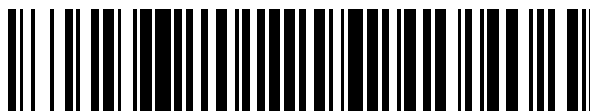


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 553 223**

51 Int. Cl.:

C12N 9/42 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

C12P 19/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.07.2010 E 10794231 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.09.2015 EP 2450438**

54 Título: **Preparación de celulasa que contiene endoglucanasas derivadas de dos tipos diferentes de microorganismos**

30 Prioridad:

03.07.2009 JP 2009159109

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

07.12.2015

73 Titular/es:

**MEIJI SEIKA PHARMA CO., LTD. (100.0%)
4-16, Kyobashi 2-chome
Chuo-ku, Tokyo 104-8002, JP**

72 Inventor/es:

**OKAKURA KAORU y
MURASHIMA KOICHIRO**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 553 223 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

Preparación de celulasa que contiene endoglucanasas derivadas de dos tipos diferentes de microorganismos

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a una preparación de celulasa que comprende endoglucanasas derivadas de dos tipos diferentes de microorganismos, a un método para producir la preparación de celulasa, y a los usos de la preparación de celulasa.

10

Antecedentes de la técnica

Convencionalmente, una fibra que contiene celulosa se ha tratado con celulasa para transmitir propiedades deseadas a la fibra. Por ejemplo, en la industria textil, el tratamiento con una celulasa se lleva a cabo para mejorar la sensación táctil y el aspecto de una fibra que contiene celulosa, o para proporcionar a una fibra que contiene celulosa coloreada un aspecto de "lavado a la piedra" que proporciona variaciones locales en el color (Bibliografía 1 de Patente).

15

Hasta el momento, en la búsqueda de celulasas utilizadas para tales usos, se han aislado componentes que presentan una elevada actividad para una fibra que contiene celulosa a partir de compuestos de celulasa producidos por hongos productores de celulasa. Como resultado, las endoglucanasas clasificadas en la familia 5 de GH, familia 12 de GH, y la familia 45 de GH se ha aislado en forma de celulasas que presentan una actividad elevada, principalmente para una fibra que contiene celulosa. Por ejemplo, se conoce la SCE3 derivada de *Trichoderma viride* como una endoglucanasa clasificada en la familia 5 de GH (Bibliografía 2 de Patente); se conoce la PPCE derivada de *Penicillium pinophilum* como una endoglucanasa clasificada en la familia 12 de GH (Bibliografía 3 de patente); se conoce la STCE derivada de *Staphylotrichum cocosporum* como una endoglucanasa clasificada en la familia 45 de GH (Bibliografía 4 de Patente); y así sucesivamente.

20

25

En un caso en que cualquiera de estas celulasas se produce comercialmente, por lo general se cultiva un transformante obtenido introduciendo genes que codifican la celulasa en un microorganismo tal como un hongo filamentoso, y se expresa una cantidad más grande de la celulasa como enzima recombinante. En este caso, la actividad de una preparación de celulasa preparada de esta manera para una fibra que contiene celulosa depende de la actividad de la celulasa recombinante expresada en una gran cantidad. De manera similar, la propiedad del pH de la preparación de celulasa depende también de las propiedades de la celulasa recombinante expresada en gran cantidad. Por ejemplo, en el caso de SCE3, el pH óptimo es débilmente ácido (Bibliografía 2 de Patente), aunque, en el caso de PPCE, el pH óptimo es ácido (Bibliografía 3 de Patente). De acuerdo con ello, las preparaciones de celulasa obtenidas expresando grandes de SCE3 y PPCE como enzimas recombinantes presentan las mismas propiedades de pH que las de SCE3 y PPCE, respectivamente.

30

35

40

De este modo, para mejorar la actividad y modificar las propiedades de una preparación de celulasa, se han hecho intentos de investigar principalmente una celulasa novedosa que presente las propiedades deseadas y para modificar las celulasas conocidas mediante una solución de ingeniería de proteínas. Sin embargo, para obtener una celulasa que presente una actividad significativamente superior a la de las celulasas conocidas, en primer lugar, ha de aislarse un microorganismo novedoso, lo cual no es demasiado fácil. Además, la posibilidad de que el microorganismo o similar produzca una celulasa que tenga las propiedades deseadas es baja. Además, incluso aunque se introduzca una mutación en una celulasa conocida mediante una solución de ingeniería de proteínas, es difícil modificar drásticamente las propiedades de la celulasa conocida. Debido a estos problemas, convencionalmente y en la actualidad, aún debe obtenerse una preparación de celulasa que tenga una elevada actividad y excelentes propiedades de pH.

45

50

Listado de citas

Bibliografía de patentes

55

- [PTL 1] Patente europea N° 307564
- [PTL 2] Publicación internacional N° WO98/54332
- [PTL 3] Publicación internacional N° WO2008/111613
- [PTL 4] Publicación internacional N° WO2005/054475

60

El documento WO 97/18286 A1 describe un proceso para la eliminación del apresto y el "lavado a la piedra" combinados de tejido vaquero seco, en el que el tejido vaquero se trata con una enzima amilolítica junto con un primer monocomponente de endoglucanasa abrasivo y un segundo monocomponente de endoglucanasa reductor de rayas.

65

La primera endoglucanasa es una celulasa fúngica de tipo EG V, o una celulasa fúngica de tipo EG III que se puede obtener a partir de una cepa del género *Trichoderma*.

El documento WO 02/00858 A2 describe una composición para degradar un oligosacárido que comprende una primera endoglucanasa que tiene una primera actividad degradadora, y una segunda endoglucanasa que tiene una segunda actividad degradadora, en el que la primera y la segunda actividades degradadoras establecidas están presentes en una relación tal que la degradación de los oligosacáridos producidos por la primera y segunda endonucleasa se realiza de forma sinérgica.

J. Bacteriol., Vol. 184, n.º 18, 2002, p. 5088-5095 describe un efecto sinérgico sobre la degradación de la celulosa cristalina entre las celulasas celulosomales procedentes de Clostridium los celulovorans.

10 Sumario de la invención

Problema técnico

La presente invención se ha realizado a la vista de dichas circunstancias. Un objetivo de la presente invención es proporcionar una preparación de celulasa que tiene una elevada actividad y una excelente propiedad del pH. Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un método para producir fácilmente dicha preparación de celulasa.

Solución al problema

Los presentes inventores han estudiado afanosamente para resolver los problemas anteriores. Como resultado, se ha encontrado que, produciendo una preparación de celulasa que comprende al menos determinadas proporciones de endoglucanasas derivadas de dos tipos diferentes de hongos filamentosos, se obtuvo una actividad sorprendentemente mayor para una fibra que contiene celulosa que las preparaciones de celulasa obtenidas cada una de ellas mediante la expresión una de las endoglucanasas individualmente. En particular, si una preparación de celulasa comprende como celulasas principales una combinación de SCE3 (clasificada en la familia 5 de GH) derivada de Trichoderma viride con PPCE (clasificada en la familia 12 de GH) derivada de Penicillium pinophilum, o una combinación de PPCE derivada de Penicillium pinophilum con STCE (clasificada en la familia 45 de GH) derivada de Staphylotrichum cocosporum, se aumenta significativamente la actividad de una fibra que contiene celulosa. Además, la propiedad del pH de la preparación de celulasa obtenida como se ha descrito anteriormente muestra un perfil más amplio que las preparaciones de celulasa obtenidas expresando una de las endoglucanasas individualmente. Se ha revelado que una combinación de los dos tipos de endoglucanasas hace que sea posible modificar las propiedades del pH de la preparación de celulasa. Además, los presentes inventores han descubierto que, en la producción de dicha preparación de celulasa, si los ADN que codificaban las endoglucanasas derivados de dos tipos diferentes de microorganismos se introducen y expresan en una única célula hospedadora, se aumenta la relación entre las endoglucanasas recombinantes y las proteínas secretadas, y se obtiene un sobrenadante del cultivo que tiene una actividad elevada, en comparación con un caso en el que se introducen y expresan en una única célula hospedadora cada una de las endoglucanasas.

Específicamente, la presente invención se refiere a una preparación de celulasa que comprende endoglucanasas derivadas de dos tipos diferentes de microorganismos, a un método para producir la preparación de celulasa, y a los usos de la preparación de celulasa. Más específicamente, la presente invención proporciona lo siguiente.

Una preparación de celulasa que comprende endoglucanasas derivadas de dos tipos diferentes de microorganismos, en la que la preparación es una combinación de uno cualquiera de los (a) y (b) siguientes:

- (a) una combinación de una endoglucanasa clasificada en la familia 5 de GH con una glucanasa clasificada en la familia 12 de GH, y
- (b) una combinación de una endoglucanasa clasificada en la familia 12 de GH con una endoglucanasa clasificada en la familia 45 de GH,

en el que la endoglucanasa clasificada en la familia 5 de GH es una proteína que tiene una cualquiera de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2 y la secuencia de aminoácidos en la que 10 o menos de los aminoácidos se han delecionado, sustituido, insertado o añadido, en el que la endoglucanasa clasificada en la familia 12 de GH es una proteína que tiene una cualquiera de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 4 y la secuencia de aminoácidos en la que 10 o menos de los aminoácidos se han delecionado, sustituido, insertado o añadido, en el que la endoglucanasa clasificada en la familia 45 de GH es una proteína que tiene una cualquiera de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 6 y la secuencia de aminoácidos en la que 10 o menos de los aminoácidos se han delecionado, sustituido, insertado o añadido.

La preparación de celulasa de acuerdo con la invención contiene endoglucanasas derivadas de los dos tipos diferentes de microorganismos y son ambas proteínas recombinantes.

La preparación de celulasa de acuerdo con la invención contiene dos tipos principales de las endoglucanasas, cada uno de ellos incluido en una cantidad de al menos 10 % en peso de las celulasas totales. La preparación de celulasa de acuerdo con la invención contiene dos tipos principales de las endoglucanasas, cada uno de ellos incluido en una cantidad de al menos 20 % en peso de las celulasas totales. La invención se refiere también a un método para

producir la preparación de celulasa de acuerdo con la invención, comprendiendo el método la etapa de cultivar un transformante obtenido introduciendo los ADN que codifican dos tipos de las endoglucanasas en una única célula hospedadora. En el método de acuerdo con la invención, la célula hospedadora puede ser un hongo filamentoso. La invención abarca también un método para producir una fibra que contiene celulosa mejorada, comprendiendo el método la etapa de poner en contacto una fibra que contiene celulosa con la preparación de celulasa de acuerdo con la invención, y un método para producir un azúcar a partir de biomasa, comprendiendo el método la etapa de poner en contacto la biomasa que contiene celulosa con la preparación de celulasa de acuerdo con la invención.

La presente invención proporciona una preparación de celulasa que presenta una elevada actividad y una actividad en un amplio intervalo de pH. Además, la presente invención proporciona un método para producir fácilmente dicha preparación de celulasa. El uso de la preparación de celulasa obtenida de acuerdo con la presente invención permite, por ejemplo, una mejora eficaz de la sensación táctil y del aspecto de la fibra que contiene celulosa y la sacarificación de la biomasa.

Breve descripción de los dibujos

[Fig. 1] La Fig. 1 es una gráfica que muestra el resultado de analizar las propiedades del pH en las actividades de eliminación de pelusa de una cepa que expresa solamente SCE3, una cepa que expresa solamente PPCE, y una cepa que expresa simultáneamente SCE3 y PPCE.

[Fig. 2] La Fig. 2 es una gráfica que muestra el resultado de analizar las propiedades del pH en las actividades de eliminación de pelusa de una cepa que expresa solamente STCE, la cepa que expresa solamente PPCE, y una cepa que expresa simultáneamente SCTE y PPCE.

Descripción de las realizaciones

Preparación de celulasa

En la presente invención, una celulasa se refiere a una enzima que tiene actividad descomponedora de la celulosa, y una preparación de celulasa se refiere a una preparación que comprende componentes de celulasa tales como celobiohidrolasas, endoglucanasas, y p-glucosidasa.

La preparación de celulasa de la presente invención se caracteriza por comprender endoglucanasas derivadas de dos tipos diferentes de microorganismos. Los dos tipos diferentes de microorganismos a partir de los cuales se derivan las endoglucanasas son preferentemente dos tipos diferentes de hongos filamentosos. Los ejemplos de los hongos filamentosos incluyen aquellos que pertenecen al género *Trichoderma*, *Penicillium*, *Staphylotrichum*, *Humicola*, *Acremonium*, *Aspergillus*, *Rizopus*, *Mucor*, y *Phycomyces*. Sus ejemplos preferibles incluyen *Trichoderma viride*, *Penicillium pinophilum*, *Staphylotrichum cocosporum*, *Humicola insolens*, *Acremonium cellulolyticus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus aculeatus*, *Rizopus oryzae*, *Mucor circinelloides*, y *Phycomyces nitens*.

Preferentemente, los dos tipos principales de endoglucanasas comprendidas en la preparación de celulasa de la presente invención se derivan de diferentes microorganismos, y se seleccionan de endoglucanasas clasificadas en diferentes familias de GH. En el presente documento, la "endoglucanasa principal" se refiere a una endoglucanasa que tiene el peso más elevado de proteínas entre las endoglucanasas comprendidas en la preparación de celulasa. De esta manera, los "dos tipos principales de las endoglucanasas" se refieren a una endoglucanasa que tiene el peso más elevado de proteínas y una endoglucanasa que tiene el segundo peso más elevado de proteínas entre las endoglucanasas comprendidas en la preparación de celulasa. El peso de la proteína se puede calcular de la siguiente forma. Específicamente, se llevó a cabo SDS-PAGE en la preparación de celulasa, y la concentración (cantidad de proteínas) de cada banda de proteína en una imagen en migración se analizó mediante densitometría. Se debe señalar que determinadas endoglucanasas incluyen una que se descompones y una que no se descompone. De acuerdo con ello, en el análisis de una imagen en migración de SDS-PAGE, se puede observar un producto traducido del mismo gen de endoglucanasa como una banda irrelevante. En la presente invención, incluso si se detectan bandas irrelevantes en una imagen en migración de SDS-PAGE, en un caso donde los productos traducidos proceden del mismo gen de la endoglucanasa, estos se evalúan como la endoglucanasa del mismo tipo, y el peso de la proteína se calcula de acuerdo con ello.

Cada una de las endoglucanasas clasificadas en las diferentes familias de GH se selecciona deseablemente a partir de endoglucanasas clasificadas en cualquiera de la familia 5 de GH, familia 12 de GH, y familia 45 de GH. En el presente documento, "Familia GH" es una clasificación basada en la estructura primaria de una glicósido hidrolasa. Específicamente, las endoglucanasas se clasifican mediante un método descrito en la página Web de CAZY (http://www.cazy.org/fam/acc_GH.html).

Un ejemplo de endoglucanasa clasificada en la familia 5 de GH es SCE3 derivada de *Trichoderma viride*. A este respecto, una proteína usual de "SCE3" de origen natural se representada por una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2. En la presente invención, sin embargo, la proteína puede tener la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2 en la que 10 o menos aminoácidos se han delecionado, sustituido, insertado, o añadido, siempre que esté presente la actividad endoglucanasa.

Además, un ejemplo de la endoglucanasa clasificada en la familia 12 de GH es PPCE derivada de *Penicillium pinophilum*. A este respecto, una proteína usual de "PPCE" de origen natural se representada por una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 4. En la presente invención, sin embargo, la proteína puede tener la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 4 en la que 10 o menos aminoácidos se han deletado, sustituido, insertado, o añadido, siempre que esté presente la actividad endoglucanasa.

Además, un ejemplo de endoglucanasa clasificada en la familia 45 de GH es STCE derivada de *Staphylotrichum cocosporum*. A este respecto, una proteína usual de "STCE" de origen natural se representada por una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 6. En la presente invención, sin embargo, la proteína puede tener la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 6 en la que 10 o menos aminoácidos se han deletado, sustituido, insertado, o añadido, siempre que esté presente la actividad endoglucanasa.

Los "diez o menos aminoácidos" modificados en la endoglucanasa son preferentemente 5 aminoácidos o menos, o 3 aminoácidos o menos. En un caso donde un determinado aminoácido de la endoglucanasa está sustituido por otro aminoácido, la sustitución es preferentemente una sustitución entre aminoácidos que tienen propiedades similares (sustitución conservativa) de tal manera que se pueda mantener la actividad de la endoglucanasa.

En la presente invención, una combinación de los dos tipos principales de las endoglucanasas comprendidas en la preparación de celulasa es particularmente preferible una combinación de SC3 con PPCE o una combinación de PPCE con STCE.

Por ejemplo, la combinación de SCE3 con PPCE puede presentar una actividad sorprendentemente alta de eliminación de pelusa. La actividad relativa con respecto a las cantidades totales de celulasa es aproximadamente de 2,4 a 3,0 veces tan alta como en un caso donde la endonucleasa se expresa sola. Además de dicho efecto sinérgico significativo, la propiedad del pH de la preparación de celulasa obtenida con esta combinación presenta un perfil más amplio que en el caso donde cada endoglucanasa se expresa individualmente. En particular, incluso si el pH es mayor que 4, se puede obtener en un determinado intervalo de pH una actividad de eliminación de pelusa elevada a un nivel equivalente a un caso en el que el pH es óptimo. Por ejemplo, en un caso donde SCE3 se expresa individualmente, la actividad de eliminación de pelusa a pH 5 es aproximadamente un 75 % de la del pH óptimo. En un caso donde PPCE se expresa individualmente, la actividad de eliminación de pelusa a pH 5 es aproximadamente un 30 % de la del pH óptimo. En un caso donde se combinan los dos, se puede presentar una actividad equivalente a la actividad de eliminación de pelusa al pH óptimo incluso a pH 5. En el presente documento, la "actividad equivalente" significa una actividad de al menos 90 % o más, preferentemente 95 % o más, y lo más preferente 100 %. Tal como se ha descrito anteriormente, la combinación de SCE3 con PPCE se caracteriza también por presentar las propiedades ventajosas que no se pueden esperar de la propiedad del pH de cada endoglucanasa individual.

Adicionalmente, por ejemplo, la combinación de PPCE con STCE puede presentar una elevada actividad eliminadora de pelusa. La actividad relativa con respecto a las cantidades totales de celulasa es aproximadamente de 3,2 a 3,7 veces tan alta como en un caso donde la endonucleasa se expresa sola. Además de dicho efecto sinérgico significativo, la propiedad del pH de la preparación de celulasa obtenida con esta combinación presenta un perfil más amplio que en el caso donde cada endoglucanasa se expresa individualmente.

La preparación de celulasa de la presente invención que comprende los dos tipos principales de las endoglucanasas tiene una actividad relativamente alta y propiedades del pH modificadas en comparación con el caso en el que cada endoglucanasa se expresa individualmente.

Para aumentar la actividad de la preparación de celulasas en un sentido absoluto, la preparación de celulasas comprende los dos tipos principales de las endoglucanasas en una cantidad de al menos un 10 % en peso (de las celulasas totales), preferentemente de forma adicional al menos 20 % en peso. Para la combinación de SCE3 con PPCE, la preparación de celulasas puede comprender por ejemplo SCE3 en una cantidad de al menos 40 % en peso y PPCE en una cantidad de al menos 20 % en peso. Además, para la combinación de PPCE con STCE, la preparación de celulasas puede comprender por ejemplo PPCE en una cantidad de al menos 15 % en peso y STCE en una cantidad de al menos 25 % en peso.

En el presente documento, las "celulasas totales" se refieren al peso total de celobiohidrolasas, endoglucanasas, y p-glucosidasas comprendidas en la preparación de celulasas. Por ejemplo, en un caso donde una endoglucanasa se expresa como proteína recombinante en la cepa 2 de *Trichoderma viride* como hospedador, la cantidad de las celulasas totales es el peso total de CBH1 y CBH2 en forma de celobiohidrolasas, EG1, SCE3, y endoglucanasa (familia 74 de GH) como las endoglucanasas, y BGL como la p-glucosidasa derivada del hospedador además de la endoglucanasa recombinante.

ADN que codifican endoglucanasas y adquisición de los mismos

En la presente invención, un ADN que codifica una endoglucanasa se refiere a un ADN que codifica la secuencia de aminoácidos de la endoglucanasa anteriormente descrita.

En la presente invención, el ADN que codifica la endoglucanasa puede obtenerse artificialmente mediante síntesis química basándose en la secuencia de bases del gen de la endoglucanasa o en la secuencia de aminoácidos de la endoglucanasa. Además, el ADN que codifica la endoglucanasa de la presente invención puede amplificarse, utilizando un cebador sintetizado basándose en una secuencia de bases de un gen de endoglucanasa conocido o en una secuencia de aminoácidos de una endoglucanasa conocida, mediante PCR con un molde de ADN que contiene el gen, tal como ADN genómico, ADNc, y plásmido. Además, el ADN que codifica la endoglucanasa de la presente invención se puede obtener también utilizando un fragmento de gen de la endoglucanasa como sonda, sintetizada basándose en una secuencia de bases de un gen de endoglucanasa conocido o en una secuencia de aminoácidos de la endoglucanasa conocida, mediante cribado de una biblioteca de ADN genómico o una biblioteca de ADN que contiene el gen de la endoglucanasa para los clones positivos que contienen el gen de la endoglucanasa.

Además, para expresar el ADN que codifica la endoglucanasa que se va a introducir en una célula hospedadora como la endoglucanasa que tiene actividad, el ADN que codifica la endoglucanasa contiene preferentemente, por ejemplo, una secuencia de bases que regula la expresión de un marcador genético para seleccionar un transformante. Los ejemplos de la secuencia de bases que regula la expresión incluyen secuencias de bases que codifican un promotor, terminador, y un péptido de señalización; y similares. El promotor no está particularmente limitado, siempre que la actividad de transcripción esté presente en la célula hospedadora. El promotor se puede obtener en forma de una secuencia de bases que regula la expresión de un gen que codifica una proteína que es tanto homóloga como heteróloga para la célula hospedadora. Además, el péptido de señalización no está particularmente limitado, siempre que el péptido de señalización contribuya a la secreción de la proteína en la célula hospedadora. El péptido de señalización se puede obtener a partir de una secuencia de bases derivada del gen que codifica la proteína que es tanto homóloga como heteróloga para la célula hospedadora.

Célula hospedadora y transformación de la misma

Como célula hospedadora en la que se introduce el ADN que codifica la endoglucanasa en la presente invención, se puede utilizar *E. coli*, Actinomicetos, levaduras, hongos filamentosos, y similares. Se usan preferentemente hongos filamentosos excelentes en la productividad de proteínas. Además, como los hongos filamentosos utilizados como células hospedadoras, se pueden utilizar los que pertenecen al género *Humicola*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Fusarium*, *Acremonium*, y *Penicillium*. Además, sus ejemplos preferentes incluyen *Humicola insolens*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Trichoderma viride*, *Fusarium oxysporum*, *Acremonium cellulolyticus*, y *Penicillium pinophilum*.

En la presente invención, el ADN que codifica la endoglucanasa se puede introducir en la célula hospedadora mediante un método en el que el ADN que codifica la endoglucanasa se introduce directamente, así como un método en el que la célula hospedadora se transforma con un vector de expresión que se puede replicar en la célula hospedadora y que contiene un gen que codifica las células en un estado expresable. El vector de expresión utilizado para la transformación de la célula hospedadora puede construirse basándose en un vector autorreplicante, es decir, por ejemplo, un plásmido que existe como elemento extracromosómico, y que se replica independientemente de la replicación del cromosoma. Como alternativa, el vector de expresión puede replicarse junto con el cromosoma del microorganismo hospedador, tras introducirse en el microorganismo hospedador e incorporarse en su genoma. Como procedimiento y método para construir el vector de acuerdo con la presente invención, se puede usar cualquier procedimiento comúnmente utilizado en el campo de la ingeniería genética.

En la presente invención, se puede llevar a cabo la transformación de la célula hospedadora con el ADN que codifica la endoglucanasa y el vector de expresión con cualquier método comúnmente usado en este campo. El método de introducir el ADN que codifica la endoglucanasa en la célula hospedadora se lleva a cabo introduciendo ADN que codifican dos tipos de las endoglucanasas o los vectores de expresión que contienen estas en la célula hospedadora simultáneamente. Como alternativa, los dos tipos de genes de las celulasas o los vectores de expresión que contienen estos se pueden introducir en la célula hospedadora por etapas; específicamente, uno de los ADN que codifican las endoglucanasas que se van a introducir o uno de los vectores de expresión que contienen estos se introduce en primer lugar en la célula hospedadora, y posteriormente, el otro de los ADN que codifican las endoglucanasas o el otro de los vectores de expresión se introduce en un transformante resultante. Además, se puede utilizar un marcador genético utilizado en la transformación adecuadamente de acuerdo con el método de selección del transformante. Por ejemplo, se puede utilizar un gen que codifica la resistencia a fármacos o un gen que complementa la auxotrofia.

Producción de la preparación de celulasas

La preparación de celulasas de la presente invención se puede producir de la siguiente forma. Específicamente, la célula hospedadora transformada anteriormente descrita se cultiva en un medio adecuado, y se obtienen celulasas recombinantes a partir del cultivo resultante. El cultivo y las condiciones para que la célula hospedadora exprese los dos tipos de las endoglucanasas recombinantes pueden ser sustancialmente iguales a los utilizados para la célula hospedadora.

Usos de la celulasa

En la presente invención, cuando se trata una fibra que contiene celulosa con la preparación de celulasas o un agente de celulasa que utiliza la misma, se puede producir una fibra que contiene celulosa que tiene una sensación táctil y un aspecto mejorados. Es también posible proporcionar una fibra coloreada que contiene celulosa con un aspecto de "lavado a la piedra" que proporcione variaciones locales en el color.

Además, de acuerdo con la presente invención, cuando biomasas tales como paja de arroz, bagazo, rastrojo de maíz, pulpa de un fruto tal como semilla de palma, y residuos de madera, se tratan con la preparación de celulasas recombinantes o el agente de celulasa que utiliza la misma, se puede producir un azúcar (sacarificación) a partir de estas biomasas. El azúcar obtenido de esta manera puede convertirse adicionalmente en etanol mediante fermentación con una levadura o similar.

Ejemplos

La presente invención se describirá más específicamente por medio de Ejemplos, pero la presente invención no se va a limitar a los siguientes Ejemplos sino que está comprendida en lo esencial de la presente invención. [Ejemplo 1] Preparación de *Trichoderma viride* que expresa simultáneamente la endoglucanasa SCE3 y la endoglucanasa PPCE

(1) Construcción del plásmido de expresión pCB1-sce3 de SCE3

Como vector de expresión para la endoglucanasa SCE3 derivada de *Trichoderma viride*, se usó pCB1-sce3 que se obtuvo mediante autoligadura de un fragmento de aproximadamente 7 kb obtenido mediante la digestión de pCB1-Eg3X descrita en la publicación internacional N° WO 98/11239 con XbaI.

(2) Construcción del plásmido de expresión pPPCE-M de PPCE

Como vector de expresión para la endoglucanasa PPCE derivada de *Penicillium pinophilum*, se usó el pPPCE-M descrito en el documento WO 2008/11613.

(3) Construcción del plásmido de expresión pPYR4-marcador de selección

Como plásmido marcador que contiene un gen pyr4 derivado de *Neurospora crassa*, se usó el pPYR4 descrito en la publicación internacional N° WO 2005/056787.

(4) Construcción del plásmido de expresión pDT-118-marcador de selección

Se construyó un plásmido pDT-118 insertando, en un sitio XbaI de pUC118 (fabricado por TAKARA SHUZO CO., LTD.), un gen de resistencia a la destomicina (Dtr) derivado de *Streptomyces rimofaciens* que tiene un promotor y un terminador de un gen trpC derivado de *Aspergillus nidulans* escindido de pMKD01 descrito en la publicación internacional N° WO 98/03667 con XbaI.

(5) Creación y cultivo de una cepa que expresa SCE3 individualmente

La transformación de *Trichoderma viride* con el plásmido pCB1-sce3 obtenido en el Ejemplo 1-(1) y el plásmido pPYR4 obtenido en el Ejemplo 1-(3) se llevó a cabo de acuerdo con el método descrito en el documento WO 2005/056787. Específicamente, esta transformación se llevó a cabo mediante un método de transformación simultánea utilizando la cepa 2 de *Trichoderma viride* deficiente en un gen para la biosíntesis de uracilo (pyr4) como hospedador y un gen pyr4 de *Neurospora crassa* como marcador de selección. En primer lugar, de acuerdo con el método descrito en el documento WO 2005/056787, se prepararon protoplastos de la cepa 2 de *Trichoderma viride*, y 100 µl de la suspensión de protoplastos obtenidos de esta manera se mezclaron con 7 µg de pCB1-sce3 y 3 µg de pPYR4. Una vez que la mezcla líquida se dejó reposar en hielo durante 5 minutos, se añadieron 400 µl de una solución de PEG (60 % de polietilenglicol 4000, cloruro de calcio 10 mM, y tampón Tris-HCl 10 mM, pH 7,5) a la mezcla, que se dejó reposar en hielo durante 20 minutos. La suspensión de protoplastos tratada de esta manera se lavó con un tampón SUTC (0,5 de sacarosa, cloruro de calcio 10 mM, y tampón Tris-HCl 10 mM, pH 7,5), y a continuación se cubrió con una capa de agar blando en un medio mínimo que contenía 0,5 M de sacarosa, seguido por cultivo a 28 °C durante 5 días. Después del cultivo, las colonias en crecimiento se transfirieron de nuevo a un medio mínimo, y las colonias en crecimiento en este medio se usaron como transformantes. A partir de los transformantes obtenidos, se inocularon 200 cepas en un medio PSW (1,0 % de glucosa, 4,0 % de lactosa, 2,0 % de torta de soja, 1,0 % de germen de trigo, 0,2 % de dihidrogenofosfato de potasio, 0,2 % de sulfato de amonio, 0,2 % de fosfato de amonio, y 0,2 % de carbonato de calcio), y se cultivaron a 28 °C durante 5 días. Después del cultivo, se retiraron los micelios mediante centrifugación para obtener sobrenadantes del cultivo como soluciones de enzimas brutas. Las soluciones de enzimas brutas se sometieron a SDS-PAGE. Este SDS-PAGE se llevó a cabo utilizando un equipo de electroforesis Safety Cell Mini STC-808 (fabricado por TEFCO) y Precast Mini Gel 12 %-SDS-PAGE mini, 1.0 mm de espesor del gel (fabricado por TEFCO). El método de electroforesis se llevó a cabo de acuerdo con los protocolos adjuntos a los productos. Se usó la calibración LMW para la electroforesis mediante SDS (fabricado

por GE Healthcare Bio-Sciences) como marcador de pesos moleculares. Después de la electroforesis, de acuerdo con el protocolo adjuntos a la anterior, se usó Coomassie Brilliant Blue R250 (fabricado por NACALAI TESQUE, INC.) para la tinción, seguido por decoloración. Como resultado, se expresó una proteína de 45kDa específicamente en los transformantes. Se designó la cepa 2-99 que tenía una cantidad de expresión particularmente elevada como la cepa que expresaba solamente SCE3.

(6) Creación y cultivo de la cepa que expresa simultáneamente SC3E y PPCE

La cepa que expresa solamente SCE3 obtenida en el Ejemplo 1-(5) se transformó con el pPPCE-M obtenido en el Ejemplo 1-(2) y el pDt-118 obtenido en el Ejemplo 1-(4). El método de transformación siguió el método en el Ejemplo 1-(5), y esta transformación se llevó a cabo mediante un método de transformación simultánea utilizando la cepa que expresa solamente SCE3 como hospedador y el gen de resistencia a la destomicina (DtR) como marcador de selección. La cepa que expresa solamente SCE3 se transformó utilizando 7 µg de pPPCE-M y 3 µg de pDt-118, y se cubrió con una capa de agar PDA en un medio de PDA que contenía 20 µg/ml de higromicina B, seguido por cultivo a 28 °C durante 5 días. Después del cultivo, las colonias en crecimiento se transfirieron de nuevo a un medio PDA que contenía higromicina B, y las colonias en crecimiento en este medio se usaron como transformantes. De esta manera, se obtuvieron 70 cepas de los transformantes. A partir de los transformantes obtenidos, se inocularon las 70 cepas en un medio PSW descrito en el Ejemplo 1-(5), y se cultivaron a 28 °C durante 5 días. Después del cultivo, se retiraron los micelios mediante centrifugación para obtener sobrenadantes del cultivo como soluciones de enzimas brutas. Las soluciones de enzimas brutas se sometieron a SDS-PAGE, y una proteína de aproximadamente 26 kDa se expresó específicamente en los transformantes. Se designó la cepa 11-8 que tenía una cantidad de expresión particularmente elevada como la cepa que expresaba simultáneamente SCE3-PPCE.

(7) Creación y cultivo de una cepa que expresa solo PPCE

Se llevó a cabo la transformación de la cepa 2 de *Trichoderma viride* con el pPPCE-M obtenido en el Ejemplo 1-(2) y el pPYR4 obtenido en el Ejemplo 1-(3) de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 1-(5). Específicamente, La cepa 2 de *Trichoderma viride* se transformó utilizando 7 µg de pPPCE-M y 3 µg de pPYR4, y se cubrió con una capa de agar blando en un medio mínimo, seguido por cultivo a 28 °C durante 5 días. Después del cultivo, las colonias en crecimiento se transfirieron de nuevo a un medio mínimo, y las colonias que crecieron en este medio se usaron como transformantes. Los transformantes obtenidos se cultivaron mediante el método descrito en el Ejemplo 1-(5). La cepa que expresó una cantidad significativa de PPCE se designó como la cepa que expresaba solamente PPCE.

(8) Medida de la concentración de proteínas expresadas

Se evaluaron la cepa que expresaba solo SCE3, la cepa que expresa solamente PPCE, y la cepa que expresaba simultáneamente SCE3-PPCE en términos de la cantidad de endoglucanasa recombinante expresada. Se midió la cantidad de proteínas totales de los sobrenadantes del cultivo utilizando el kit de ensayo de proteínas BIO-RAD (fabricado por Bio-Rad Inc.) de acuerdo con los protocolos adjuntos al mismo. Posteriormente, se llevó a cabo la electroforesis del sobrenadante del cultivo en una cantidad de 11 µg como la cantidad de proteínas mediante el método descrito en el Ejemplo 1-(5). Se analizaron las bandas utilizando Molecular Imager FX (fabricado por Bio-Rad Laboratories, Inc.) y Quantity One (fabricado by Bio-Rad Laboratories, Inc.) para determinar la relación entre la celulasa expresada y los componentes de celulasas totales. Aquí, las condiciones del análisis de bandas fueron: sensibilidad de 7,513 y un tamaño de disco de rodadura de 10. La Tabla 1 muestra el resultado. Con respecto a este resultado, en la cepa que expresa simultáneamente SCE3-PPCE, SCE3 y PPCE fueron los dos tipos principales de las endoglucanasas, y las relaciones con respecto a las celulasas totales fueron respectivamente 40,8 % y 20,2 %.

Adicionalmente, como se muestra en la Tabla 1, en el caso en el que SCE3 y PPCE se expresaban simultáneamente, se obtuvo un sobrenadante de cultivo que tenía una relación de endoglucanasa recombinante mayor que en el caso donde cada endoglucanasa se expresaba individualmente.

[Tabla 1]

Relaciones de componentes de proteínas recombinantes en las cepa 2 de <i>Trichoderma viride</i>			
	Cepa que expresa solamente SCE3	Cepa que expresa solamente PPCE	Cepa que expresa simultáneamente SCE3-PPCE
Endoglucanasa (Familia 74 de GH)	0,7 %	1,6 %	0,5 %
BGL	2,7 %	2,8 %	1,8 %
CBH1	16,9 %	21,4 %	15,4 %
CBH2	6,2 %	12,8 %	3,9 %
EG1	-	4,5 %	-

SCE3	44,9 %	6,0 %	40,8 %
PPCE	0 %	29,8 %	20,2 %
Relación de endoglucanasa recombinante	44,9 %	29,8 %	61,0 %

[Ejemplo 2] Comparación de actividades que eliminan pelusa entre la cepa que expresa solamente SCE3, La cepa que expresa solamente PPCE, y la cepa que expresa solo SCE3 y PPCE

5 Los sobrenadantes de los cultivos de la cepa que expresa solamente SCE3, la cepa que expresa solamente PPCE, y la cepa que expresa simultáneamente SCE3-PPCE preparada en el Ejemplo 1 se usaron para examinar las actividades que eliminan pelusa en las siguientes condiciones de lavado.

<Condiciones>

10

Máquina de ensayo: Launder Meter L-12 (fabricado por DAIEI KAGAKU SEIKI MFG. CO., LTD.)

Temperatura: 40 °C

15

Tiempo: 60 minutos

Solución de reacción: 5 mmol/l de tampón de ácido acético (pH 4) 40 ml

20

A una solución de tratamiento se añadió una cantidad adecuada de bolas de caucho junto con cada sobrenadante del cultivo.

25

Tras el lavado, se evaluó visualmente la medida en que se eliminó la pelusa, y se calcularon las cantidades de sobrenadantes de cultivos requeridas para eliminar aproximadamente un 50 % de pelusa sobre la base de una evaluación visual. Se determinaron las actividades relativas a partir de las cantidades líquidas, donde la actividad de eliminación de pelusa del sobrenadante del cultivo de la cepa que expresaba solamente PPCE se consideró el 100 %. Además, a partir del resultado del Ejemplo 1, se calcularon los pesos de las celulasas totales en los sobrenadantes de los cultivos, y se calcularon las actividades de eliminación de pelusa con respecto a las cantidades de celulasas totales. Como resultado, como se muestra en la Tabla 2, la cepa que expresa simultáneamente SCE3-PPCE que contiene ambas endoglucanasas recombinantes SCE3 y PPCE presentó actividades 4,1 veces tan altas como la cepa que expresaba solamente PPCE con respecto al sobrenadante del cultivo, y 2,4 veces con respecto a las celulasas totales. Además, la cepa que expresa simultáneamente SCE3-PPCE presentó actividades 5,1 veces tan altas como la cepa que expresaba solamente SCE3 con respecto al sobrenadante del cultivo, y 3 veces con respecto a las celulasas totales.

35

Los resultados anteriores mostraron que en el caso donde SCE3 y PPCE se expresaron simultáneamente, se obtuvo una elevada actividad sinérgica de eliminación de pelusa en comparación con el caso donde cada endoglucanasa se expresó individualmente.

[Tabla 2]

Comparación de las actividades que eliminan pelusa entre la cepa que expresaba solamente SCE3, la cepa que expresa solamente PPCE, y la cepa que expresaba simultáneamente SCE3 y PPCE		
Enzima	Actividad relativa con respecto al sobrenadante del cultivo (%)	Actividad relativa con respecto a las celulasas totales (%)
Cepa que expresa solamente SCE3	80	80
Cepa que expresa solamente PPCE	100	100
Cepa que expresa simultáneamente SCE3-PPCE	410	240

40

[Ejemplo 3] Análisis de las propiedades del pH en las actividades de eliminación de pelusa de la cepa que expresa solamente SCE3, La cepa que expresa solamente PPCE, y la cepa que expresa simultáneamente SCE3 y PPCE

45

Los sobrenadantes de los cultivos de la cepa que expresa solamente SCE3, la cepa que expresa solamente PPCE, y la cepa que expresaba simultáneamente SCE3-PPCE usadas en el Ejemplo 1 se utilizaron para investigar las propiedades del pH de cada enzima de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 2. En consecuencia, se obtuvieron los resultados que se muestran en la Tabla 3 y en la Fig. 1. La cepa que expresaba simultáneamente SCE3-PPCE presentó un perfil de pH más amplio donde se mantuvo la actividad elevada desde ácida débil a ácida que la de las cepas que se expresaban solas. En particular, de manera sorprendente, en el caso donde SCE3 se

expresa individualmente, la actividad eliminadora de pelusa a pH 5 fue aproximadamente del 75 % de la del pH óptimo. En el caso donde PPCE se expresa individualmente, la actividad eliminadora de pelusa a pH 5 fue aproximadamente del 30 % de la del pH óptimo. Mientras tanto, en el caso en el que se combinaron las dos, la actividad eliminadora de pelusa a pH 5 se presentó como equivalente a la actividad al pH óptimo.

5

[Tabla 3]

Perfil de pH de cada sobrenadante del cultivo			
Tampón, pH	Actividad relativa de la cepa que expresaba solo SCE3 (%)	Actividad relativa de la cepa que expresaba solo PPCE (%)	Actividad relativa de la cepa que expresaba simultáneamente SCE3-PPCE (%)
ácido cítrico, pH 2	50	85	35
ácido acético, pH 3	70	100	100
ácido acético, pH 4	100	90	100
ácido acético, pH 5	75	30	100
ácido acético, pH 6	15	10 o menos	20
ácido fosfórico, pH 7	15	10 o menos	10 o menos

[Ejemplo 4] Preparación de *Trichoderma viride* que expresa simultáneamente la endoglucanasa STCE y la endoglucanasa PPCE

10

(1) Construcción del vector de expresión pCB-Stm12 de STCE

Como vector de expresión para la endonucleasa STCE derivada de *Staphylotrichum cocosporum*, se usó el pCB-Stm12 descrito en el Ejemplo B4 del documento WO 2005/056787.

15

(2) Creación de la cepa que expresa solamente STCE

La transformación de *Trichoderma viride* con el plásmido pCB-stm12 y el plásmido pPYR4 y el cultivo de los transformantes se llevó a cabo mediante el mismo método que se ha descrito en el Ejemplo 1-(5). Se siguió el método descrito en el documento WO 2005/056787. A partir de los transformantes obtenidos de 80 cepas, se prepararon soluciones de enzimas brutas, y se sometieron a SDS-PAGE de acuerdo con el Ejemplo 1-(5). Como resultado, se expresó una proteína de 45 kD específicamente en los transformantes. La cepa m12-60 que tenía una cantidad de expresión particularmente elevada se designó como cepa que expresaba solamente STCE.

20

(3) Creación de cepa que expresa simultáneamente STCE-PPCE

La cepa que expresa solamente STCE creada en el Ejemplo 4-(2) se transformó con el pPPCE-M obtenido en el Ejemplo 1-(2) y el pDT-118 obtenido en el Ejemplo 1-(4). Como método de transformación, se llevó a cabo esta transformación de acuerdo con el método en el Ejemplo 1-(5). A partir de los transformantes obtenidos, se cultivaron 70 cepas mediante el método descrito en el Ejemplo 1-(5), y se prepararon las soluciones de enzimas brutas. Las soluciones de enzimas brutas se sometieron a SDS-PAGE, y una proteína de aproximadamente 26 kD se expresó específicamente en los transformantes. La cepa 10-82 que tenía una cantidad de expresión particularmente elevada se designó como la cepa que expresaba simultáneamente STCE y PPCE.

30

(4) Medida de la concentración de proteínas expresadas

Mediante el método descrito en el Ejemplo 1-(8), la cepa que expresa solamente STCE, la cepa que expresa solamente PPCE, y la cepa que expresa simultáneamente STCE-PPCE se evaluaron en términos de la cantidad del componente de celulasa expresada. La Tabla 4 muestra el resultado. Con respecto a este resultado, en la cepa que expresa simultáneamente STCE-PPCE, STCE y PPCE fueron los dos tipos principales de las endoglucanasas, y las relaciones con respecto a las celulasas totales fueron respectivamente 25,5 % y 18,5 %. Adicionalmente, en el caso donde STCE-PPCE se expresaron simultáneamente, se obtuvo un sobrenadante de cultivo que tenía una relación de endoglucanasa recombinante mayor que en el caso donde cada endoglucanasa se expresaba individualmente.

40

[Tabla 4]

Relaciones de componentes de proteínas recombinantes en las cepa 2 de <i>Trichoderma viride</i>			
	Cepa que expresa solamente STCE	Cepa que expresa solamente PPCE	Cepa que expresa simultáneamente STCE·PPCE
Endoglucanasa (Familia 74 de GH)	1,3 %	1,6 %	1,7 %
BGL	4,3 %	2,8 %	3,1 %
CBH1	19,8 %	21,4 %	14,5 %
CBH2	14,4 %	12,8 %	7,4 %
EG1	5,5 %	4,5 %	4,6 %
SCE3	5,1 %	6,0 %	4,1 %
STCE	36,4 %	0 %	25,5 %
PPCE	0 %	29,8 %	18,5 %
Relación de endoglucanasa recombinante	36,4 %	29,8 %	44,0 %

[Ejemplo 5] Comparación de actividades que eliminan pelusa entre la cepa que expresa solamente STCE, La cepa que expresa solamente PPCE, y la cepa que expresa simultáneamente STCE·PPCE

5 Los sobrenadantes de los cultivos de la cepa que expresa solamente STCE, la cepa que expresa solamente PPCE, y la cepa que expresa simultáneamente STCE·PPCE preparada en los Ejemplos 1 y 4 se utilizaron para investigar las actividades que eliminan pelusa mediante el mismo método del Ejemplo 2. Además, a partir del resultado del Ejemplo 4, se calcularon los pesos de las celulasas totales en los sobrenadantes de los cultivos, y se calcularon las actividades de eliminación de pelusa con respecto a las cantidades de celulasas totales. Como resultado, como se muestra en la Tabla 5, la cepa que expresa simultáneamente STCE·PPCE que contiene ambas endoglucanasas recombinantes STCE y PPCE presentó actividades 4,2 veces tan altas como la cepa que expresaba solamente PPCE con respecto al sobrenadante del cultivo, y 3,7 veces con respecto a las celulasas totales. Además, la cepa que expresa simultáneamente STCE·PPCE presentó actividades 3,5 veces tan altas como la cepa que expresaba solamente STCE con respecto al sobrenadante del cultivo, y 3,2 veces con respecto a las celulasas totales.

Los resultados anteriores mostraron que en el caso donde STCE y PPCE se expresaron simultáneamente, se obtuvo una elevada actividad sinérgica de eliminación de pelusa en comparación con el caso donde cada endoglucanasa se expresó individualmente.

[Tabla 5]

La comparación de las actividades eliminadoras de pelusa entre la cepa que expresa solo STCE, la cepa que expresa solamente PPCE, y la cepa que expresa simultáneamente STCE y PPCE		
Enzima	Actividad relativa con respecto al sobrenadante del cultivo (%)	Actividad relativa con respecto a las celulasas totales (%)
Cepa que expresa solamente STCE	120	115
Cepa que expresa solamente PPCE	100	100
Cepa que expresa simultáneamente STCE·PPCE	420	370

[Ejemplo 6] Análisis de las propiedades del pH en las actividades de eliminación de pelusa de la cepa que expresa solo STCE, La cepa que expresa solamente PPCE, y la cepa que expresa simultáneamente STCE·PPCE

Los sobrenadantes de los cultivos de la cepa que expresa solamente STCE, la cepa que expresa solamente PPCE, y la cepa que expresa simultáneamente STCE·PPCE preparada en los Ejemplos 1 y 4 se utilizaron para examinar el perfil del pH mediante el mismo método del Ejemplo 3 en las siguientes condiciones de lavado. En consecuencia, se obtuvieron los resultados que se muestran en la Tabla 6 y en la Fig. 2. La cepa que expresaba simultáneamente STCE·PPCE presentó un perfil de pH más amplio donde se mantuvo la actividad elevada desde ácida débil a ácida que la de las cepas que se expresaban solas.

[Tabla 6]

Perfil de pH de cada sobrenadante del cultivo			
Tampón, pH	Actividad relativa de la cepa que expresa solo STCE (%)	Actividad relativa de la cepa que expresaba solo PPCE (%)	Actividad relativa de la cepa que expresa simultáneamente STCE y PPCE (%)
ácido cítrico, pH 2	17	85	32
ácido acético, pH 3	33	100	70
ácido acético, pH 4	67	90	80
ácido acético, pH 5	100	30	100
ácido acético, pH 6	90	10 o menos	25
ácido fosfórico, pH 7	63	10 o menos	20

Aplicabilidad industrial

- 5 Una preparación de celulasa de la presente invención tiene una elevada actividad y una propiedad del pH amplia. La preparación de celulasas de la presente invención se puede utilizar en la producción de fibra que contiene celulosa que tiene una sensación táctico y un aspecto mejorados y en la formación de una apariencia de "lavado a la piedra" de fibra coloreada que contiene celulosa. Además, la preparación de celulasa de la presente invención también se puede utilizar utiliza en la producción de un azúcar (sacarificación) procedente de biomasa tal como paja de arroz, bagazo, rastrojo de maíz, pulpa de un fruto tal como semilla de palma, y residuos de madera, y eventualmente, en la producción de bioetanol.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 15 <110> MEIJI SEIKA KAISHA, LTD.
 <120> PREPARACIÓN DE CELULASA QUE CONTIENE ENDOGLUCANASAS DERIVADAS DE DOS TIPOS DIFERENTES DE MICROORGANISMOS
 <130> M0894
 <150> JP 2009-159109
 20 <151> 2009-7-3
 <160> 6
 <170> PatentIn versión 3.1
 <210> 1
 <211> 1194
 25 <212> ADN
 <213> Trichoderma viride
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1191)
 30 <400> 1

caa cag act gtc tgg gga cag tgt gga ggt att ggt tgg agc gga cct	48
Gln Gln Thr Val Trp Gly Gln Cys Gly Gly Ile Gly Trp Ser Gly Pro	
1 5 10 15	
acg agt tgt gct cct gga tca gct tgt tct act ctc aat cct tat tat	96
Thr Ser Cys Ala Pro Gly Ser Ala Cys Ser Thr Leu Asn Pro Tyr Tyr	
20 25 30	
gcg caa tgc att ccg ggg gcc act agt atc acc acc tcg acc cga ccc	144
Ala Gln Cys Ile Pro Gly Ala Thr Ser Ile Thr Thr Ser Thr Arg Pro	
35 40 45	
ccc tcg ggt cca acc acc acc acc aga gcc acc tca acg acc tca tct	192
Pro Ser Gly Pro Thr Thr Thr Thr Arg Ala Thr Ser Thr Thr Ser Ser	
50 55 60	
ccg cca ccg acc agc tct gga gtt cga ttt gct ggc gtt aac atc gcg	240
Pro Pro Pro Thr Ser Ser Gly Val Arg Phe Ala Gly Val Asn Ile Ala	
65 70 75 80	
ggc ttt gac ttc gga tgt acc aca gat ggc act tgc gtt aca tcg aag	288
Gly Phe Asp Phe Gly Cys Thr Thr Asp Gly Thr Cys Val Thr Ser Lys	
85 90 95	
ggt tat cct ccg ttg aag aac ttc act ggg gca aac aac tac ccg gac	336
Val Tyr Pro Pro Leu Lys Asn Phe Thr Gly Ala Asn Asn Tyr Pro Asp	
100 105 110	
ggt atc ggc cag atg cag cac ttc gtc aac gat gat ggg atg act att	384
Gly Ile Gly Gln Met Gln His Phe Val Asn Asp Asp Gly Met Thr Ile	
115 120 125	
ttc cgc cta ccc gtc gga tgg cag tac ctc gta aac aac aat ctg ggt	432
Phe Arg Leu Pro Val Gly Trp Gln Tyr Leu Val Asn Asn Asn Leu Gly	
130 135 140	
gga act ctc gat tcc acc agt atc tcg aag tat gat cag ctc gtt cag	480
Gly Thr Leu Asp Ser Thr Ser Ile Ser Lys Tyr Asp Gln Leu Val Gln	
145 150 155 160	
ggg tgc ctg tct ctc ggt gta tac tgc atc atc gac atc cac aat tat	528
Gly Cys Leu Ser Leu Gly Val Tyr Cys Ile Ile Asp Ile His Asn Tyr	
165 170 175	
gct cga tgg aac ggt gga atc att ggc cag gga ggc cct aca aat gcc	576
Ala Arg Trp Asn Gly Gly Ile Ile Gly Gln Gly Gly Pro Thr Asn Ala	
180 185 190	
cag ttt acc agt ctt tgg tcg cag ttg gca tcg aag tac gcg tct cag	624
Gln Phe Thr Ser Leu Trp Ser Gln Leu Ala Ser Lys Tyr Ala Ser Gln	
195 200 205	
tcg agg gtg tgg ttc gga ata atg aat gag ccc cac gac gtg aac atc	672
Ser Arg Val Trp Phe Gly Ile Met Asn Glu Pro His Asp Val Asn Ile	
210 215 220	
aac act tgg gct gcc acg gtt caa gag gtc gtc act gca atc cgc aac	720
Asn Thr Trp Ala Ala Thr Val Gln Glu Val Val Thr Ala Ile Arg Asn	
225 230 235 240	

ES 2 553 223 T3

```

gcc ggt gct acg tcg caa tac att tct ctg cct gga aat gat tat caa      768
Ala Gly Ala Thr Ser Gln Tyr Ile Ser Leu Pro Gly Asn Asp Tyr Gln
                245                250                255
tct gcg gca gct ttt att tcc gat ggc agt gca gcc gcc ctg tct cag      816
Ser Ala Ala Ala Phe Ile Ser Asp Gly Ser Ala Ala Ala Leu Ser Gln
                260                265                270
gta acg aac cct gat gga tca aca acg aat cta atc ttc gat gtc cac      864
Val Thr Asn Pro Asp Gly Ser Thr Thr Asn Leu Ile Phe Asp Val His
                275                280                285
aag tac tta gac tcg gac aac tcc ggt act cac gcc gaa tgc act aca      912
Lys Tyr Leu Asp Ser Asp Asn Ser Gly Thr His Ala Glu Cys Thr Thr
                290                295                300
aac aac atc gac ggc gcc ttt gct cct ctc gcc act tgg ctt cga cag      960
Asn Asn Ile Asp Gly Ala Phe Ala Pro Leu Ala Thr Trp Leu Arg Gln
                305                310                315
aac aac cgc cag gct att ctg acg gaa acc ggc ggt ggc aat gtt cag      1008
Asn Asn Arg Gln Ala Ile Leu Thr Glu Thr Gly Gly Gly Asn Val Gln
                325                330                335
tcc tgc atc caa gat ttg tgc caa cag atc cag tac ctc aac cag aac      1056
Ser Cys Ile Gln Asp Leu Cys Gln Gln Ile Gln Tyr Leu Asn Gln Asn
                340                345                350
tca gat gtc tat ctt ggc tat gct ggc tgg ggt gcc ggt tca ttt gat      1104
Ser Asp Val Tyr Leu Gly Tyr Ala Gly Trp Gly Ala Gly Ser Phe Asp
                355                360                365
agc act tat att ctg acg gaa acg cct act gga agc ggt aac tcg tgg      1152
Ser Thr Tyr Ile Leu Thr Glu Thr Pro Thr Gly Ser Gly Asn Ser Trp
                370                375                380
acg gac aca tcc cta gtt agc tcg tgt ctc gcc agg aag taa      1194
Thr Asp Thr Ser Leu Val Ser Ser Cys Leu Ala Arg Lys
                385                390                395

```

- <210> 2
- <211> 397
- <212> PRT
- <213> Trichoderma viride
- <400> 2

5

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

Asn Thr Trp Ala Ala Thr Val Gln Glu Val Val Thr Ala Ile Arg Asn
 225 230 235 240
 Ala Gly Ala Thr Ser Gln Tyr Ile Ser Leu Pro Gly Asn Asp Tyr Gln
 245 250 255
 Ser Ala Ala Ala Phe Ile Ser Asp Gly Ser Ala Ala Ala Leu Ser Gln
 260 265 270
 Val Thr Asn Pro Asp Gly Ser Thr Thr Asn Leu Ile Phe Asp Val His
 275 280 285
 Lys Tyr Leu Asp Ser Asp Asn Ser Gly Thr His Ala Glu Cys Thr Thr
 290 295 300
 Asn Asn Ile Asp Gly Ala Phe Ala Pro Leu Ala Thr Trp Leu Arg Gln
 305 310 315 320
 Asn Asn Arg Gln Ala Ile Leu Thr Glu Thr Gly Gly Gly Asn Val Gln
 325 330 335
 Ser Cys Ile Gln Asp Leu Cys Gln Gln Ile Gln Tyr Leu Asn Gln Asn
 340 345 350
 Ser Asp Val Tyr Leu Gly Tyr Ala Gly Trp Gly Ala Gly Ser Phe Asp
 355 360 365
 Ser Thr Tyr Ile Leu Thr Glu Thr Pro Thr Gly Ser Gly Asn Ser Trp
 370 375 380
 Thr Asp Thr Ser Leu Val Ser Ser Cys Leu Ala Arg Lys
 385 390 395

- 5 <210> 3
- <211> 666
- <212> ADN
- <213> Penicillium pinophilum
- <220>
- 10 <221> CDS
- <222> (1).. (663)
- <400> 3

ES 2 553 223 T3

```

cag cag agc ctg tgc agc cag tac agc agc tac acc agc ggc cag tac      48
Gln Gln Ser Leu Cys Ser Gln Tyr Ser Ser Tyr Thr Ser Gly Gln Tyr
1      5      10      15
agc gtc aac aac aac ctg tgg ggc gag agc agc ggc agc ggc agc cag      96
Ser Val Asn Asn Asn Leu Trp Gly Glu Ser Ser Gly Ser Gly Ser Gln
      20      25      30
tgc acc tac gtc aac agc atc agc agc ggc gtc agc tgg agc acc      144
Cys Thr Tyr Val Asn Ser Ile Ser Ser Ser Gly Val Ser Trp Ser Thr
      35      40      45
acc tgg aac tgg agc ggc ggc agc acc agc gtc aag agc tac gcc aac      192
Thr Trp Asn Trp Ser Gly Gly Ser Thr Ser Val Lys Ser Tyr Ala Asn
      50      55      60
agc cag ctg agc ggc ctg acc aag aag ctg gtc agc aac ctg cag agc      240
Ser Gln Leu Ser Gly Leu Thr Lys Lys Leu Val Ser Asn Leu Gln Ser
      65      70      75      80
atc ccc acc agc gtc cag tgg agc tac agc aac acc aac atc gtc gcc      288
Ile Pro Thr Ser Val Gln Trp Ser Tyr Ser Asn Thr Asn Ile Val Ala
      85      90      95
gac gtc agc tac gac ctg ttc acc gcc gcc gac atc aac cac gtc acc      336
Asp Val Ser Tyr Asp Leu Phe Thr Ala Ala Asp Ile Asn His Val Thr
      100      105      110
tac agc ggc gac tac gag ctg atg atc tgg ctg ggc aag tac ggc ggc      384
Tyr Ser Gly Asp Tyr Glu Leu Met Ile Trp Leu Gly Lys Tyr Gly Gly
      115      120      125
gcc cag ccc ctg ggc agc cag atc ggc acc gcc aac gtc ggc ggc gcc      432
Ala Gln Pro Leu Gly Ser Gln Ile Gly Thr Ala Asn Val Gly Gly Ala
      130      135      140
acc tgg cag ctg tgg tac ggc gtc aac ggc agc cag aag acc tac agc      480
Thr Trp Gln Leu Trp Tyr Gly Val Asn Gly Ser Gln Lys Thr Tyr Ser
      145      150      155      160
ttc gtc gcc agc agc cag acc acc agc tgg aac ggc gac atc ctg cag      528
Phe Val Ala Ser Ser Gln Thr Thr Ser Trp Asn Gly Asp Ile Leu Gln
      165      170      175

ttc ttc aag tac ctg cag agc aac cag ggc ttc ccc gcc agc agc cag      576
Phe Phe Lys Tyr Leu Gln Ser Asn Gln Gly Phe Pro Ala Ser Ser Gln
      180      185      190
tac ctg atc gac ctg cag ttc ggc acc gag ccc ttc acc ggc agc cag      624
Tyr Leu Ile Asp Leu Gln Phe Gly Thr Glu Pro Phe Thr Gly Ser Gln
      195      200      205
acc acc ctg acc gtc aac cac tgg agc gcc agc gtc aac tag      666
Thr Thr Leu Thr Val Asn His Trp Ser Ala Ser Val Asn
      210      215      220

```

<210> 4
 <211> 221
 <212> PRT
 <213> Penicillium pinophilum
 <400> 4

5

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

- <210> 5
- <211> 888
- 5 <212> ADN
- <213> Staphylotrichum cocosporum
- <220>
- <221> CDS
- <222> (1).. (885)
- 10 <400> 5

gcc gat ggc aag tcg acc cgc tac tgg gac tgt tgc aag ccg tcg tgc 48
 Ala Asp Gly Lys Ser Thr Arg Tyr Trp Asp Cys Cys Lys Pro Ser Cys
 1 5 10 15
 tcg tgg ccc ggc aag gcc tcg gtg aac cag ccc gtc ttc gcc tgc agc 96
 Ser Trp Pro Gly Lys Ala Ser Val Asn Gln Pro Val Phe Ala Cys Ser
 20 25 30
 gcc aac ttc cag cgc atc agc gac ccc aac gtc aag tcg ggc tgc gac 144
 Ala Asn Phe Gln Arg Ile Ser Asp Pro Asn Val Lys Ser Gly Cys Asp
 35 40 45
 ggc ggc tcc gcc tac gcc tgc gcc gac cag acc ccg tgg gcc gtc aac 192
 Gly Gly Ser Ala Tyr Ala Cys Ala Asp Gln Thr Pro Trp Ala Val Asn

50	55	60	
gac aac ttc tcg tac ggc ttc gcc gcc acg tcc atc tcg ggc ggc aac			240
Asp Asn Phe Ser Tyr Gly Phe Ala Ala Thr Ser Ile Ser Gly Gly Asn			
65	70	75	80
gag gcc tcg tgg tgc tgt ggc tgc tac gag ctg acc ttc acc tcg ggc			288
Glu Ala Ser Trp Cys Cys Gly Cys Tyr Glu Leu Thr Phe Thr Ser Gly			
85	90	95	
ccc gtc gct ggc aag acc atg gtt gtc cag tcc acc tcg acc ggc ggc			336
Pro Val Ala Gly Lys Thr Met Val Val Gln Ser Thr Ser Thr Gly Gly			
100	105	110	
gac ctc ggc acc aac cac ttc gac ctg gcc atg ccc ggt ggt ggt gtc			384
Asp Leu Gly Thr Asn His Phe Asp Leu Ala Met Pro Gly Gly Gly Val			
115	120	125	
ggc atc ttc gac ggc tgc tcg ccc cag ttc ggc ggc ctc gcc ggc gac			432
Gly Ile Phe Asp Gly Cys Ser Pro Gln Phe Gly Gly Leu Ala Gly Asp			
130	135	140	
cgc tac ggc ggc gtc tcg tcg cgc agc cag tgc gac tcg ttc ccc gcc			480
Arg Tyr Gly Gly Val Ser Ser Arg Ser Gln Cys Asp Ser Phe Pro Ala			
145	150	155	160
gcc ctc aag ccc ggc tgc tac tgg cgc ttc gac tgg ttc aag aac gcc			528
Ala Leu Lys Pro Gly Cys Tyr Trp Arg Phe Asp Trp Phe Lys Asn Ala			
165	170	175	
gac aac ccg acc ttc acc ttc cgc cag gtc cag tgc ccg tcg gag ctc			576
Asp Asn Pro Thr Phe Thr Phe Arg Gln Val Gln Cys Pro Ser Glu Leu			
180	185	190	
gtc gcc cgc acc ggc tgc cgc cgc aac gac gac ggc aac ttc ccc gtc			624
Val Ala Arg Thr Gly Cys Arg Arg Asn Asp Asp Gly Asn Phe Pro Val			
195	200	205	
ttc acc cct ccc tcg ggc ggt cag tcc tcc tcg tct tcc tcc tcc agc			672
Phe Thr Pro Pro Ser Gly Gly Gln Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser			
210	215	220	
agc gcc aag ccc acc tcc acc tcc acc tcg acc acc tcc acc aag gct			720
Ser Ala Lys Pro Thr Ser Thr Ser Thr Ser Thr Thr Ser Thr Lys Ala			
225	230	235	240
acc tcc acc acc tcg acc gcc tcc agc cag acc tcg tcg tcc acc ggc			768
Thr Ser Thr Thr Ser Thr Ala Ser Ser Gln Thr Ser Ser Ser Thr Gly			
245	250	255	
ggc ggc tgc gcc gcc cag cgc tgg gcg cag tgc ggc ggc atc ggg ttc			816
Gly Gly Cys Ala Ala Gln Arg Trp Ala Gln Cys Gly Gly Ile Gly Phe			
260	265	270	
tcg ggc tgc acc acg tgc gtc agc ggc acc acc tgc aac aag cag aac			864
Ser Gly Cys Thr Thr Cys Val Ser Gly Thr Thr Cys Asn Lys Gln Asn			
275	280	285	
gac tgg tac tcg cag tgc ctt taa			888
Asp Trp Tyr Ser Gln Cys Leu			
290	295		

<210> 6
 <211> 295
 <212> PRT
 5 <213> Staphylotrichum cocosporum
 <400> 6

Ala	Asp	Gly	Lys	Ser	Thr	Arg	Tyr	Trp	Asp	Cys	Cys	Lys	Pro	Ser	Cys
1				5					10					15	
Ser	Trp	Pro	Gly	Lys	Ala	Ser	Val	Asn	Gln	Pro	Val	Phe	Ala	Cys	Ser
			20					25					30		
Ala	Asn	Phe	Gln	Arg	Ile	Ser	Asp	Pro	Asn	Val	Lys	Ser	Gly	Cys	Asp
		35					40					45			
Gly	Gly	Ser	Ala	Tyr	Ala	Cys	Ala	Asp	Gln	Thr	Pro	Trp	Ala	Val	Asn
	50					55					60				
Asp	Asn	Phe	Ser	Tyr	Gly	Phe	Ala	Ala	Thr	Ser	Ile	Ser	Gly	Gly	Asn
65					70					75					80
Glu	Ala	Ser	Trp	Cys	Cys	Gly	Cys	Tyr	Glu	Leu	Thr	Phe	Thr	Ser	Gly
				85					90					95	
Pro	Val	Ala	Gly	Lys	Thr	Met	Val	Val	Gln	Ser	Thr	Ser	Thr	Gly	Gly
			100					105						110	
Asp	Leu	Gly	Thr	Asn	His	Phe	Asp	Leu	Ala	Met	Pro	Gly	Gly	Gly	Val
		115					120					125			
Gly	Ile	Phe	Asp	Gly	Cys	Ser	Pro	Gln	Phe	Gly	Gly	Leu	Ala	Gly	Asp
	130					135					140				
Arg	Tyr	Gly	Gly	Val	Ser	Ser	Arg	Ser	Gln	Cys	Asp	Ser	Phe	Pro	Ala
145					150					155					160
Ala	Leu	Lys	Pro	Gly	Cys	Tyr	Trp	Arg	Phe	Asp	Trp	Phe	Lys	Asn	Ala
				165					170					175	
Asp	Asn	Pro	Thr	Phe	Thr	Phe	Arg	Gln	Val	Gln	Cys	Pro	Ser	Glu	Leu
			180					185					190		
Val	Ala	Arg	Thr	Gly	Cys	Arg	Arg	Asn	Asp	Asp	Gly	Asn	Phe	Pro	Val
		195						200				205			
Phe	Thr	Pro	Pro	Ser	Gly	Gly	Gln	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser
	210					215					220				
Ser	Ala	Lys	Pro	Thr	Ser	Thr	Ser	Thr	Ser	Thr	Thr	Ser	Thr	Lys	Ala
225					230					235					240
Thr	Ser	Thr	Thr	Ser	Thr	Ala	Ser	Ser	Gln	Thr	Ser	Ser	Ser	Thr	Gly
				245					250					255	
Gly	Gly	Cys	Ala	Ala	Gln	Arg	Trp	Ala	Gln	Cys	Gly	Gly	Ile	Gly	Phe
			260					265					270		
Ser	Gly	Cys	Thr	Thr	Cys	Val	Ser	Gly	Thr	Thr	Cys	Asn	Lys	Gln	Asn
		275					280					285			
Asp	Trp	Tyr	Ser	Gln	Cys	Leu									
290						295									

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una preparación de celulasas que comprende endoglucanasas derivadas de dos tipos diferentes de microorganismos, en donde la preparación es una combinación de uno cualquiera de los puntos (a) y (b) siguientes:
- 10 (a) una combinación de una endoglucanasa clasificada en la familia 5 de GH con una endoglucanasa clasificada en la familia 12 de GH, y
- 15 (b) una combinación de una endoglucanasa clasificada en la familia 12 de GH con una endoglucanasa clasificada en la familia 45 de GH,
- 20 en donde la endoglucanasa clasificada en la familia 5 de GH es una proteína que tiene una cualquiera de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2 y la secuencia de aminoácidos en la que 10 o menos de los aminoácidos se han delecionado, sustituido, insertado o añadido, en donde la endoglucanasa clasificada en la familia 12 de GH es una proteína que tiene una cualquiera de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 4 y la
- 25 secuencia de aminoácidos en la que 10 o menos de los aminoácidos se han delecionado, sustituido, insertado o añadido, en donde la endoglucanasa clasificada en la familia 45 de GH es una proteína que tiene una cualquiera de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 6 y la secuencia de aminoácidos en la que 10 o menos de los aminoácidos se han delecionado, sustituido, insertado o añadido.
- 30 2. La preparación de celulasas de la reivindicación 1, en la que las endoglucanasas son proteínas recombinantes.
3. La preparación de celulasas de las reivindicaciones 1 o 2, en la que cada una de las endoglucanasas de la combinación (a) y (b) está incluida en una cantidad de al menos el 10 % en peso de las celulasas totales.
- 35 4. La preparación de celulasas de la reivindicación 3, en la que cada una de las endoglucanasas de la combinación (a) y (b) está incluida en una cantidad de al menos el 20 % en peso de las celulasas totales.
5. Un método para producir la preparación de celulasas de la reivindicación 1, comprendiendo el método la etapa de cultivar un transformante obtenido introduciendo los ADN que codifican dos tipos de las endoglucanasas en una
- 40 única célula hospedadora.
6. Un método para producir la preparación de celulasas de la reivindicación 1, en el que la célula hospedadora es un hongo filamentoso.
7. Un método para producir una fibra que contiene celulosa mejorada, comprendiendo el método la etapa de poner en contacto una fibra que contiene celulosa con la preparación de celulasas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
8. Un método para producir azúcar a partir de biomasa, comprendiendo el método la etapa de poner en contacto una biomasa que contiene celulosa con la preparación de celulasas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

Fig.1

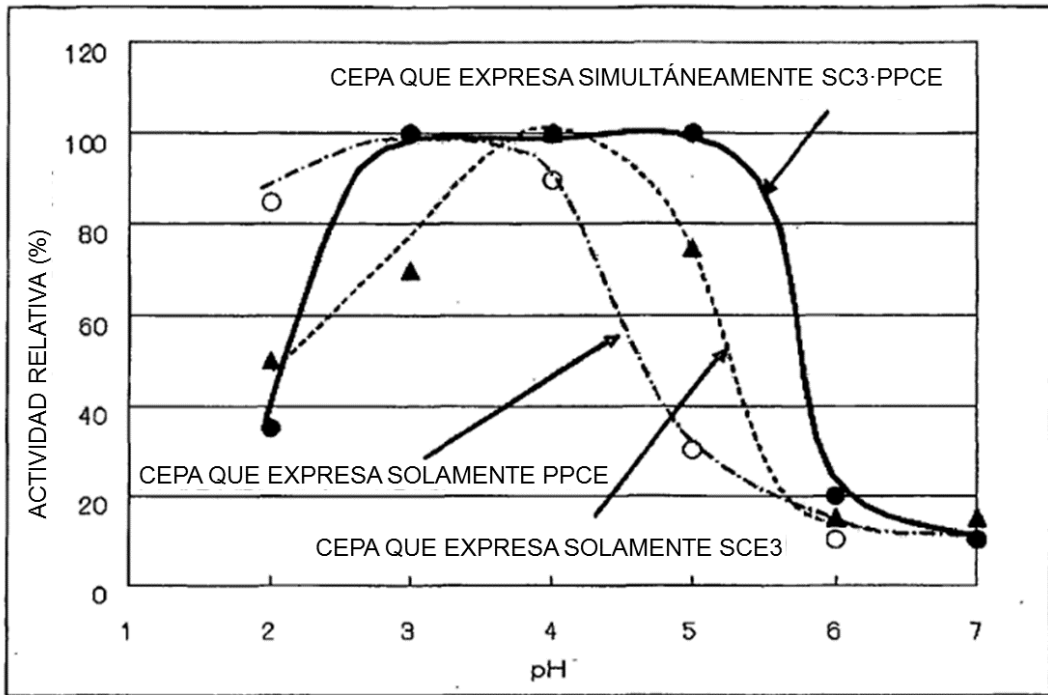


Fig.2

