4 (25 KDa), que carecen de los dominios de enlace a celulosa, exhiben una actividad mucho mayor de eliminación de la pelusa de tejidos de liocel que la proteína de 40 KDa RCE I-H4 (40 KDa), que tiene el dominio de enlace a celulosa (DEC). Esto indica que la proteína RCE I, que carece del dominio de enlace a celulosa (DEC), exhibe una actividad mucho mayor de eliminación de pelusa de tejidos de liocel que la proteína de 40 kDa, que tiene el dominio de

50

enlace a celulosa (DEC), independientemente de la longitud del dominio enlazador restante en el lado del terminal N del dominio catalítico activo. También, sea o no una deficiencia artificial o no artificial, la proteína RCE I, que carece del dominio de enlace a celulosa (DEC), exhibe mucha mayor actividad de eliminación de la pelusa de tejidos de liocel que la proteína de 40 KDa RCE I-H4 (40 KDa), que tiene el dominio de enlace a celulosa (DEC).

5

Todas las publicaciones, patentes y solicitudes de patentes citadas aquí se incorporan en este documento como referencia en su totalidad.

Aplicabilidad Industrial

10

Cuando la endoglucanasa derivada de *Zygomycetes* tales como RCE I, RCE II, RCE III, MCE I, MCE II, o PCE I, que carecen del dominio de enlace a celulosa, se deja actuar, la actividad endoglucanasa puede ser mejorada significativamente en comparación con la endoglucanasa que tiene un dominio de enlace a celulosa. Por consiguiente, el tratamiento de tejidos tal como la reducción de la formación de pelusa, la mejora en la sensación y la apariencia, el aclaramiento del color, el cambio parcial de color, y el ablandamiento de los tejidos que contienen celulosa y la mejora en el destintado de papel de desecho y el drenaje de la pasta de papel se pueden efectuar con una cantidad menor de enzimas. Esto puede reducir los costes necesarios en forma notable.

15

Texto libre de listados de secuencias

20

SEQ ID NO: 13: Secuencia de codón optimizado correspondiente a la proteína RCE I (SEQ ID NO: 2)
 SEQ ID NO: 17 secuencia de aminoácidos de consenso que se encuentra en el dominio de enlace a celulosa de la endoglucanasa de la familia 45:
 SEQ ID NO: 20 a 23: cebadores
 SEQ ID NO: 24: proteína recombinante
 SEQ ID NO: 25 a 28: cebadores
 SEQ ID NO: 29: proteína recombinante
 SEQ ID NO: 30 a 35: secuencia de aminoácidos del terminal N de la proteína recombinante
 SEQ ID NO: 36 y 37: cebadores
 SEQ ID NO: 38 secuencia de aminoácidos de NCE5
 SEQ ID NO: 39: secuencia de ADNc de NCE5
 SEQ ID NO: 40 a 43: cebadores

25

30

LISTADO DE SECUENCIAS

35

<110> MEIJI SEIKA KAISHA, LTD.

<120> Enzima Endoglucanasa de *Zygomycetes* que Tiene Supresión del Dominio de Enlace a Celulosa

40

<130> PH-1443-PCT

<150> JP2000-354296

<151> 2000-11-21

45

<160> 43

<170> PatentIn Ver. 2.0

50

<210> 1

<211> 338

<212> PRT

<213> *Rhizopus oryzae* CP96001

55

<220>

<221> sig#péptido

<222> (-23)... (-1)

60

<220>

<221> mat#péptido

<222> (1)... (315)

ES 2 542 135 T3

<400> 1

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

Thr Ser Thr Ser Val Ala Gly Lys Lys Met Val Val Gln Val Thr Asn
 205 210 215
 Thr Gly Gly Asp Leu Gly Ser Ser Thr Gly Ala His Phe Asp Leu Gln
 220 225 230
 Met Pro Gly Gly Gly Val Gly Ile Phe Asn Gly Cys Ser Ser Gln Trp
 235 240 245
 Gly Ala Pro Asn Asp Gly Trp Gly Ser Arg Tyr Gly Gly Ile Ser Ser
 250 255 260 265
 Ala Ser Asp Cys Ser Ser Leu Pro Ser Ala Leu Gln Ala Gly Cys Lys
 270 275 280
 Trp Arg Phe Asn Trp Phe Lys Asn Ala Asp Asn Pro Ser Met Thr Tyr
 285 290 295
 Lys Glu Val Thr Cys Pro Lys Glu Ile Thr Ala Lys Thr Gly Cys Ser
 300 305 310
 Arg Lys
 315

5 <210> 2
 <211> 1017
 <212> ADN
 <213> Rhizopus oryzae CP96001

10 <220>
 <221> sig#péptido
 <222> (1)... (69)

15 <220>
 <221> mat#péptido
 <222> (70)... (1017)

<400> 2

ES 2 542 135 T3

tcc tgt agc tgg ccc ggt aag gcc aat gtc agt tct cct gtc aag tcc 480
 Ser Cys Ser Trp Pro Gly Lys Ala Asn Val Ser Ser Pro Val Lys Ser
 125 130 135

tgt aac aaa gat ggt gtc act gcc ctt agt gac agc aat gcc caa agt 528
 Cys Asn Lys Asp Gly Val Thr Ala Leu Ser Asp Ser Asn Ala Gln Ser
 140 145 150

ggc tgt aac ggt ggt aac agt tac atg tgt aac gac aac caa cct tgg 576
 Gly Cys Asn Gly Gly Asn Ser Tyr Met Cys Asn Asp Asn Gln Pro Trp
 155 160 165

gct gta aac gac aac ctt gcc tat ggt ttc gct gct gct gcc atc agt 624
 Ala Val Asn Asp Asn Leu Ala Tyr Gly Phe Ala Ala Ala Ala Ile Ser
 170 175 180 185

ggc ggt ggt gaa tct cgc tgg tgc tgt tct tgt ttc gaa ctt act ttc 672
 Gly Gly Gly Glu Ser Arg Trp Cys Cys Ser Cys Phe Glu Leu Thr Phe
 190 195 200

act tct acc tct gtt gct ggt aag aag atg gtt gtc caa gtc act aac 720
 Thr Ser Thr Ser Val Ala Gly Lys Lys Met Val Val Gln Val Thr Asn
 205 210 215

act ggt ggt gat ctt ggc tcc tct act ggt gct cac ttt gac ttg caa 768
 Thr Gly Gly Asp Leu Gly Ser Ser Thr Gly Ala His Phe Asp Leu Gln
 220 225 230

atg ccc ggt ggt ggt gtt ggt att ttc aat ggt tgt tcc agc caa tgg 816
 Met Pro Gly Gly Gly Val Gly Ile Phe Asn Gly Cys Ser Ser Gln Trp
 235 240 245

ggc gct ccc aat gac ggt tgg ggc tca aga tac ggt ggt att tct tct 864
 Gly Ala Pro Asn Asp Gly Trp Gly Ser Arg Tyr Gly Gly Ile Ser Ser
 250 255 260 265

gca tct gac tgc tct agt ctt cct tcc gca etc caa gct ggt tgt aaa 912
 Ala Ser Asp Cys Ser Ser Leu Pro Ser Ala Leu Gln Ala Gly Cys Lys

ES 2 542 135 T3

```

                270                275                280
tgg aga ttc aac tgg ttc aag aac gct gal aac cca agc atg act tac 960
Trp Arg Phe Asn Trp Phe Lys Asn Ala Asp Asn Pro Ser Met Thr Tyr
                285                290                295
aag gaa gtt acc tgt cct aag gaa atc acc gcc aag aca ggt tgt tca 1008
Lys Glu Val Thr Cys Pro Lys Glu Ile Thr Ala Lys Thr Gly Cys Ser
                300                305                310
aga aaa taa
Arg Lys
                315

```

5 <210> 3
 <211> 366
 <212> PRT
 <213> Rhizopus oryzae CP96001

10 <220>
 <221> sig#péptido
 <222> (-23)... (-1)

15 <220>
 <221> mat#péptido
 <222> (1)... (343)

<400> 3

```

Met Lys Phe Ile Thr Ile Thr Ser Ser Ala Leu Leu Ala Leu Ala Leu
                -20                -15                -10
Gly Thr Glu Met Ala Ser Ala Ala Lys Cys Ser Lys Leu Tyr Gly Gln
                -5                1                5

```

20

ES 2 542 135 T3

```

                235                240                245
Leu Gly Ser Ser Thr Gly Ala His Phe Asp Leu Gln Met Pro Gly Gly
250                255                260                265
Gly Val Gly Ile Phe Asn Gly Cys Ser Lys Gln Trp Gly Ala Pro Asn
                270                275                280
Asp Gly Trp Gly Ser Arg Tyr Gly Gly Ile Ser Ser Ala Ser Asp Cys
                285                290                295
Ser Ser Leu Pro Ser Ala Leu Gln Ala Gly Cys Lys Trp Arg Phe Asn
                300                305                310
Trp Phe Lys Asn Ala Asp Asn Pro Ser Met Thr Tyr Lys Glu Val Thr
                315                320                325
Cys Pro Lys Glu Ile Thr Ala Lys Thr Gly Cys Ser Arg Lys
330                335                340

```

5 <210> 4
 <211> 1101
 <212> ADN
 <213> Rhizopus oryzae CP96001

10 <220>
 <221> sig#péptido
 <222> (1)... (69)

15 <220>
 <221> mat#péptido
 <222> (70)... (1101)
 <400> 4

atg aag ttt att act att acc tct tcc gcc ctc ttg gcc ctc gcc ctt 48

ES 2 542 135 T3

Met Lys Phe Ile Thr Ile Thr Ser Ser Ala Leu Leu Ala Leu Ala Leu
-20 -15 -10
ggt act gaa atg gcc tct gct gct aaa tgt agc aag ctg tat ggt caa 96
Gly Thr Glu Met Ala Ser Ala Ala Lys Cys Ser Lys Leu Tyr Gly Gln
-5 1 5
tgt ggt ggt aag gac tgg aat ggc cct act tgt tgc gaa tct gga tcc 144
Cys Gly Gly Lys Asp Trp Asn Gly Pro Thr Cys Cys Glu Ser Gly Ser
10 15 20 25
acc tgt aaa gta agc aac gat tac tac tct caa tgt ctt gcc cct gaa 192
Thr Cys Lys Val Ser Asn Asp Tyr Tyr Ser Gln Cys Leu Ala Pro Glu
30 35 40
agc aac ggc aat aag tct tct gaa tgt agc aag ttg tat ggt caa tgt 240
Ser Asn Gly Asn Lys Ser Ser Glu Cys Ser Lys Leu Tyr Gly Gln Cys
45 50 55
ggt ggt aag gac tgg aat ggc cct act tgt tgc gaa tct gga tcc acc 288
Gly Gly Lys Asp Trp Asn Gly Pro Thr Cys Cys Glu Ser Gly Ser Thr
60 65 70
tgt aaa gta agc aac gat tac tac tct caa tgt ctt gcc cct gaa agc 336
Cys Lys Val Ser Asn Asp Tyr Tyr Ser Gln Cys Leu Ala Pro Glu Ser
75 80 85
aat ggc aat aaa act tct gaa agc gct cat aaa acg act act acc act 384
Asn Gly Asn Lys Thr Ser Glu Ser Ala His Lys Thr Thr Thr Thr Thr
90 95 100 105
gct ccc gct aag gaa att aca act act gcc aaa gct tea aac tct tct 432
Ala Pro Ala Lys Glu Ile Thr Thr Thr Ala Lys Ala Ser Asn Ser Ser
110 115 120
aac tct agc ggc aaa tac tcc att gtc tct ggt ggt gcc tct ggt aac 480
Asn Ser Ser Gly Lys Tyr Ser Ile Val Ser Gly Gly Ala Ser Gly Asn
125 130 135

ES 2 542 135 T3

ggt gtc act act cgt tat tgg gat tgc tgt aag gcc tcc tgt agc tgg 528
 Gly Val Thr Thr Arg Tyr Trp Asp Cys Cys Lys Ala Ser Cys Ser Trp
 140 145 150
 ccc ggt aag gcc aat gtc agt tct cct gtc aag tcc tgt aac aaa gat 576
 Pro Gly Lys Ala Asn Val Ser Ser Pro Val Lys Ser Cys Asn Lys Asp
 155 160 165
 ggt gtc act gcc ctt agt gac agc aat gtc caa agt ggc tgt aac ggt 624
 Gly Val Thr Ala Leu Ser Asp Ser Asn Val Gln Ser Gly Cys Asn Gly
 170 175 180 185
 ggt aac agt tac atg tgt aac gac aac cag cct tgg gct gta aac gat 672
 Gly Asn Ser Tyr Met Cys Asn Asp Asn Gln Pro Trp Ala Val Asn Asp
 190 195 200
 aat ctt gcc tat ggt ttc gct gct gct gcc atc agt ggt ggt ggt gaa 720
 Asn Leu Ala Tyr Gly Phe Ala Ala Ala Ile Ser Gly Gly Gly Glu
 205 210 215
 tct cgc tgg tgc tgt tct tgt ttc gaa ctt act ttc act tct acc tct 768
 Ser Arg Trp Cys Cys Ser Cys Phe Glu Leu Thr Phe Thr Ser Thr Ser
 220 225 230
 gtt gct ggt aag aag atg gtt atc caa gtc act aac act ggt ggt gat 816
 Val Ala Gly Lys Lys Met Val Ile Gln Val Thr Asn Thr Gly Gly Asp
 235 240 245
 ctt ggc tcc tct act ggt gct cac ttt gac ttg caa atg ccc ggt ggt 864
 Leu Gly Ser Ser Thr Gly Ala His Phe Asp Leu Gln Met Pro Gly Gly
 250 255 260 265
 ggt gtt ggt att ttc aat ggt tgc tcc aag caa tgg ggt gct ccc aat 912
 Gly Val Gly Ile Phe Asn Gly Cys Ser Lys Gln Trp Gly Ala Pro Asn
 270 275 280
 gac ggt tgg ggc tcg aga tac ggt ggt att tct tct gca tct gac tgc 960
 Asp Gly Trp Gly Ser Arg Tyr Gly Gly Ile Ser Ser Ala Ser Asp Cys

ES 2 542 135 T3

```

                285                290                295
tct agt ctt cct tcc gca ctc caa gct ggt tgt aaa tgg aga ttc aac 1008
Ser Ser Leu Pro Ser Ala Leu Gln Ala Gly Cys Lys Trp Arg Phe Asn
                300                305                310
tgg ttc aag aac gct gat aac cca agc atg act tac aag gaa gtt acc 1056
Trp Phe Lys Asn Ala Asp Asn Pro Ser Met Thr Tyr Lys Glu Val Thr
                315                320                325
tgt ccc aag gaa atc acc gcc aag aca ggt tgt tca aga aaa taa      1101
Cys Pro Lys Glu Ile Thr Ala Lys Thr Gly Cys Ser Arg Lys
330                335                340

```

5 <210> 5
 <211> 360
 <212> PRT
 <213> Rhizopus oryzae CP96001

10 <220>
 <221> sig#péptido
 <222> (-23)... (-1)

15 <220>
 <221> mat#péptido
 <222> (1)... (337)

<400> 5

```

Met Lys Phe Leu Thr Ile Ala Ser Ser Ala Ile Leu Ala Leu Ala Val
                -20                -15                -10
Gly Thr Glu Met Ala His Ala Ala Glu Cys Ser Lys Ala Tyr Tyr Gln
                -5                1                5

```

20


```

                235                240                245
Ala His Phe Asp Leu Gln Met Pro Gly Gly Gly Val Gly Ile Tyr Asn
250                255                260                265
Gly Cys Ala Thr Gln Trp Gly Ala Pro Thr Asp Gly Trp Gly Ala Arg
                270                275                280
Tyr Gly Gly Val Ser Ser Ala Ser Asp Cys Ser Asn Leu Pro Ser Ala
                285                290                295
Leu Gln Ala Gly Cys Lys Trp Arg Phe Gly Trp Phe Lys Asn Ala Asp
                300                305                310
Asn Pro Thr Met Thr Tyr Lys Gln Val Thr Cys Pro Lys Ala Ile Thr
                315                320                325
Ala Lys Ser Gly Cys Ser Arg Lys
330                335

```

5 <210> 6
 <211> 1083
 <212> ADN
 <213> Rhizopus oryzae CP96001

10 <220>
 <221> sig#péptido
 <222> (1)... (69)

15 <220>
 <221> mat#péptido
 <222> (70)... (1083)

<400> 6

atg aag ttc ctt acc att gcc tcc tcc get atc ttg gea ctt gcc gtc 48

ES 2 542 135 T3

Met	Lys	Phe	Leu	Thr	Ile	Ala	Ser	Ser	Ala	Ile	Leu	Ala	Leu	Ala	Val	
			-20					-15						-10		
ggt	act	gaa	atg	gcc	cat	gct	gct	gaa	tgt	agc	aag	gct	tac	tac	caa	96
Gly	Thr	Glu	Met	Ala	His	Ala	Ala	Glu	Cys	Ser	Lys	Ala	Tyr	Tyr	Gln	
		-5					1				5					
tgt	ggt	ggt	aag	aac	tgg	gat	gga	cct	acc	tgc	tgt	gaa	tct	ggc	tct	144
Cys	Gly	Gly	Lys	Asn	Trp	Asp	Gly	Pro	Thr	Cys	Cys	Glu	Ser	Gly	Ser	
	10				15					20					25	
act	tgc	gtt	gat	tat	cct	gac	aat	cct	ttc	tac	tcc	caa	tgt	gtt	ccc	192
Thr	Cys	Val	Asp	Tyr	Pro	Asp	Asn	Pro	Phe	Tyr	Ser	Gln	Cys	Val	Pro	
				30					35					40		
aat	gaa	aac	ctc	acc	tcc	act	aac	aaa	tct	tct	cac	aaa	acc	acc	act	240
Asn	Glu	Asn	Leu	Thr	Ser	Thr	Asn	Lys	Ser	Ser	His	Lys	Thr	Thr	Thr	
			45					50						55		
act	gag	agt	gcc	aag	aag	act	acc	act	act	aaa	ggt	tcc	aag	aag	acc	288
Thr	Glu	Ser	Ala	Lys	Lys	Thr	Thr	Thr	Thr	Lys	Gly	Ser	Lys	Lys	Thr	
			60					65						70		
acc	act	act	gaa	gcc	tct	aag	aag	acc	acc	act	act	gaa	gct	tcc	aag	336
Thr	Thr	Thr	Glu	Ala	Ser	Lys	Lys	Thr	Thr	Thr	Thr	Glu	Ala	Ser	Lys	
			75					80						85		
aag	acc	acc	act	act	gaa	gcc	tct	aag	aag	acc	acc	act	act	act	aag	384
Lys	Thr	Thr	Thr	Thr	Glu	Ala	Ser	Lys	Lys	Thr	Thr	Thr	Thr	Thr	Lys	
			90			95				100					105	
aag	gct	tct	acc	tcc	act	tcc	tct	tcc	tct	tct	tct	gct	tct	aca	aac	432
Lys	Ala	Ser	Thr	Ser	Thr	Ser	Ala	Ser	Thr	Asn						
					110					115					120	
tac	tcc	gct	gtc	tct	ggt	ggt	gcc	tcc	ggt	aat	ggt	gaa	acc	act	cgc	480
Tyr	Ser	Ala	Val	Ser	Gly	Gly	Ala	Ser	Gly	Asn	Gly	Glu	Thr	Thr	Arg	
					125					130					135	

ES 2 542 135 T3

tac tgg gat tgt tgt aag cct tct tgc agt tgg ccc ggt aag gct gat	528
Tyr Trp Asp Cys Cys Lys Pro Ser Cys Ser Trp Pro Gly Lys Ala Asp	
140 145 150	
gtc acc tcc cct gtt ggc tcc tgt aac aag gat ggt aag act ctt gct	576
Val Thr Ser Pro Val Gly Ser Cys Asn Lys Asp Gly Lys Thr Leu Ala	
155 160 165	
gat aac aac act caa aac ggc tgt gtt ggt ggt agc agc tac acc tgt	624
Asp Asn Asn Thr Gln Asn Gly Cys Val Gly Gly Ser Ser Tyr Thr Cys	
170 175 180 185	
aat gac aat caa cct tgg gtt gtt agc gac gac ctt gcc tac ggt ttc	672
Asn Asp Asn Gln Pro Trp Val Val Ser Asp Asp Leu Ala Tyr Gly Phe	
190 195 200	
gcc gct gct tcc att tct ggt ggt agc gaa gct act tgg tgt tgt gcc	720
Ala Ala Ala Ser Ile Ser Gly Gly Ser Glu Ala Thr Trp Cys Cys Ala	
205 210 215	
tgt ttc gaa ctg aca ttc acc tct act gcc gtc aag ggt aag aag atg	768
Cys Phe Glu Leu Thr Phe Thr Ser Thr Ala Val Lys Gly Lys Lys Met	
220 225 230	
gtt gtt caa gta acc aac act ggt tct gac ctt ggc tct aac act ggt	816
Val Val Gln Val Thr Asn Thr Gly Ser Asp Leu Gly Ser Asn Thr Gly	
235 240 245	
gct cac ttt gac ttg caa atg ccc ggt ggt ggt gtt ggt atc tac aat	864
Ala His Phe Asp Leu Gln Met Pro Gly Gly Gly Val Gly Ile Tyr Asn	
250 255 260 265	
ggt tgt gcc act caa tgg ggt gct ccc acc gat ggt tgg ggt gca aga	912
Gly Cys Ala Thr Gln Trp Gly Ala Pro Thr Asp Gly Trp Gly Ala Arg	
270 275 280	
tac ggc ggt gtt tct tct gcc tct gac tgt tct aac ctt cct tct gcc	960
Tyr Gly Gly Val Ser Ser Ala Ser Asp Cys Ser Asn Leu Pro Ser Ala	

ES 2 542 135 T3

```

                285                290                295
citt caa gct ggt tgt aag tgg aga ttc ggc tgg ttc aaa aac gct gat 1008
Leu Gln Ala Gly Cys Lys Trp Arg Phe Gly Trp Phe Lys Asn Ala Asp
                300                305                310
aac cca acc atg acc tac aaa caa gtt acc tgt ccc aag gct atc act 1056
Asn Pro Thr Met Thr Tyr Lys Gln Val Thr Cys Pro Lys Ala Ile Thr
                315                320                325
gcc aag tct ggc tgt tca aga aaa taa 1083
Ala Lys Ser Gly Cys Ser Arg Lys
                330                335

```

5 <210> 7
 <211> 338
 <212> PRT
 <213> Mucor circinelloides CP99001

10 <220>
 <221> sig#péptido
 <222> (-22)... (-1)

15 <220>
 <221> mat#péptido
 <222> (1)... (316)

<400> 7

```

Met Lys Phe Thr Val Ala Ile Thr Ser Ile Ala Val Ala Leu Ala Leu
      -20                -15                -10
Ser Ser Ser Ala Glu Ala Ala Ser Cys Ser Ser Val Tyr Gly Gln Cys
      -5                1                5                10

```

ES 2 542 135 T3

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

```

235                240                245                250
Gly Ala Pro Asn Asp Gly Trp Gly Ala Arg Tyr Gly Gly Val Ser Ser
                255                260                265
Val Ser Asp Cys Ala Ser Leu Pro Ser Ala Leu Gln Ala Gly Cys Lys
                270                275                280
Trp Arg Phe Asn Trp Phe Lys Asn Ser Asp Asn Pro Thr Met Thr Phe
                285                290                295
Lys Glu Val Thr Cys Pro Ala Glu Leu Thr Thr Arg Ser Gly Cys Glu
                300                305                310
Arg Lys
315

```

5 <210> 8
 <211> 1017
 <212> ADN
 <213> Mucor circinelloides CP99001

10 <220>
 <221> sig#péptido
 <222> (1)... (66)

15 <220>
 <221> mat#péptido
 <222> (67)... (1017)

<400> 8

```

atg aag ttc acc gtt gct att act tca atc gct gtt gca ctc gct ctc 48
Met Lys Phe Thr Val Ala Ile Thr Ser Ile Ala Val Ala Leu Ala Leu
                -20                -15                -10

```

ES 2 542 135 T3

agc tct tct gct gaa gct gct tct tgc agc tct gtc tat ggt caa tgt	96
Ser Ser Ser Ala Glu Ala Ala Ser Cys Ser Ser Val Tyr Gly Gln Cys	
-5 1 5 10	
ggt ggc att gga tgg agt gga cct acc tgt tgt gaa agt ggc tct act	144
Gly Gly Ile Gly Trp Ser Gly Pro Thr Cys Cys Glu Ser Gly Ser Thr	
15 20 25	
tgc gtt gct caa gaa ggc aac aaa tac tac tct caa tgt ctt ccc gga	192
Cys Val Ala Gln Glu Gly Asn Lys Tyr Tyr Ser Gln Cys Leu Pro Gly	
30 35 40	
tcc cac agt aac aat gct ggt aac gct agc agc acc aag aag aca tct	240
Ser His Ser Asn Asn Ala Gly Asn Ala Ser Ser Thr Lys Lys Thr Ser	
45 50 55	
acc aag aca tct act acc acc gcc aag gct act gct act gtc acc acc	288
Thr Lys Thr Ser Thr Thr Thr Ala Lys Ala Thr Ala Thr Val Thr Thr	
60 65 70	
aag aca gta acc aag aca act acc aag aca act acc aag act agc act	336
Lys Thr Val Thr Lys Thr Thr Thr Lys Thr Thr Thr Lys Thr Ser Thr	
75 80 85 90	
act gcc gct gct tct act tcc acc tct tct tct gct ggt tac aag gtc	384
Thr Ala Ala Ala Ser Thr Ser Thr Ser Ser Ser Ala Gly Tyr Lys Val	
95 100 105	
atc tct ggc ggt aaa tct ggc agt ggt tcc aca act cgt tat tgg gat	432
Ile Ser Gly Gly Lys Ser Gly Ser Gly Ser Thr Thr Arg Tyr Trp Asp	
110 115 120	
tgt tgt aaa gct tct tgc agc tgg cct gga aaa gct tct gtc act ggt	480
Cys Cys Lys Ala Ser Cys Ser Trp Pro Gly Lys Ala Ser Val Thr Gly	
125 130 135	
cct gtt gac acc tgt gcc tcc aat ggt atc tct tta tta gat gcc aat	528
Pro Val Asp Thr Cys Ala Ser Asn Gly Ile Ser Leu Leu Asp Ala Asn	

ES 2 542 135 T3

140	145	150	
gct caa agt ggt tgt aac ggt ggt aat ggt ttc atg tgt aac aac aac			576
Ala Gln Ser Gly Cys Asn Gly Gly Asn Gly Phe Met Cys Asn Asn Asn			
155	160	165	170
caa cct tgg gct gtc aat gat gag ctc gct tac ggt ttc gct gct gcc			624
Gln Pro Trp Ala Val Asn Asp Glu Leu Ala Tyr Gly Phe Ala Ala Ala			
	175	180	185
tct att gct ggc tcc aac gaa gct gga tgg tgt tgt ggc tgt tat gaa			672
Ser Ile Ala Gly Ser Asn Glu Ala Gly Trp Cys Cys Gly Cys Tyr Glu			
	190	195	200
ttg acc ttc act tct ggc gct gct tct gga aag aag atg gtt gtt caa			720
Leu Thr Phe Thr Ser Gly Ala Ala Ser Gly Lys Lys Met Val Val Gln			
	205	210	215
gtt acc aac acc ggt ggc gat tta ggc tct aac cac ttt gat ttg caa			768
Val Thr Asn Thr Gly Gly Asp Leu Gly Ser Asn His Phe Asp Leu Gln			
	220	225	230
atg ccc ggt ggt ggc gtt ggt atc ttc aat ggc tgt gct gct caa tgg			816
Met Pro Gly Gly Gly Val Gly Ile Phe Asn Gly Cys Ala Ala Gln Trp			
235	240	245	250
ggc gct ccc aat gat ggc tgg gga gct aga tat ggt ggt gtc agc tct			864
Gly Ala Pro Asn Asp Gly Trp Gly Ala Arg Tyr Gly Gly Val Ser Ser			
	255	260	265
gtc tct gac tgt gcc tct ctt ccc tct gct ctt caa gct ggt tgt aaa			912
Val Ser Asp Cys Ala Ser Leu Pro Ser Ala Leu Gln Ala Gly Cys Lys			
	270	275	280
tgg aga ttc aac tgg ttc aag aac tct gat aac cct acc atg acc ttc			960
Trp Arg Phe Asn Trp Phe Lys Asn Ser Asp Asn Pro Thr Met Thr Phe			
	285	290	295
aag gaa gtt acc tgt cct gct gaa tta act act cgc tca ggt tgc gaa			1008

Lys Glu Val Thr Cys Pro Ala Glu Leu Thr Thr Arg Ser Gly Cys Glu

300 305 310

aga aag taa

1017

Arg Lys

315

5 <210> 9
 <211> 387
 <212> PRT
 <213> Mucor circinelloides CP99001

10 <220>
 <221> sig#péptido
 <222> (-22)... (-1)

15 <220>
 <221> mat#péptido
 <222> (1)... (365)

<400> 9

Met Lys Phe Thr Val Ala Ile Thr Ser Ile Ala Val Ala Leu Ala Leu

-20 -15 -10

Ser Ser Ser Ala Glu Ala Ala Ser Cys Ser Ser Val Tyr Gly Gln Cys

-5 1 5 10

Gly Gly Ile Gly Trp Thr Gly Pro Thr Cys Cys Asp Ala Gly Ser Thr

15 20 25

Cys Lys Ala Gln Lys Asp Asn Lys Tyr Tyr Ser Gln Cys Ile Pro Lys

30 35 40

Pro Lys Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Cys Ser Ser Val Tyr Ser Gln

Gln Met Pro Gly Gly Gly Val Gly Ile Phe Asn Gly Cys Ala Ala Gln
 285 290 295
 Trp Gly Ala Pro Asn Asp Gly Trp Gly Ala Arg Tyr Gly Gly Val Ser
 300 305 310
 Ser Val Ser Asp Cys Ala Ser Leu Pro Ser Ala Leu Gln Ala Gly Cys
 315 320 325 330
 Lys Trp Arg Phe Asn Trp Phe Lys Asn Ser Asp Asn Pro Thr Met Thr
 335 340 345
 Phe Lys Glu Val Thr Cys Pro Ala Glu Leu Thr Thr Arg Ser Gly Cys
 350 355 360
 Glu Arg Lys
 365

5 <210> 10
 <211> 1164
 <212> ADN
 <213> Mucor circinelloides CP99001

10 <220>
 <221> sig#péptido
 <222> (1)... (66)

15 <220>
 <221> mat#péptido
 <222> (67)... (1164)

<400> 10

atg aag ttc acc gtt gct att act tca atc gct gtt gca ctc gct ctc 48
 Met Lys Phe Thr Val Ala Ile Thr Ser Ile Ala Val Ala Leu Ala Leu

ES 2 542 135 T3

	-20		-15		-10			
	agc tct tct gct gaa gct gct tct tgc agc tct gtc tat ggt caa tgt						96	
	Ser Ser Ser Ala Glu Ala Ala Ser Cys Ser Ser Val Tyr Gly Gln Cys							
	-5		1		5		10	
	ggt ggc att ggc tgg act ggt cct aca tgt tgt gat gct gga tgc acc						144	
	Gly Gly Ile Gly Trp Thr Gly Pro Thr Cys Cys Asp Ala Gly Ser Thr							
		15		20		25		
	tgt aaa gct caa aag gat aac aaa tat tat tct caa tgt att ccc aaa						192	
	Cys Lys Ala Gln Lys Asp Asn Lys Tyr Tyr Ser Gln Cys Ile Pro Lys							
		30		35		40		
	ccc aag ggt tcc tcc tca tca tca tca tgt agt tcc gtc tat agt caa						240	
	Pro Lys Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Cys Ser Ser Val Tyr Ser Gln							
		45		50		55		
	tgc ggt ggc att gga tgg agt gga cct acc tgt tgt gaa agt ggc tct						288	
	Cys Gly Gly Ile Gly Trp Ser Gly Pro Thr Cys Cys Glu Ser Gly Ser							
		60		65		70		
	act tgc gtt gct caa gaa ggc aac aaa tac tac tct caa tgt ctt ccc						336	
	Thr Cys Val Ala Gln Glu Gly Asn Lys Tyr Tyr Ser Gln Cys Leu Pro							
		75		80		85		90
	gga tcc cac agt aac aat gct ggt aac gct agc agc acc aag aag aca						384	
	Gly Ser His Ser Asn Asn Ala Gly Asn Ala Ser Ser Thr Lys Lys Thr							
		95		100		105		
	tct acc aag aca tct act acc acc gcc aag gct act gct act gtc acc						432	
	Ser Thr Lys Thr Ser Thr Thr Thr Ala Lys Ala Thr Ala Thr Val Thr							
		110		115		120		
	acc aag aca gta acc aag aca act acc aag aca act acc aag act agc						480	
	Thr Lys Thr Val Thr Lys Thr Thr Thr Lys Thr Thr Thr Lys Thr Ser							
		125		130		135		
	act act gcc gct gct tct act tcc acc tct tct tct gct ggt tac aag						528	

ES 2 542 135 T3

Thr Thr Ala Ala Ala Ser Thr Ser Thr Ser Ser Ser Ala Gly Tyr Lys
 140 145 150
 gtc atc tct ggc ggt aaa tct ggc agt ggt tcc aca act cgt tat tgg 576
 Val Ile Ser Gly Gly Lys Ser Gly Ser Gly Ser Thr Thr Arg Tyr Trp
 155 160 165 170
 gat tgt tgt aaa gct tct tgc agc tgg cct gga aaa gct tct gtc act 624
 Asp Cys Cys Lys Ala Ser Cys Ser Trp Pro Gly Lys Ala Ser Val Thr
 175 180 185
 ggt cct gtt gac acc tgt gcc tcc aat ggt atc tct tta tta gat gcc 672
 Gly Pro Val Asp Thr Cys Ala Ser Asn Gly Ile Ser Leu Leu Asp Ala
 190 195 200
 aat gct caa agt ggt tgt aac ggt ggt aat ggt ttc atg tgt aac aac 720
 Asn Ala Gln Ser Gly Cys Asn Gly Gly Asn Gly Phe Met Cys Asn Asn
 205 210 215
 aac caa cct tgg gct gtc aat gat gag ctc gct tac ggt ttc gct gct 768
 Asn Gln Pro Trp Ala Val Asn Asp Glu Leu Ala Tyr Gly Phe Ala Ala
 220 225 230
 gcc tct att gct ggc tcc aac gaa gct gga tgg tgt tgt ggc tgt tat 816
 Ala Ser Ile Ala Gly Ser Asn Glu Ala Gly Trp Cys Cys Gly Cys Tyr
 235 240 245 250
 gaa ttg acc ttc act tct ggc gct gct tct gga aag aag atg gtt gtt 864
 Glu Leu Thr Phe Thr Ser Gly Ala Ala Ser Gly Lys Lys Met Val Val
 255 260 265
 caa gtt acc aac acc ggt ggc gat tta ggc tct aac cac ttt gat ttg 912
 Gln Val Thr Asn Thr Gly Gly Asp Leu Gly Ser Asn His Phe Asp Leu
 270 275 280
 caa atg ccc ggt ggt ggc gtt ggt atc ttc aat ggc tgt gct gct caa 960
 Gln Met Pro Gly Gly Gly Val Gly Ile Phe Asn Gly Cys Ala Ala Gln
 285 290 295

ES 2 542 135 T3

```

tgg ggc gct ccc aat gat ggc tgg gga gct aga tat ggt ggt gtc agc 1008
Trp Gly Ala Pro Asn Asp Gly Trp Gly Ala Arg Tyr Gly Gly Val Ser
    300                305                310
tct gtc tct gac tgt gcc tct ctt ccc tct gct ctt caa gct ggt tgt 1056
Ser Val Ser Asp Cys Ala Ser Leu Pro Ser Ala Leu Gln Ala Gly Cys
315                320                325                330
aaa tgg aga ttc aac tgg ttc aag aac tct gat aac cct acc atg acc 1104
Lys Trp Arg Phe Asn Trp Phe Lys Asn Ser Asp Asn Pro Thr Met Thr
                335                340                345
ttc aag gaa gtt acc tgt cct gct gaa tta act act cgc tca ggt tgc 1152
Phe Lys Glu Val Thr Cys Pro Ala Glu Leu Thr Thr Arg Ser Gly Cys
                350                355                360
gaa aga aag taa 1164
Glu Arg Lys
    365

```

5 <210> 11
 <211> 346
 <212> PRT
 <213> Phycomyces nitens CP99002

10 <220>
 <221> sig#péptido
 <222> (-19)... (-1)

15 <220>
 <221> mat#péptido
 <222> (1)... (327)

<400> 11

ES 2 542 135 T3

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

Ala Phe Cys Cys Gly Cys Tyr Glu Leu Thr Phe Thr Asn Thr Ala Val
 210 215 220
 Ala Gly Lys Lys Phe Val Val Gln Val Thr Asn Thr Gly Asp Asp Leu
 225 230 235
 Ser Thr Asn His Phe Asp Leu Gln Met Pro Gly Gly Gly Val Gly Tyr
 240 245 250
 Phe Asn Gly Cys Gln Ser Gln Trp Asn Thr Asn Thr Asp Gly Trp Gly
 255 260 265
 Ala Arg Tyr Gly Gly Ile Ser Ser Ile Ser Glu Cys Asp Lys Leu Pro
 270 275 280 285
 Thr Gln Leu Gln Ala Gly Cys Lys Trp Arg Phe Gly Trp Phe Lys Asn
 290 295 300
 Ala Asp Asn Pro Glu Val Thr Phe Lys Ala Val Thr Cys Pro Ala Glu
 305 310 315
 Ile Ile Ala Lys Thr Gly Cys Glu Arg Lys
 320 325

5 <210> 12
 <211> 1041
 <212> ADN
 <213> Phycomyces nitens CP99002

10 <220>
 <221> sig#péptido
 <222> (1)... (57)

15 <220>
 <221> mat#péptido
 <222> (58)... (1041)
 <400> 12

ES 2 542 135 T3

atg aag ttc tcc atc atc gct tcc gcc ctt ctc ctc gct gcc agc tcc	48
Met Lys Phe Ser Ile Ile Ala Ser Ala Leu Leu Leu Ala Ala Ser Ser	
-15 -10 -5	
act tac gct gct gaa tgc agc caa ggc tat ggc cag tgt ggt ggc aag	96
Thr Tyr Ala Ala Glu Cys Ser Gln Gly Tyr Gly Gln Cys Gly Gly Lys	
1 5 10	
atg tgg act ggt ccc acc tgc tgc acc tcc gcc ttc acc tgt gta ggt	144
Met Trp Thr Gly Pro Thr Cys Cys Thr Ser Gly Phe Thr Cys Val Gly	
15 20 25	
gcc gaa aac aac gag tgg tac tct cag tgt atc ccc aac gat caa gtc	192
Ala Glu Asn Asn Glu Trp Tyr Ser Gln Cys Ile Pro Asn Asp Gln Val	
30 35 40 45	
cag ggt aac ccc aag acc acc acc acc acc acc acc aag gct gcc act	240
Gln Gly Asn Pro Lys Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Lys Ala Ala Thr	
50 55 60	
acc acc aag gct cct gtc acc acc acc aag gcc acc acc acc acc acc	288
Thr Thr Lys Ala Pro Val Thr Thr Thr Lys Ala Thr Thr Thr Thr Thr	
65 70 75	
acc aag gcc cct gtc acc acc acc aag gcc act act act acc acc acc	336
Thr Lys Ala Pro Val Thr Thr Thr Lys Ala Thr Thr Thr Thr Thr Thr	
80 85 90	
aag acc acc acc aag acc acc acc acc aag gct gcc acc acc acc tcc	384
Lys Thr Thr Thr Lys Thr Thr Thr Thr Lys Ala Ala Thr Thr Thr Ser	
95 100 105	
tct tcc aac act ggc tac agc ccc att tct ggt ggc ttc tct gga aac	432
Ser Ser Asn Thr Gly Tyr Ser Pro Ile Ser Gly Gly Phe Ser Gly Asn	
110 115 120 125	

ES 2 542 135 T3

ggt cgc act acc cgc tac tgg gat tgc tgc aag ccc tct tgc gcc tgg 480
 Gly Arg Thr Thr Arg Tyr Trp Asp Cys Cys Lys Pro Ser Cys Ala Trp
 130 135 140
 gac gga aag gct tct gta act aag cct gta ctc acc tgt gcc aag gat 528
 Asp Gly Lys Ala Ser Val Thr Lys Pro Val Leu Thr Cys Ala Lys Asp
 145 150 155
 ggt gtc agc cgt ctc ggt tcc gat gtc cag agc ggt tgc gtc gcc gcc 576
 Gly Val Ser Arg Leu Gly Ser Asp Val Gln Ser Gly Cys Val Gly Gly
 160 165 170
 cag gcc tac atg tgc aat gac aac cag ccc tgg gtt gtc aat gac gac 624
 Gln Ala Tyr Met Cys Asn Asp Asn Gln Pro Trp Val Val Asn Asp Asp
 175 180 185
 ctt gcc tac ggt ttc gct gct gcc agt ctc ggt agc gcc ggt gcc tct 672
 Leu Ala Tyr Gly Phe Ala Ala Ala Ser Leu Gly Ser Ala Gly Ala Ser
 190 195 200 205
 gca ttc tgc tgc gcc tgt tac gag ctt acc ttc acc aac act gct gtc 720
 Ala Phe Cys Cys Gly Cys Tyr Glu Leu Thr Phe Thr Asn Thr Ala Val
 210 215 220
 gct gcc aag aag ttt gtc gtc cag gtc acc aac acc ggt gat gat ctc 768
 Ala Gly Lys Lys Phe Val Val Gln Val Thr Asn Thr Gly Asp Asp Leu
 225 230 235
 agc acc aac cac ttt gat ttg cag atg ccc gcc ggt ggt gtc gcc tac 816
 Ser Thr Asn His Phe Asp Leu Gln Met Pro Gly Gly Gly Val Gly Tyr
 240 245 250
 ttc aac gcc tgc cag tcc cag tgg aac acc aac acc gat gcc tgg ggt 864
 Phe Asn Gly Cys Gln Ser Gln Trp Asn Thr Asn Thr Asp Gly Trp Gly
 255 260 265
 gct cgc tat gcc ggt att agc tct att tca gag tgc gac aag ctt cct 912
 Ala Arg Tyr Gly Gly Ile Ser Ser Ile Ser Glu Cys Asp Lys Leu Pro

ES 2 542 135 T3

```

270          275          280          285
acc cag ttg cag gct ggt tgc aag tgg aga ttc gga tgg ttc aag aac 960
Thr Gln Leu Gln Ala Gly Cys Lys Trp Arg Phe Gly Trp Phe Lys Asn
          290          295          300
gct gac aac cca gag gtc acc ttc aag gct gtt act tgc cct gcc gag 1008
Ala Asp Asn Pro Glu Val Thr Phe Lys Ala Val Thr Cys Pro Ala Glu
          305          310          315
atc att gcc aag act ggt tgc gag cgc aag taa 1041
Ile Ile Ala Lys Thr Gly Cys Glu Arg Lys
          320          325

```

5 <210> 13
 <211> 1043
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Secuencia de codón optimizado correspondiente a la proteína RCE I (SEQ ID NO: 2)
 <220>
 <221> sig#péptido
 <222> (16)... (84)

15 <220>
 <221> mat#péptido
 <222> (84)... (1043)

<400> 13

ES 2 542 135 T3

```

ggatcctggg acaag atg aag ttc atc act atc gcc tcc tcc gcc ctc ctt 51
      Met Lys Phe Ile Thr Ile Ala Ser Ser Ala Leu Leu
                -20                -15

gcc ctc gcc ctt ggc act gag atg gcc tcc gcc gct gag tgc tcc aag 99
Ala Leu Ala Leu Gly Thr Glu Met Ala Ser Ala Ala Glu Cys Ser Lys
      -10                -5                1                5

ctc tac gga cag tgc ggc gga aag aac tgg aac ggc ccc acc tgc tgc 147
Leu Tyr Gly Gln Cys Gly Gly Lys Asn Trp Asn Gly Pro Thr Cys Cys
                10                15                20

gag agc ggc tcg acc tgc aag gtc tcg aat gac tac tac agc cag tgc 195
Glu Ser Gly Ser Thr Cys Lys Val Ser Asn Asp Tyr Tyr Ser Gln Cys
                25                30                35

ctg ccg agc ggc tcc tcg gga aac aag tcg agc gag tcg gcc cac aag 243
Leu Pro Ser Gly Ser Ser Gly Asn Lys Ser Ser Glu Ser Ala His Lys
                40                45                50

aag acc acg acc gct gcc cac aag aag acc acg acc gcc gct cac aag 291
Lys Thr Thr Thr Ala Ala His Lys Lys Thr Thr Thr Ala Ala His Lys
      55                60                65

aag act acg acc gct ccc gcc aag aag acc acg acc gtc gcc aag gct 339
Lys Thr Thr Thr Ala Pro Ala Lys Lys Thr Thr Thr Val Ala Lys Ala
      70                75                80                85

tcg act ccg tcc aac tcg agc agc tcg tct tcg gga aag tac agc gct 387
Ser Thr Pro Ser Asn Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Lys Tyr Ser Ala
                90                95                100

gtc agc ggt ggc gct agc ggc aac ggc gtc act acc cgc tac tgg gac 435
Val Ser Gly Gly Ala Ser Gly Asn Gly Val Thr Thr Arg Tyr Trp Asp
                105                110                115

tgc tgc aag gct tcg tgc tcg tgg ccc gcc aag gct aac gtc agc tcg 483
Cys Cys Lys Ala Ser Cys Ser Trp Pro Gly Lys Ala Asn Val Ser Ser

```

ES 2 542 135 T3

120	125	130	
cct gtc aag tcc tgc aac aag gac ggc gtc acc gct ctt agc gac tcc			531
Pro Val Lys Ser Cys Asn Lys Asp Gly Val Thr Ala Leu Ser Asp Ser			
135	140	145	
aac gcc cag tcc ggc tgc aac ggc ggc aac tcc tac atg tgc aac gac			579
Asn Ala Gln Ser Gly Cys Asn Gly Gly Asn Ser Tyr Met Cys Asn Asp			
150	155	160	165
aac cag cca tgg gct gtc aac gac aac ctt gct tac ggt ttc gct gcc			627
Asn Gln Pro Trp Ala Val Asn Asp Asn Leu Ala Tyr Gly Phe Ala Ala			
	170	175	180
gct gcc att agc ggc ggt ggc gag agc cgc tgg tgc tgc tcc tgc ttc			675
Ala Ala Ile Ser Gly Gly Gly Glu Ser Arg Trp Cys Cys Ser Cys Phe			
	185	190	195
gag ctc acc ttc acc tcc acc agc gtt gct ggc aag aag atg gtc gtc			723
Glu Leu Thr Phe Thr Ser Thr Ser Val Ala Gly Lys Lys Met Val Val			
	200	205	210
cag gtc acc aac act ggc ggt gac ctt ggc agc tcg acc ggt gcc cac			771
Gln Val Thr Asn Thr Gly Gly Asp Leu Gly Ser Ser Thr Gly Ala His			
	215	220	225
ttc gat ctc cag atg ccc ggc ggc ggc gtc ggc atc ttc aac gga tgc			819
Phe Asp Leu Gln Met Pro Gly Gly Gly Val Gly Ile Phe Asn Gly Cys			
230	235	240	245
tcg tcc cag tgg ggc gct ccc aac gac ggc tgg ggc tcg cgc tac ggc			867
Ser Ser Gln Trp Gly Ala Pro Asn Asp Gly Trp Gly Ser Arg Tyr Gly			
	250	255	260
ggc atc agc tcc gcc agc gac tgc tcg tcc ctc ccc agc gcc ctc cag			915
Gly Ile Ser Ser Ala Ser Asp Cys Ser Ser Leu Pro Ser Ala Leu Gln			
	265	270	275
gcc ggc tgc aag tgg cgc ttc aac tgg ttc aag aac gcc gac aac ccg			963

Ala Gly Cys Lys Trp Arg Phe Asn Trp Phe Lys Asn Ala Asp Asn Pro
 280 285 290
 tcc atg acc tac aag gag gtc acc tgc ccc aag gag atc acc gct aag 1011
 Ser Met Thr Tyr Lys Glu Val Thr Cys Pro Lys Glu Ile Thr Ala Lys
 295 300 305
 acc gga tgc tcg cgc aag taa acgcagg atcc 1043
 Thr Gly Cys Ser Arg Lys
 310 315

5 <210> 14
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Rhizopus oryzae CP96001
 <400> 14

Ala Glu Cys Ser Lys Leu Tyr Gly Gln Cys Gly Gly Lys Asn Trp Asn
 1 5 10 15
 Gly Pro Thr Cys Cys Glu Ser Gly Ser Thr Cys Lys Val Ser Asn Asp
 20 25 30
 Tyr Tyr Ser Gln Cys Leu Pro Ser
 10 35 40

15 <210> 15
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Mucor circinelloides CP99001
 <400> 15

20 Ala Ser Cys Ser Ser Val Tyr Gly Gln Cys Gly Gly Ile Gly Trp Ser
 1 5 10 15
 Gly Pro Thr Cys Cys Glu
 20

25 <210> 16
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Phycomyces nitens CP99002
 30 <400> 16

Ala Glu Cys Ser Gln Gly Tyr Gly Gln Cys Gly Gly Lys Met Trp Thr
 1 5 10 15
 Gly Pro Thr Cys Cys Thr Ser
 20

5 <210> 17
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de consenso encontrada en dominios de enlace a celulosa de las endoglucanasas de la familia 45

15 <220>
 <221> Xaa
 <222> (1).. (6), (11).. (14), (16).. (18), (20).. (25), (27).. (31), (33).. (34), (36). (39)
 <223> Xaa es uno de todos los aminoácidos

20 <300>
 <301> Hoffren, A. -M. y colaboradores
 <303> Protein Engineering
 <304> 8
 <306> 443-450
 <307> 1995

25 <400> 17
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gln Cys Gly Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Xaa
 1 5 10 15
 Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asn
 20 25 30
 Xaa Xaa Tyr Xaa Gln Cys Xaa
 35

30 <210> 18
 <211> 1257
 <212> ADN
 <213> Humicola insolens

35 <220>
 <221> intrón
 <222> (453).. (509)

<400> 18
 aatgacgggg caacctcccg cccgggccc actcittgggt ttggittgac aggccgtctg 60
 tctcttgcgt cctcttacta cgctgcctg gaccctacgt ctcaactccg attcaagatg 120
 cgttcctccc ctctcctccg ctccgccgtt gtggccgccc tgccggtgtt ggccttggc 180

40

ES 2 542 135 T3

gctgatggca agtccacccg ctacigggac tgcctgaage cttcgtgcgg ctgggccaag 240
 aaggctcccg tgaaccagcc tgccttctcc tgcaacgcca acttccagcg tctcactgac 300
 ttcgacgcca agtccggctg cgagccgggc ggtgtgcct actcgtgcgc cgaccagacc 360
 ccatgggctg tgaacgacga cttcgcgttc ggttttgcig ccacctctat tgcggcagc 420
 aatgaggcgg gctggtgctg cgctgctac gagtaagctt tggtcgcgtg tgaacactg 480
 tgcaggcata gcaactaacca cctcccaggc tcaccttcac atccggctct gttgctggca 540
 agaagatggt cgtccagtc accagcactg gcggtagctt tggcagcaac cacttcgac 600
 tcaacatccc cggcggcggc gtcggcatct tcgacggatg cactccccag ttcggcggtc 660
 tgccccgcca gcgtacggc ggcattctgt cccgcaacga gtgcgatcgg tccccgacg 720
 ccctcaagcc cggctgctac tggcgcttcg actggttcaa gaaccccgac aaccggagct 780
 tcagcttccg tcaggctcaa tgcacagccg agctcgtcgc tcgcaccgga tgcggccga 840
 acgacgacgg caacttcct gccgtccaga tcccctccag cagcaccagc tctccggtcg 900
 gccagctac cagtaccagc accacctcca cctccaccac ctgcagccc cccgtccagc 960
 ctacgactcc cagcggctgc actgctgaga ggtgggctca gtgcggcggc aatggctgga 1020
 gcggctgcac cacctgcgtc gctggcagca cctgcacgaa gattaatgac tggtaaccatc 1080
 agtgctgta aacgcagggc agcctgagaa ccttactggt tgcgcaacga aatgacactc 1140
 ccaatcactg tattagttct tgtacataat ttcgtcatcc ctccaggat tgtcacatat 1200
 atgcaatgat gaatactgaa cacaacctg gccgcttga cttggccgaag gaatgcc 1257

5 <210> 19
 <211> 1720
 <212> ADN
 <213> Trichoderma viride

10 <220>
 <221> intrón
 <222> (500).. (682)
 <400> 19

ggtgtgcat ttctctcaa catactgctt tcaacaact ttcgctcct cctggcctg 60
 atatcccaat atcagttttt cccaaagtag caagtcata gtaaactctg tcatctatca 120
 ttaatcagtg cccatagtgt ctgtctgttg attgctccc gccatacacg atgaacagga 180
 ccatggctcc attgctgctt gcagcgtcga tactcttcgg gggcgctgct gcacaacaga 240
 ctgtctgggg acagtgtgga ggtattggtt ggagcggacc tacgagttgt gtccttggat 300
 cagcttgttc tactctcaat ccttattaig cgcaatgcat tccgggggcc actagtatca 360
 ccacctgac cggaccccc tcgggtccaa ccaccaccac cagagccacc tcaacgacct 420
 catctccgcc accgaccagc tctggagttc gatttgctgg cgtaaacatc gcgggctttg 480
 acttcggatg taccacagag tatgtcttca tgttgcatag tgttgctggc tgagtattct 540
 gggcggatga tttatagctg tgcgggctgc aaaacaccgc cggctctgcca ctatcaaggc 600
 atagttgata ggcgggcgtg tttcttcaa tcccctgatt acactctcaa gaactctagt 660
 gctgatggat gtatgattac agtggcaact gcgttacatc gaaggtttat cctccgttga 720
 agaactcac tggggcaaac aactaccgg acggtatcgg ccagatgcag cacttcgtca 780
 acgatgatgg gatgactatt tccgcctac cgtcggatg gcagtacc c gtaacaaca 840
 atctgggtgg aactctcgat tccaccagta tctcgaagta tgatcagctc gttcaggggt 900
 gcctgtctct cgggtgtatac tgcatactg acatccacaa ttaigtctga tggaacgggtg 960
 gaatcattgg ccagggaggc cctacaaatg cccagtttac cagtccttgg tgcagttgg 1020
 catcgaagta cgcgtctcag tgcaggggtg ggttcggaat aatgaatgag ccccacgacg 1080
 tgaacatcaa cacttgggct gccacggtc aagaggctgt cactgcaatc cgcaacgccg 1140
 gtgtacgctc gcaatacatt tctctgctg gaaatgatta tcaatctgcg gcagctttta 1200
 tttccgatgg cagtgcagcc gccctgtctc aggtaacgaa ccctgaigga tcaacaacga 1260
 atctaacttt cgatgtccac aagtacttag actcggacaa ctccggtact cacgccgaat 1320
 gcactacaaa caacatcgac ggcgccttg ctcctctcgc cacttggctt cgacagaaca 1380
 accgccaggc tattctgacg gaaaccggcg gtggcaatgt tcagtctcgc atccaagatt 1440
 tgtccaaca gatccaglac ctcaaccaga actcagatgt ctatcttggc tatgctggct 1500
 ggggtgccgg ttcaattgat agcacttata ttctgacgga aacgcctact ggaagcggta 1560
 actcgtggac ggacacatcc ctagttagct cgtgtctcgc caggaagtaa caccgaggct 1620
 gattgcagga gccttgcaa tagcgatttc atcttgctgt acataattct tactctctga 1680
 agccgcttgt tctgggtatg tgtcttgaca ggtttctaga 1720

<210> 20
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador

5 <400> 20
 caccacgcgc tactgggact 20

10 <210> 21
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador

20 <400> 21
 ggatcctgcg ttacttgc 19

25 <210> 22
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador

35 <400> 22
 ggatcctggg acaagatg 18

40 <210> 23
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Proteína recombinante

<400> 24

50 Met Gln Leu Pro Leu Thr Thr Leu Leu Thr Leu Leu Pro Ala Leu Ala

1 5 10 15

ES 2 542 135 T3

Ala Ala Gln Ser Gly Ser Gly Arg Thr Thr Arg Tyr Trp Asp Cys Cys
 20 25 30

Lys Pro Ser Cys Ser Trp Pro Gly Lys Ala Asn Val Ser Ser Pro Val
 35 40 45

Lys Ser Cys Asn Lys Asp Gly Val Thr Ala Leu Ser Asp Ser Asn Ala
 50 55 60

Gln Ser Gly Cys Asn Gly Gly Asn Ser Tyr Met Cys Asn Asp Asn Gln
 65 70 75 80

Pro Trp Ala Val Asn Asp Asn Leu Ala Tyr Gly Phe Ala Ala Ala Ala
 85 90 95

Ile Ser Gly Gly Gly Glu Ser Arg Trp Cys Cys Ser Cys Phe Glu Leu
 100 105 110

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

Thr Asn Thr Gly Gly Asp Leu Gly Ser Ser Thr Gly Ala His Phe Asp
 130 135 140

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

Gln Trp Gly Ala Pro Asn Asp Gly Trp Gly Ser Arg Tyr Gly Gly Ile

ES 2 542 135 T3

165

170

175

Ser Ser Ala Ser Asp Cys Ser Ser Leu Pro Ser Ala Leu Gln Ala Gly
180 185 190

Cys Lys Trp Arg Phe Asn Trp Phe Lys Asn Ala Asp Asn Pro Ser Met
195 200 205

Thr Tyr Lys Glu Val Thr Cys Pro Lys Glu Ile Thr Ala Lys Thr Gly
210 215 220

Cys Ser Arg Lys
225

5

<210> 25
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

10

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador

<400> 25
gcggatcctg ggacaagatg 20

15

<210> 26
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

20

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador

<400> 26
gcctgcagag cggcggaggc catc 24

25

<210> 27
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

30

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador

<400> 27
gcctgcaggg aaagtacagc gctgt 25

35

<210> 28
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador
 <400> 28
 10 gcggatcctg cgtttacttg c 21
 <210> 29
 <211> 245
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Proteína recombinante
 20 <400> 29

 Met Lys Phe Ile Thr Ile Ala Ser Ser Ala Leu Leu Ala Leu Ala Leu
 1 5 10 15

 Gly Thr Glu Met Ala Ser Ala Ala Leu Gln Gly Lys Tyr Ser Ala Val
 20 25 30

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

 Cys Lys Pro Ser Cys Ser Trp Pro Gly Lys Ala Asn Val Ser Ser Pro
 50 55 60

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

 Ala Gln Ser Gly Cys Asn Gly Gly Asn Ser Tyr Met Cys Asn Asp Asn
 85 90 95

Gln Pro Trp Ala Val Asn Asp Asn Leu Ala Tyr Gly Phe Ala Ala Ala
 100 105 110

Ala Ile Ser Gly Gly Gly Glu Ser Arg Trp Cys Cys Ser Cys Phe Glu
 115 120 125

Leu Thr Phe Thr Ser Thr Ser Val Ala Gly Lys Lys Met Val Val Gln
 130 135 140

Val Thr Asn Thr Gly Gly Asp Leu Gly Ser Ser Thr Gly Ala His Phe
 145 150 155 160

Asp Leu Gln Met Pro Gly Gly Gly Val Gly Ile Phe Asn Gly Cys Ser
 165 170 175

Ser Gln Trp Gly Ala Pro Asn Asp Gly Trp Gly Ser Arg Tyr Gly Gly
 180 185 190

Ile Ser Ser Ala Ser Asp Cys Ser Ser Leu Pro Ser Ala Leu Gln Ala
 195 200 205

Gly Cys Lys Trp Arg Phe Asn Trp Phe Lys Asn Ala Asp Asn Pro Ser
 210 215 220

Met Thr Tyr Lys Glu Val Thr Cys Pro Lys Glu Ile Thr Ala Lys Thr
 225 230 235 240

Gly Cys Ser Arg Lys
 245

ES 2 542 135 T3

5 <210> 30
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Secuencia del terminal N de la proteína recombinante

10 <400> 30
Gln Ser Gly Ser Gly Arg Thr
1 5

15 <210> 31
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Secuencia del terminal N de la proteína recombinante

20 <400> 31
Lys Tyr Ser Ala Val Ser Gly
1 5

25 <210> 32
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Secuencia del terminal N de la proteína recombinante

30 <400> 32
Ala Val Ser Gly Gly Ala Ser
1 5

35 <210> 33
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Secuencia del terminal N de la proteína recombinante

40 <400> 33
Ser Ala Val Ser Gly Gly Ala
1 5

45 <210> 34
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

ES 2 542 135 T3

Met Gln Leu Pro Leu Thr Thr Leu Leu Thr Leu Leu Pro Ala Leu Ala
1 5 10 15

Ala Ala Gln Ser Gly Ser Gly Arg Thr Thr Arg Tyr Trp Asp Cys Cys
20 25 30

Lys Pro Ser Cys Ala Trp Pro Gly Lys Gly Pro Ala Pro Val Arg Thr
35 40 45

Cys Asp Arg Trp Asp Asn Pro Leu Phe Asp Gly Gly Asn Thr Arg Ser
50 55 60

Gly Cys Asp Ala Gly Gly Gly Ala Tyr Met Cys Ser Asp Gln Ser Pro
65 70 75 80

Trp Ala Val Ser Asp Asp Leu Ala Tyr Gly Trp Ala Ala Val Asn Ile
85 90 95

Ala Gly Ser Asn Glu Arg Gln Trp Cys Cys Ala Cys Tyr Glu Leu Thr
100 105 110

ES 2 542 135 T3

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

Asn Thr Gly Gly Asp Leu Gly Asn Asn His Phe Asp Ile Ala Met Pro
130 135 140

Gly Gly Gly Val Gly Ile Phe Asn Ala Cys Thr Asp Gln Tyr Gly Ala
145 150 155 160

Pro Pro Asn Gly Trp Gly Gln Arg Tyr Gly Gly Ile Ser Gln Arg His
165 170 175

Glu Cys Asp Ala Phe Pro Glu Lys Leu Lys Pro Gly Cys Tyr Trp Arg
180 185 190

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

Val Ser Cys Pro Ala Glu Ile Val Ala Lys Ser Gly Cys Ser Arg
210 215 220

<210> 39
<211> 672
<212> ADN
<213> Humicola insolens
<400> 39

5

atgcagctcc cccigaccac gctcctcacc ctctccccg cctctcgggc ggcccagtcc 60
 ggcagcggcc gcaccacgcg ctactgggac tgcctgaagc cgtctgtcgc gtggcccggc 120
 aagggcccgg cgcccgtgcg gacgtgacgac cggctgggaca acccgctgtt cgacggcggc 180
 aacacgcgca gcgggtgcga cgcgggcggc ggcgcctaca tctgctcga ccagagcccg 240
 tgggcgggtca ggcagacct ggcgtacggc tgggcggccg tcaacattgc cggctccaac 300
 gagaggcagt ggtctgtcgc ctgctacgag ctgaccttca ccagcgggcc ggtggcgggc 360
 aagaggatga ttgtgcaggc gagcaacacg ggaggcgatt tggggaacaa ccactttgat 420
 attgctatgc ccggcgggtg cgtcggatc ttcaacgctt gcaccgacca gtacggcgcg 480
 ccccccaacg gctggggcca gcgctacggc ggcatcagcc aacgccacga gtgcgacgcc 540
 ttccccgaga agctcaagcc cggctgctac tggcgctttg actggttctt caacgccgac 600
 aacccgagcg tcaactggcg gcaggtcagc tgcccggccg agattgtggc caagagcggc 660
 tgctcgcggt aa 672

- 5 <210> 40
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

- 10 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador

- <400> 40
 ggggatcctg ggacaagatg cagctcccc tgaccacg 38

- 15 <210> 41
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

- 20 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador

- <400> 41
 ggggatcctg cattaacgc gagcagccgc tcttgcc 38

- 25 <210> 42
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

- 30 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador

- <400> 42
 gactgctgca agccgtcgtg c 21

- 35 <210> 43
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

- 40

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador

<400> 43

5 gttgcacatg taggagttgc 20

Reivindicaciones

- 5 1. Una proteína que es una endoglucanasa que carece del dominio de enlace a celulosa de la secuencia de aminoácidos de una endoglucanasa de Zygomycetes y que exhibe actividad endoglucanasa, en donde la proteína tiene al menos dos veces mayor actividad de eliminación de la pelusa de tejidos que contienen celulosa de la proteína original que tiene el dominio de enlace a celulosa y en donde es una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en las SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 7, 9, o 11, en donde el dominio de enlace a celulosa ha sido suprimido de la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 7, 9, o 11, y que exhibe actividad endoglucanasa, o es una proteína modificada de la misma que exhibe actividad endoglucanasa y que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90% de identidad con dicha secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 7, 9, o 11, en donde el dominio de enlace a celulosa ha sido suprimido de la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 7, 9, o 11.
- 10 2. La proteína de acuerdo con la reivindicación 1, que es una endoglucanasa perteneciente a la familia 45 que carece del dominio de enlace a celulosa de la secuencia de aminoácidos de una endoglucanasa de *Zygomycetes* y que exhibe actividad endoglucanasa.
- 15 3. La proteína de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde los *Zygomycetes* son microorganismos seleccionados de entre el grupo que consiste de aquellos pertenecientes a *Rhizopus*, *Mucor* y *Phycomyces*.
- 20 4. La proteína de acuerdo con la reivindicación 3, en donde los *Zygomycetes* son microorganismos pertenecientes a *Rhizopus*.
- 25 5. Un gen que codifica la proteína o proteína modificada de la misma de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
6. Un vector de expresión que comprende el gen de acuerdo con la reivindicación 5.
7. Una célula huésped transformada con el vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 6.
- 30 8. La célula huésped de acuerdo con la reivindicación 7, que es un hongo filamentoso.
9. La célula huésped de acuerdo con la reivindicación 8, que es un microorganismo perteneciente a *Humicola*.
- 35 10. Un método para producir una proteína que comprende las etapas de cultivar la célula huésped de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9 y recolectar, a partir de la célula huésped obtenida por la etapa de cultivar o su producto de cultivo, la proteína o proteína modificada de la misma de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
- 40 11. Una proteína producida por el método de acuerdo con la reivindicación 10.
12. Una preparación de celulasas que comprende la proteína o una proteína modificada de la misma de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y 11.
- 45 13. Un método para el tratamiento de tejidos que contienen celulosa que comprende una etapa de poner en contacto tejidos que contienen celulosa con la proteína o una proteína modificada de la misma de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y 11 o la preparación de celulasas de acuerdo con la reivindicación 12.
- 50 14. Un método para reducir la velocidad a la que los tejidos que contienen celulosa forman pelusa o la reducción de la formación de pelusa en tejidos que contienen celulosa que comprende una etapa de poner en contacto tejidos que contienen celulosa con la proteína o una proteína modificada de la misma de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y 11 o la preparación de celulasas de acuerdo con la reivindicación 12.
- 55 15. Un método de tratamiento de la pérdida de peso de tejidos que contienen celulosa para mejorar la sensación táctil y la apariencia de los mismos que comprende una etapa de poner en contacto tejidos que contienen celulosa con la proteína o una proteína modificada de la misma de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y 11 o la preparación de celulasas de acuerdo con la reivindicación 12.
- 60 16. Un método de aclaramiento del color de tejidos coloreados que contienen celulosa que comprende una etapa de tratar los tejidos coloreados que contienen celulosa con la proteína o una proteína modificada de la misma de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y 11 o la preparación de celulasas de acuerdo con la reivindicación 12.

- 5 17. Un método para proporcionar tejidos coloreados que contienen celulosa con un cambio parcial de color que comprende una etapa de tratar tejidos coloreados que contienen celulosa con la proteína o una proteína modificada de la misma de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y 11 o la preparación de celulosa de acuerdo con la reivindicación 12.
- 10 18. Un método para reducir la velocidad a la cual los tejidos que contienen celulosa se vuelven rígidos o reducir la rigidez en tejidos que contienen celulosa que comprende una etapa de tratamiento de los tejidos que contienen celulosa con la proteína o una proteína modificada de la misma de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y 11 o la preparación de celulosa de acuerdo con la reivindicación 12.
- 15 19. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 18, en donde los tejidos son tratados a través del remojo, lavado, o enjuague de los mismos.
- 20 20. Un aditivo para detergente que comprende la proteína o una proteína modificada de la misma de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y 11 o la preparación de celulosa de acuerdo con la reivindicación 12 en una forma granulada no pulverulenta o una forma líquida estabilizada.
- 25 21. Una composición detergente que comprende la proteína o una proteína modificada de la misma de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y 11 o la preparación de celulosa de acuerdo con la reivindicación 12.
- 30 22. Un método de destintado de papel de desecho usando un agente de destintado en donde la proteína o una proteína modificada de la misma de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y 11 o la preparación de celulosa de acuerdo con la reivindicación 12 se utiliza en una etapa de destintado de papel de desecho.
23. Un método para mejorar el drenaje de la pasta de papel que comprende una etapa de tratamiento de la pulpa de papel con la proteína o una proteína modificada de la misma de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y 11 o la preparación de celulosa de acuerdo con la reivindicación 12.
24. Un método para mejorar la digestibilidad de los alimentos para animales que comprende una etapa de tratamiento de los alimentos para animales con la proteína o una proteína modificada de la misma de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y 11 o la preparación de celulosa de acuerdo con la reivindicación 12.