

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 554 652**

51 Int. Cl.:

C12P 19/14 (2006.01)

D06M 16/00 (2006.01)

C12N 9/42 (2006.01)

A23K 1/165 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.12.2009 E 09836130 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.10.2015 EP 2370573**

54 Título: **Endoglucanasas fúngicas, su producción y su uso**

30 Prioridad:

30.12.2008 FI 20086253

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

22.12.2015

73 Titular/es:

**AB ENZYMES OY (100.0%)
Tykkimäentie 15b
05200 Rajamäki, FI**

72 Inventor/es:

**VALTAKARI, LEENA;
ALAPURANEN, MARIKA;
SZAKACS, GEORGE;
KALLIO, JARNO;
OJAPALO, PENTTI;
VEHMAANPERÄ, JARI y
PURANEN, TERHI**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 554 652 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

Endoglucanasas fúngicas, su producción y su uso

Campo de la invención

- La invención se refiere a nuevas endoglucanasas fúngicas, a su producción y a los medios para su producción. La invención se refiere además a preparaciones de enzimas que comprenden al menos una nueva endoglucanasa, así como a los procedimientos para tratar el material celulósico con las mismas. Aún más, la invención se refiere a composiciones detergentes y a pienso para consumo animal que comprenden las endoglucanasas.

Antecedentes de la invención

- Las celulasas se encuentran entre las enzimas más ampliamente utilizadas en la industria. Por lo general se aplican en la industria textil, en la industria de detergentes, en la industria papelera, en la industria alimentaria y en la industria de piensos, incluido el horneado, y en la hidrólisis del material lignocelulósico para, p. ej., la producción de bioetanol, etc. El uso práctico de las celulasas está obstaculizado por la naturaleza de las composiciones de celulasas, que a menudo son mezclas de enzimas que tienen diferentes actividades y especificidades de sustrato. Por esta razón, se ha invertido mucho trabajo para obtener celulasas que tienen sólo las actividades deseadas. Las propiedades únicas de cada celulasa hacen que algunas sean más adecuadas que otras para determinados propósitos.

En el tratamiento de las telas, las celulasas atacan la cadena de las moléculas de celulosa que forman las fibras de algodón, con lo que se alteran las características de la tela.

- En la industria textil, un aspecto de «lavado a la piedra» o desgastado ha despertado el interés de los productores de la tela vaquera en los últimos años. El lavado a la piedra tradicional con piedra pómez reduce la resistencia de la tela y sobrecarga las lavadoras de ropa. La tendencia se ha dirigido hacia los procedimientos de acabado enzimático de la tela vaquera y las celulasas han reemplazado a la piedra pómez, o se han utilizado con ella, para darle a la tela su deseado aspecto de «deshilachado». Los tratamientos enzimáticos controlados dan lugar a que las prendas y las máquinas resulten menos dañadas, y a que desaparezca la necesidad de deshacerse de las piedras.
- Adicionalmente, la industria textil utiliza celulasas para el bioacabado, a saber, para crear una mejora permanente en el desfrisado, y para mejorar la resistencia al frizado, despejar la estructura superficial mediante la reducción de la pelusa, mejorar el contacto del tejido, tal como la suavidad, la tersura y un tacto más sedoso, mejorar la capacidad de drapeado y la brillantez de los colores del tejido, y mejorar de la capacidad de absorción de la humedad.

- Las celulasas comprenden un dominio/núcleo catalítico (CD, por su nombre en inglés) que expresa la actividad celulasa. Además del dominio catalítico, la molécula de la celulasa puede comprender uno o varios dominios de fijación a la celulosa (CBD, por su nombre en inglés), también denominados dominios/módulos de fijación a los glúcidos (CBD/CBM, por su nombre en inglés), que pueden estar localizados en el extremo amino o bien el extremo carboxilo del dominio catalítico. Los CBD tienen actividad de fijación a los glúcidos y facilitan la acción enzimática sobre los sustratos sólidos. El núcleo catalítico y el CBD están conectados típicamente a través de una región conectora flexible y muy glucosilada.

- Las celulasas que atacan principalmente la superficie de la fibra son especialmente útiles para el lavado a la piedra de la tela vaquera teñida con tinte índigo, ya que el tinte se localiza en la superficie de la fibra. Las celulasas aplicadas en el tratamiento de la tela vaquera se dividen normalmente en dos grupos principales: celulasas ácidas y neutras. Las celulasas ácidas funcionan típicamente a pH de 4,0 a 5,5, y las celulasas neutras en el margen de pH de 6 a 8. Las celulasas ácidas se utilizan en especial para el bioacabado (desfrisado) y también para el tratamiento de la tela vaquera (bioapedreo), mientras que las celulasas neutras se utilizan típicamente en las aplicaciones de la tela vaquera.

- Las endoglucanasas (EG) son uno de los tres tipos de celulasas que se necesitan por lo general para la conversión biológica de la celulosa en glucosa. Algunas endoglucanasas que se producen de forma natural tienen un dominio de fijación a la celulosa (CBD, por su nombre en inglés) mientras que otras no. Las endoglucanasas se utilizan ampliamente en las industrias textil, de detergentes, de bioetanol y papelera.

- Las celulasas, entre ellas las endoglucanasas, se pueden clasificar en diferentes familias de glucosilhidrolasas de acuerdo con su secuencia primaria, apoyado por el análisis de la estructura tridimensional de algunos miembros de la familia (Henrissat 1991, Henrissat y Bairoch 1993, 1996). Por ejemplo, las familias de las glucosilhidrolasas 5, 7, 12 y 45 contienen endoglucanasas. La mayoría de las celulasas ácidas textiles pertenecen a la familia 5, mientras que la mayoría de las celulasas neutras textiles son de la familia 12 o 45.

El amplio espectro de los usos industriales de las endoglucanasas ha puesto de manifiesto que se necesitan productos comerciales de endoglucanasas que funcionen de la manera deseada en las condiciones deseadas, tales como los márgenes de pH y de temperatura.

La mayoría de las enzimas utilizadas en la industria funcionan mejor a temperaturas elevadas, lo normal es que sea aproximadamente a más de 50 °C, pero por razones de ahorro energético, la mayor firmeza del color y que las prendas se encojan menos, se necesitan enzimas con un buen funcionamiento a temperaturas más bajas, a saber, a menos de 50 °C, por ejemplo, aproximadamente de 30 a 40 °C o incluso de 20 a 40 °C. Tales enzimas activas en frío

5 se han descrito, p. ej., en las bacterias, en especial en *Bacillus*. Sin embargo, la producción de las enzimas bacterianas para aplicaciones industriales es complicada y laboriosa en comparación con la producción de las enzimas de hongos. Todavía se sabe muy poco acerca de las posibles endoglucanasas fúngicas activas en frío.

Que nosotros sepamos, hasta ahora no se ha descrito ninguna endoglucanasa de la familia 45 que actúe en frío.

10 En la patente de los EE. UU. n.º 5.610.129 se describe una endoglucanasa de la familia Cel45, en la que se describen composiciones inhibidoras de la transferencia del tinte que contienen una celulasa de *Humicola insolens* kd43. No se describen sus propiedades térmicas.

No se ha propuesto el uso de las enzimas Cel45 de *Gibberella zeae* en el acabado de los tejidos.

15 En la patente de los EE. UU. n.º 7.256.032 se describen celulasas Cel45 que funcionan bien para el acabado de los tejidos. El funcionamiento para el acabado de la tela vaquera es óptimo a 60 °C y la temperatura más baja medida es de 40 °C, en la que se observa menos del 50% de la actividad óptima.

En la patente de los EE. UU. 2005/070003 describen preparaciones de celulasas que funcionan bien, p. ej., en composiciones para el lavado de ropa, en el biopulido de tejidos recién fabricados, y a la hora de proporcionar un aspecto desgastado a las telas celulósicas. Ninguna de las enzimas descritas parece funcionar de manera ventajosa a temperaturas bajas.

20 Así pues, hay una necesidad continua de celulasas nuevas y ventajosas que tengan las propiedades y los termogramas deseados. La presente invención satisface esta necesidad.

Shimonaka et al (*Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, vol. 70, n.º 4, abril de 2006 (2006-04), págs. 1013-1016) describen varias endoglucanasas de la familia 45 (entre otras, MCE1 y MCE2) que tienen su temperatura óptima más baja que la de las otras endoglucanasas de la familia 45. También se describe la utilidad para los

25 procedimientos de lavado de ropa.

Breve descripción de la invención

La presente invención da a conocer ahora nuevas endoglucanasas de la familia cel45 que muestran un termograma único al funcionar bien también a temperaturas bajas. Las propiedades térmicas únicas significan que no se observa ninguna disminución notable del funcionamiento cuando la temperatura está por debajo de 50 °C, p. ej.,

30 aproximadamente 40 °C, aproximadamente 30 °C o incluso aproximadamente 20 °C. Las endoglucanasas son útiles en diferentes aplicaciones de las celulasas, tales como el tratamiento de las telas, en especial el tratamiento de la tela vaquera y el desfrisado. Al contrario que las enzimas de desfrisado previamente descritas, que por lo general son celulasas ácidas, las nuevas endoglucanasas funcionan bien también a un pH relativamente neutro. Esto permite el tratamiento de bioacabado a la vez que el teñido, lo que conlleva unos ahorros considerables. De igual

35 forma, la fijación del color es a menudo mejor en las condiciones neutras.

La presente invención da a conocer un polipéptido de endoglucanasa de hongos que pertenece a la familia 45 de las glucosilhidrolasas y que muestra un funcionamiento sustancial a bajas temperaturas. La invención además da a conocer una preparación de enzimas que comprende dicha endoglucanasa, y composiciones detergentes y de pienso para consumo animal que comprenden dichas enzimas o preparación de enzimas.

40 En particular, la invención se refiere a las endoglucanasas que comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 65% con la SEQ ID n.º 13, una identidad de secuencia de al menos el 90% con la SEQ ID n.º 17 o una identidad de secuencia de al menos el 90% con la SEQ ID n.º 19.

La invención se refiere además a un polinucleótido aislado seleccionado del grupo que consiste en:

- 45 a) una secuencia de nucleótidos que tiene la SEQ ID n.º 12, 16, o 18, o una secuencia que codifica el polipéptido de endoglucanasa descrito más arriba,
- b) una cadena complementaria de a), o
- c) una secuencia que está degenerada como resultado del código genético para cualquiera de las secuencias de a) o b).

50 La invención se refiere además a un vector de expresión que comprende dicho polinucleótido, a una célula hospedadora que comprende dicho vector de expresión y a una cepa de *E. coli* que tiene un número de acceso DSM 18916, DSM 19173 o DSM 18915.

Aún más, la invención da a conocer un método para la producción del polipéptido de endoglucanasa, que comprende las etapas de transformar una célula hospedadora con un vector de expresión que codifica dicho polipéptido y cultivar dicha célula hospedadora en las condiciones que permiten la expresión de dicho polipéptido, y facultativamente recuperar y purificar dicho polipéptido.

- 5 Finalmente, la invención da a conocer un procedimiento para tratar el material celulósico, en donde dicho procedimiento comprende poner en contacto el material celulósico con el polipéptido de la endoglucanasa o la preparación enzimática de la invención.

- Las realizaciones específicas de la invención se presentan en las reivindicaciones adjuntas. Otros objetos, detalles y ventajas de la presente invención serán evidentes a partir de los dibujos, de la descripción detallada y de los ejemplos que vienen a continuación. Sin embargo, se debe saber que las realizaciones dadas en la descripción, en los dibujos y en los ejemplos solo tienen propósitos ilustrativos, y que se pueden realizar diferentes cambios y modificaciones dentro del alcance de las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

- 15 La figura 1 es un dibujo esquemático de los casetes de expresión utilizados para la transformación de los protoplastos de *Trichoderma reesei* para sobreproducir las proteínas recombinantes de Cel45.

En la figura 2A se muestran los pH óptimos de las preparaciones de proteínas recombinantes de Cel45A, y en la figura 2B se muestra la estabilidad térmica de las preparaciones de proteínas recombinantes de Cel45A.

En las figuras 3A-E se muestran los termogramas de las nuevas preparaciones de Cel45 en comparación con las preparaciones comerciales de Cel45 para el tratamiento de la tela vaquera.

- 20 En las figuras 4A-B se muestra el funcionamiento de las nuevas preparaciones de Cel45 a pH diferentes para el tratamiento de la tela vaquera.

En la figura 5 se muestra el funcionamiento de Gp_RF6293_Cel45 en el tratamiento de bioacabado (eliminación de pelusas) a 40 °C en comparación con la muestra de control sin la enzima.

Descripción detallada de la invención

- 25 La invención se basa en estudios en los que se cribó un colección de cultivos de hongos por la actividad celulolítica a bajas temperaturas. Se cultivaron cepas fúngicas a 20 °C durante 3 a 7 días en distintos medios de producción. Se recuperaron los sobrenadantes y se comparó la actividad celulolítica sobre la carboximetilcelulosa (CMC) y sobre la hidroxietilcelulosa (HEC) a temperaturas de 30 °C y 50 °C para cribar los termogramas con temperaturas bajas. Las cepas más favorables se analizaron luego en aplicaciones de bioapedreo a pequeña escala después del cultivo a 20 °C durante 4 a 7 días. Después del cribado preliminar, se seleccionaron cuatro cepas para la construcción de las genotecas genómicas, y las genotecas se cribaron además por los genes *cel45* con sondas amplificadas con cebadores degenerados. Los clones fágicos positivos se subclonaron en vectores bacterianos y se confirmaron por secuenciación antes de depositarlos en el DSMZ. Para la producción de las enzimas Cel45, los genes que codifican las actividades deseadas se fusionaron con el promotor *cbh1/cel7A* de *Trichoderma reesei*. La terminación de la transcripción se garantizó gracias a un terminador de *cbh1/cel7A* de *T. reesei*, y se utilizó un marcador *amdS* para cribar los clones positivos. Los casetes de expresión lineales se aislaron del esqueleto del vector y se introdujeron por transformación en los protoplastos de *T. reesei* en los que se habían delecionado las principales celulasas. Los transformantes purificados se cultivaron durante 7 días en el medio inductor de celulosa y se analizó la actividad endoglucanasa en el sobrenadante del cultivo. También se analizaron las propiedades térmicas y de pH. El material para la aplicación a gran escala se obtuvo mediante cultivos en el biorreactor de laboratorio a 28 °C durante 3 o 4 días, a lo que siguió la filtración y la concentración cuando era necesario.

- Los sobrenadantes del cultivo se analizaron en el tratamiento de la tela vaquera a diferentes temperaturas con dos preparaciones comerciales de cel45 como referencia en una lavadora. Se evaluó el efecto de bioapedreo resultante mediante la medición de la reflectancia del color. Sorprendentemente, se halló que los perfiles de temperatura medidos en la aplicación eran diferentes de los recibidos en la caracterización primaria en los tubos de ensayo. Además, las propiedades de pH de las muestras se analizaron en la aplicación a la tela vaquera. Además, el efecto de desfrisado/eliminación de pelusas en los vellones de algodón hilado se analizó en una lavadora con diferentes dosis de la enzima y se comparó con una muestra de la técnica anterior. Sorprendentemente, a una temperatura baja, se obtuvo una superficie libre de pelusa con una dosis inferior de lo que se cabría esperar basándose en los análisis del tratamiento de la tela vaquera.

La presente invención da a conocer nuevos polipéptidos de hongos de endoglucanasas de la familia 45 de las glucosilhidrolasas que funcionan sustancialmente a temperaturas bajas. Polipéptido y proteína, tal y como se utilizan en la presente memoria, son sinónimos.

«Fúngico» o «de hongos» en este contexto significa que la endoglucanasa o el polinucleótido que la codifica podrían

proceder de un hongo, y en especial de un hongo filamentoso, tal como *Geomyces* o *Fusarium*. De acuerdo con una realización específica de la invención, la endoglucanasa procede de *G. pannorum* o *F. cf. equiseti*, lo más preferiblemente de *G. pannorum* RF6293 (CBS 119567), *F. cf. equiseti* RF6318 (CBS 119568), *G. pannorum* RF6546 (CBS 119958) o *G. pannorum* RF6608 (CBS 119962).

- 5 La terminología «procedente de» en relación con una fuente de microorganismo significa que el polipéptido se puede producir de forma natural en dicha fuente de microorganismo específica, o que el polinucleótido que codifica el polipéptido se puede aislar de dicha fuente de microorganismo, y que facultativamente se puede expresar en una célula hospedadora en la que se ha introducido el polinucleótido, o una versión sintetizada del mismo, posiblemente con codones alternativos, de dicha fuente de microorganismo que codifica el polipéptido. Sin embargo, no se
10 descartan modificaciones menores de la secuencia, p. ej., mediante sustitución, delección y/o inserción de uno o unos pocos aminoácidos/nucleótidos siempre y cuando se conserve la actividad enzimática de la proteína codificada y secretada.

- «Endoglucanasa» («EG»), en relación con la presente invención, se refiere a las enzimas clasificadas como E. C. 3.2.1.4. Son la 1,4- β -D-glucán-4-glucanohidrolasas y catalizan la endohidrólisis de los enlaces 1,4- β -D-glucosídicos
15 en los polímeros de glucosa, tales como la celulosa. Algunas endoglucanasas pueden también hidrolizar, p. ej., enlaces 1,4 en los β -D-glucanos que también contienen enlaces 1,3. Por lo tanto, se pueden clasificar también como endo-1,3(4)- β -glucanasas (E.C. 3.2.1.6). Así pues, una enzima puede catalizar reacciones sobre distintos sustratos y puede pertenecer a varias clases. Las endoglucanasas de la invención pueden contener facultativamente una secuencia señal y uno o más dominios de fijación a celulosa (CBD) unidos al dominio/núcleo catalítico (CD).

- 20 «Familia 45 de las glucosilhidrolasas» se refiere a la familia de las glucosilhidrolasas que se definió en Henrissat 1991, y Henrissat y Bairoch 1993, 1996, que se incorporan en la presente memoria por referencia. El gen que codifica la celulasa de la familia 45 se denomina *cel45* y la proteína codificada se denomina Cel45.

- Las endoglucanasas de la invención muestran un funcionamiento sustancial a temperaturas bajas. «Funcionamiento sustancial» en este contexto significa que las enzimas funcionan de manera excelente cuando se aplican en al
25 menos un tipo de procedimiento de aplicación de la celulasa, tal como, p. ej., el bioapedreo y/o el bioacabado de los tejidos, o en el lavado. Los termogramas únicos de las nuevas endoglucanasas se pueden ilustrar por su «relación 30:50» en la aplicación a la tela vaquera, lo que indica un funcionamiento relativo (%) a 30 °C en comparación con 50 °C. Preferiblemente, la relación 30:50 es al menos del 72%, más preferiblemente al menos del 80% y lo más preferiblemente al menos del 90% o del 95%. Como alternativa, el termograma se puede ilustrar mediante una
30 relación «40:OT», que significa un funcionamiento relativo (%) a 40 °C en comparación con una temperatura óptima (OT). Preferiblemente, la relación 40:OT es al menos del 80%, más preferiblemente al menos del 90% y lo más preferiblemente al menos del 95%.

«Activa en frío» o «temperatura baja», tal y como se utilizan en la presente memoria, se refiere a una temperatura de ≤ 50 °C, en especial de ≤ 45 °C, preferiblemente de ≤ 40 °C, incluidas ≤ 30 °C.

- 35 De acuerdo con una realización de la invención, la endoglucanasa comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 65% con la SEQ ID n.º 13, una identidad de secuencia de al menos el 48% con la SEQ ID n.º 15, una identidad de secuencia de al menos el 87% con la SEQ ID n.º 17, una identidad de secuencia de al menos el 62% con la SEQ ID n.º 19, una identidad de secuencia de al menos el 59% con la SEQ ID n.º 21, o una identidad de secuencia de al menos el 49% con la SEQ ID n.º 23, o una fragmento enzimáticamente
40 activo de la misma. Preferiblemente, la endoglucanasa comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 90%, preferiblemente de al menos el 95% y lo más preferiblemente de al menos el 98% o el 99% con las SEQ ID n.ºs 13, 15, 17, 19, 21 o 23, o un fragmento enzimáticamente activo de las mismas.

- Tal y como se usa en el presente contexto, el término «identidad» se refiere a la identidad global entre dos
45 secuencias de aminoácidos comparada una con la otra desde el primer aminoácido codificado por el correspondiente gen hasta el último aminoácido. Para los propósitos de la presente invención, la identidad se determina preferiblemente por medio de programas informáticos conocidos mediante algoritmos estándares. Un ejemplo de tales programas es Clone Manager Suite, un programa que incluye la parte del programa Align Part y que vende Scientific & Educational Software, Durham, NC, EE. UU. De acuerdo con la presente invención, la versión
50 del programa «Clone Manager 7 Align Plus 5» que incluye las funciones «Comparar dos secuencias/Global/Comparar secuencias de ADN» se utilizó en especial para determinar el grado de identidad. En este caso, se utilizaron los algoritmos disponibles de las siguientes fuentes: Hirschberg, D. S. (1975) «A linear space algorithm for computing longest common subsequences», *Commun. Assoc. Comput. Mach.* 18: 341-343; Myers, E. W y W. Miller. (1988) «Optimal alignments in linear space», *CABIOS* 4: 1, 11-17; Chao, K. M., W. R. Pearson y W. Miller. (1992) «Aligning two sequences within a specified diagonal band», *CABIOS* 8: 5, 481-487. El experto en la técnica es consciente del hecho de que los resultados son comparativos solo cuando se alinean los correspondientes dominios de la secuencia. En consecuencia, la comparación de, p. ej., las secuencias de celulasa que incluyen los CBD o las secuencias señal con secuencias que carecen de estos elementos, se descartan por no ser significativas.

«Fragmento enzimáticamente activo» se refiere a una parte de una secuencia aminoacídica específica que es lo suficientemente larga para tener la actividad enzimática deseada. En otras palabras, un fragmento puede ser, p. ej., solo la parte madura del polipéptido o incluso una subsecuencia de la parte madura. Puede o no puede contener un conector y un dominio CBD. Más específicamente, actividad enzimática se refiere a la actividad celulasa que tiene la capacidad catalítica de hidrolizar la celulosa o los derivados de la misma, tales como la actividad endoglucanasa o la β -glucanasa. Además de la actividad endoglucanasa y/o β -glucanasa, algunas de las celulasas pueden tener además actividad hemicelulasa y/o xilanasa. La actividad enzimática se puede determinar como se describe en el ejemplo 1.

Los polinucleótidos de la invención pueden ser de ADN o bien de ARN. De acuerdo con una realización de la invención, las endoglucanasas están codificadas por un polinucleótido que tiene la SEQ ID n.º 12, 14, 16, 18, 20 o 22, o un fragmento del mismo lo suficientemente largo para codificar una endoglucanasa enzimáticamente activa. Preferiblemente, las endoglucanasas están codificadas por un polinucleótido similar al llevado por *E. coli* DSM 18916, DSM 19171, DSM 19173, DSM 18915, DSM 18917 o DSM 19170.

Las endoglucanasas de la invención son preferiblemente proteínas recombinantes. Se preparan con comodidad mediante la conocida, en términos generales, tecnología del ADN recombinante en un hospedador heterólogo u homólogo. Preferiblemente, la endoglucanasa se sobreexpresa en un hospedador fúngico. Brevemente, se clona el polinucleótido que codifica la endoglucanasa y se inserta en un vector de expresión, se transforma en una célula hospedadora y se expresa.

Un «vector de expresión» es un plásmido o vector de clonación capaz de expresar el ADN que codifica las proteínas de las endoglucanasas después de introducirlo por transformación en un hospedador deseado. Cuando se utiliza un hongo hospedador, el gen de interés se proporciona preferiblemente a un hongo hospedador como parte de un vehículo de clonación o de expresión que se integra en el cromosoma del hongo, o que permite que el gen de interés se integre en el cromosoma del hospedador. Otras secuencias que son parte del vehículo de clonación o del vehículo de expresión también se puede integrar con dicho ADN durante el proceso de integración. Además, en los hongos, el vector de expresión o partes del mismo pueden dirigirse específicamente a locus concretos. Como alternativa, el gen deseado se puede dar a conocer como un plásmido de replicación autónoma.

El ADN que codifica las proteínas de las endoglucanasas se coloca preferiblemente bajo el control de (a saber, operativamente unido a) determinadas secuencias de control, tales como las secuencias promotoras proporcionadas por el vector. Tras la transformación, estas secuencias de control se integran en el genoma hospedador con el gen de interés. Como alternativa, las secuencias de control pueden ser las que están en el sitio de integración.

Las secuencias de control de expresión de un vector de expresión variarán en función de si el vector está diseñado para expresar un gen determinado en un hospedador procariota o eucariota. Las secuencias de control de expresión pueden contener elementos reguladores de la transcripción, tales como promotores, elementos potenciadores y secuencias de terminación de la transcripción, y/o elementos reguladores de la traducción, tales como sitios de iniciación y terminación de la traducción.

Una molécula polinucleotídica, tal como el ADN, se dice que es capaz de expresar un polipéptido si contiene secuencias de control de la expresión, que contienen información para regular la transcripción, y tales secuencias están operativamente unidas a la secuencia nucleotídica, que codifica el polipéptido.

Una unión operable es una unión en la que una secuencia está conectada a una secuencia (o secuencias) reguladora(s) de tal modo que se coloca la expresión de la secuencia bajo la influencia o el control de la secuencia reguladora. Dos secuencias de ADN (tales como la secuencia de la región promotora unida al extremo 5' de la secuencia que codifica la proteína) se dice que están operativamente unidas si el funcionamiento del promotor da lugar a su transcripción.

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

En una realización preferida se construyen transformantes genéticamente estables, por medio de lo cual el ADN que codifica las proteínas se integra en el cromosoma del hospedador por transformación con un vector, que puede albergar secuencias que favorecen la integración de dicho vector en el cromosoma.

Las células que tienen integrado de forma estable en sus cromosomas el ADN que codifica las proteínas de las endoglucanasas se pueden seleccionar, p. ej., mediante el marcador o marcadores introducidos, homólogos o heterólogos, que permiten la selección de las células hospedadoras que contienen el vector de expresión en el cromosoma, por ejemplo, el marcador puede proporcionar resistencia a los biocidas, p. ej., resistencia a los antibióticos, o a metales pesados, tales como cobre, o marcadores que complementan una mutación auxotrofa en el cromosoma del hospedador y similares. El marcador de selección puede, por ejemplo, ser un gen de selección directamente unido a las secuencias de ADN del gen a expresar, o haber sido introducido en la misma célula mediante cotransformación. También se pueden utilizar otros sistemas de selección.

Una vez que se prepara el vector de expresión que contiene el ADN que codifica la endoglucanasa, se introduce en una célula hospedadora adecuada mediante alguno de los diferentes medios idóneos, entre ellos la transformación, como se conoce en la técnica. Después de la transformación, las células receptoras normalmente se hacen crecer en un medio selectivo adecuado, que permite seleccionar las células transformadas por su crecimiento.

- 5 Los sistemas hospedadores de expresión y producción adecuados son, por ejemplo, el sistema de producción desarrollado para los hongos hospedadores *Trichoderma* (patente europea EP 244.234) o *Aspergillus*, tales como *A. oryzae* o *A. niger* (solicitudes de patente internacional WO 97/08325 y WO 95/33386, patentes de los EE. UU. n.^{os} 5.843.745 y 5.770.418) o el sistema de producción desarrollado para *Fusarium*, tal como *F. oxysporum* (Malardier et al., 1989) o *Chrysosporium lucknowense*. De acuerdo con una realización preferida de la invención, se pueden
- 10 utilizar cepas hospedadoras parcialmente deficientes en celulasa y/o hemicelulasa y/o proteasa. Los sistemas de producción idóneos desarrollados para las bacterias incluyen un sistema de producción desarrollado para *Bacillus*, por ejemplo, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*, o para *E. coli*, o para un actinomiceto *Streptomyces*. Los sistemas de producción idóneos desarrollados para las levaduras son los sistemas desarrollados para *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Pichia pastoris* o *Hansenula*. También se pueden utilizar los sistemas de
- 15 producción en otros microorganismos, entre ellos los microorganismos fermentativos consolidados para la producción de bioetanol, o en las células de mamíferos o en las plantas.

La expresión de la secuencia o secuencias génicas clonadas da lugar a la producción de la proteína deseada o a la producción de un fragmento de esta proteína. Esta expresión puede tener lugar de una manera continua en las células transformadas o de una manera controlada.

- 20 Para obtener las preparaciones enzimáticas de la invención, los hospedadores que tienen las propiedades deseadas (es decir, hospedadores capaces de expresar cantidades económicamente factibles de las proteínas endoglucanásicas) se cultivan en las condiciones adecuadas, y las enzimas deseadas se secretan preferiblemente desde los hospedadores hacia el medio de cultivo y, facultativamente, se recuperan de dicho medio de cultivo mediante los métodos conocidos en la técnica. Preferiblemente, el hospedador para tal producción es un hongo
- 25 filamentoso, tal como *Trichoderma* o *Aspergillus*, y en especial *T. reesei*.

Tal y como se usa en el presente contexto, «preparación enzimática» se refiere a cualquier producto con enzimas, que contiene al menos una de las nuevas endoglucanasas descritas en la presente memoria. Así pues, tal preparación enzimática puede ser un medio de cultivo agotado o un filtrado. Medio de cultivo agotado hace referencia al medio de cultivo del hospedador que comprende las enzimas producidas. Preferiblemente, las células

30 hospedadoras se retiran de dicho medio después de la producción. Si se desea, tales preparaciones pueden estar liofilizadas o si no, la actividad enzimática se concentra y/o estabiliza para la conservación. Si se necesita, una enzima deseada se puede aislar y purificar adicionalmente de acuerdo con los métodos convencionales, tales como filtración, extracción, precipitación, cromatografía, cromatografía de afinidad, electroforesis o similares.

- No obstante, es una ventaja de la invención que el medio de cultivo con o sin células hospedadoras se pueda utilizar
- 35 como una preparación enzimática como tal sin purificarla más, ya que las proteínas de las endoglucanasas se pueden secretar al medio de cultivo y presentar actividad en las condiciones ambientales del medio de cultivo agotado. Las preparaciones enzimáticas son muy económicas por la manera de suministrarse y de usarse, ya que no se necesita aislar del medio de cultivo ninguna enzima específica.

- Además de una o varias proteínas de endoglucanasas, las preparaciones enzimáticas pueden comprender una o
- 40 varias enzimas, que pueden ser, por ejemplo, otras celulasas, amilasas, lipasas, proteasas, hemicelulasas, xilasas, pectinasas y/u oxidasas, tales como lacasas, peroxidasas y catalasas. Como alternativa, antes, durante o después del tratamiento con la proteína de endoglucanasa se puede realizar otro tratamiento enzimático. El tratamiento enzimático puede comprender, por ejemplo, uno o varios tratamientos con amilasas (p. ej., para eliminar el apresto de la tela vaquera), uno o varios tratamientos con celulasa y/o uno o varios tratamientos con peroxidasa y/o lacasa.
- 45 Dependerá de la aplicación el que se incluyan otras enzimas en la preparación enzimática, o que se utilicen en el tratamiento enzimático.

- Además de la proteína de endoglucanasa, la preparación enzimática puede contener aditivos, tales como estabilizantes, tamponantes, conservantes, tensioactivos y/o componentes de medios de cultivo. Los aditivos
- 50 preferidos son los que se utilizan habitualmente en las preparaciones enzimáticas que se han diseñado para la aplicación, en donde se utiliza la preparación enzimática.

- Las preparaciones enzimáticas se pueden dar a conocer como un líquido o como un sólido, por ejemplo, como un polvo seco o granular, en especial los gránulos que no desprenden polvo, o un líquido estabilizado. Se contempla que las preparaciones enzimáticas se puedan enriquecer además para satisfacer los requisitos de una utilidad
- 55 específica en las diferentes aplicaciones, p. ej., en la industria textil. Una mezcla de actividades enzimáticas secretadas por un hospedador puede ser ventajosa en una aplicación industrial concreta, por ejemplo, en el bioacabado y el bioapedreo.

Las proteínas de las endoglucanasas y las preparaciones de las mismas son útiles, p. ej., en las aplicaciones sobre

telas, pienso y alimentos, p. ej., aplicaciones de horneado, en la hidrólisis de biomasa, p. ej., en la producción del bioetanol, y en las industrias de aceite vegetal, de detergentes y papeleras. Se pueden utilizar para tratar cualquier material celulósico, tal como un material textil, plantas o material de origen vegetal utilizado para alimentos o para pienso para consumo animal, material vegetal para la extracción de aceite o para la pasta por medios químicos o mecánicos, o para la fibra secundaria. También se pueden añadir en detergentes, p. ej., para mejorar las propiedades de cuidado de las telas al evitar el frisado, impedir el agrisamiento, pérdida del color y suavizado, y para mejorar el efecto de limpieza de la tela, por ejemplo, la retirada de la suciedad. Las composiciones detergentes suelen contener además auxiliares, tales como surfactantes (tensioactivos aniónicos, no iónicos, catiónicos y anfóliticos), aditivos reforzantes de la detergencia y otros ingredientes optativos, tales como los agentes que impiden la redeposición y los que suspenden la suciedad, abrillantadores, blanqueantes, tintes y pigmentos e hidrolasas.

En el presente contexto, «material celulósico» se refiere a cualquier material que comprende celulosa o derivados de la misma como un componente significativo. El material celulósico se pone en contacto con una cantidad eficaz de la proteína en las condiciones idóneas, tales como el pH y la temperatura adecuados, y se deja continuar la reacción durante un tiempo suficiente para que tenga lugar la reacción enzimática. Las endoglucanasas descritas se utilizan preferiblemente en un margen de temperatura de aproximadamente 20 a 50 °C y más preferiblemente de aproximadamente 30 a 50 °C. Las temperaturas útiles son ≤ 50 °C, por ejemplo ≤ 45 °C, o en algunos casos ≤ 40 °C o incluso ≤ 30 °C. Un margen de pH adecuado es de aproximadamente 3 a 9, preferiblemente de aproximadamente 4 a 8, y en especial de aproximadamente 5 a 6,5.

Las endoglucanasas son especialmente útiles para el tratamiento de los materiales textiles, tales como las telas y prendas o los hilos. El material textil se puede fabricar de fibras que contienen celulosa natural o de fibras que contienen celulosa fabricada por el hombre o mezclas de las mismas, o una mezcla de fibras sintéticas y fibras que contienen celulosa. Preferiblemente, el material que contiene celulosa es algodón, en especial la tela vaquera. Por «tela vaquera» se quiere decir, en relación con esta invención, tejido de tela vaquera, normalmente prendas de tela vaquera, en particular tejanos. Ventajosamente, la tela vaquera es tela vaquera teñida con índigo. La tela vaquera también se puede tratar con derivados del índigo o con el índigo junto con algún otro tinte, por ejemplo, tela vaquera teñida con índigo con fondo de azufre.

Las endoglucanasas descritas son especialmente útiles en la industria textil, preferiblemente en el bioapedreado y el bioacabado.

El lavado a la piedra tiene tres etapas: desaprestado, abrasión y tratamiento posterior. La primera etapa, el procedimiento de desaprestado es normalmente el primer tratamiento húmedo de los tejanos y significa la retirada del almidón u otros agentes de apresto normalmente aplicados a la urdimbre de hilos para impedir que se dañe durante el procedimiento de trenzado. Se utilizan las α -amilasas para retirar los agentes de apresto que llevan almidón para un procedimiento húmedo mejorado y uniforme. Después del desaprestado, los tejanos se enjuagan normalmente con agua o se hacen pasar directamente a la etapa de abrasión.

La segunda etapa, la abrasión, se puede realizar con enzimas o con piedra pómez, o con ambas. En todos los casos, se necesita la acción mecánica para retirar el tinte y el tratamiento se realiza normalmente en lavadoras, como las lavadoras de tambor. La terminología «desgastado» hace referencia al aspecto de la tela vaquera, cuando ha sido tratado con enzimas celulásicas o con piedras, o con ambas. Son expresiones sinónimas «aspecto de lavado a la piedra» o «aspecto deshilachado». Como resultado de la retirada desigual del tinte, hay contraste entre las áreas teñidas y las áreas de las cuales se ha retirado el tinte.

La abrasión va seguida por lo general de una tercera etapa, el tratamiento posterior, que incluye las etapas de lavado y enjuague durante las cuales se pueden utilizar detergentes, abrillantadores ópticos, blanqueantes o suavizantes. Después del tratamiento enzimático, para impedir que se dañen los materiales tratados, la reacción se debe parar, por ejemplo, mediante la inactivación por temperatura y/o pH, en donde lo último comprende un enjuague y/o lavado exhaustivos del detergente. Esto asegura que la fuerza mecánica de la fibra no se comprometa más por la presencia continua de la enzima.

Tal y como se usa en el presente contexto, la expresión «bioapedreado» de la tela o prenda significa el uso de enzimas en lugar de, o además de, la piedra pómez para el tratamiento del tejido o prenda, en especial de la tela vaquera.

Tal y como se menciona más arriba, el tratamiento con la celulasa puede reemplazar completamente el tratamiento con la piedra pómez. Sin embargo, el tratamiento con celulasas también se puede combinar con el tratamiento con la piedra pómez, cuando se desea producir un acabado muy desgastado.

Además, las endoglucanasas son útiles para el bioacabado de las telas y prendas. El «bioacabado» (también denominado desfrisado, eliminación de pelusas, desbarbado o biopolido) se refiere al uso de enzimas en una hidrólisis controlada de fibras celulósicas para modificar la superficie de la tela o hilo de una manera que impide permanentemente la tendencia a frisarse, mejora el tacto de la tela, como la suavidad y la tersura, aclara la estructura de la superficie al reducir la formación de pelusas, lo que da lugar a una mayor definición de los colores y

también puede mejorar la capacidad de drapeado, absorción de la humedad y la capacidad de tinción del tejido.

Otros usos incluyen el uso en composiciones detergentes para mejorar las propiedades de cuidado de las telas al impedir el frisado, impedir el agrisamiento, definir del color y suavizar, y para mejorar el efecto de limpieza de la tela, por ejemplo, la retirada de la suciedad.

- 5 El desfrisado enzimático se puede realizar en cualquier etapa durante el procesamiento húmedo del tejido, preferiblemente después del desaprestado y/o blanqueamiento, y se pueden utilizar condiciones similares a las del bioapedreado. De igual manera, se pueden tratar los textiles en forma de prenda.

- 10 La relación de baño (la relación del volumen de líquido por peso de tela) en el bioapedreado y el bioacabado puede oscilar de aproximadamente 3:1 a 20:1, preferiblemente de 5:1 a 10:1. El tiempo de tratamiento puede oscilar entre 15 min y 90 min, y preferiblemente de 30 min a 60 min. Hay que resaltar que la dosis de la enzima depende enormemente del tipo de tela, maquinaria, condiciones del procedimiento (pH, temperatura, relación de baño, duración del tratamiento, carga de tela vaquera, escala del procedimiento) y del tipo de preparación enzimática y similares. El experto en la técnica es capaz de definir las dosis y las condiciones idóneas.

- 15 El procedimiento de la invención para tratar el material celulósico también abarca la hidrólisis de material lignocelulósico para, p. ej., la producción de bioetanol. Un ejemplo de uso de bioprocedimiento consolidado (CBP, por su nombre en inglés) en la hidrólisis del material lignocelulósico se describe, p. ej., en van Zyl et al. en *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 2007; 108: 205-35.

La invención se ilustra además mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplos

- 20 Ejemplo 1. Cribado en busca de las cepas que expresan actividad celulolítica a baja temperatura

- 25 A aproximadamente 180 cepas de hongos de la colección de cultivos Roal Oy se les analizó su capacidad para producir una actividad celulolítica a temperatura baja. Las cepas de hongos se cultivaron en un volumen de 100 ml en un agitador rotatorio (200 rpm) a 20 °C de temperatura durante 3 a 7 días. Se analizaron varios medios de producción que contienen celulosa Solka Floc como fuente de carbono. Después del cultivo, se recogieron por centrifugación las células y otros sólidos, y se recuperó el sobrenadante. Si no se iba a usar inmediatamente, la preparación se conservó en alícuotas a -20 °C.

Para la estimación de la actividad enzimática a temperaturas más bajas, se realizaron ensayos de la preparación del cultivo en matraz con agitación a 30 °C y 50 °C durante 1 hora. A todos los sobrenadantes de matraces con agitación se les analizaron las siguientes actividades:

- 30 La actividad endoglucanasa (CMCasa):

Se ensayó con carboximetilcelulosa (CMC) al 3% (p/v) de sustrato en el tampón de citrato a 50 mM, esencialmente como describieron Bailey y Nevalainen 1981; Haakana et al., 2004. Los azúcares reductores se midieron con el reactivo de DNS. El ensayo se realizó a pH 5,0 así como a pH 7,0.

La actividad endoglucanasa (HEC):

- 35 Se ensayó con hidroxietilcelulosa (HEC) al 1% (p/v) de sustrato en el tampón de citrato a 50 mM, esencialmente como describieron Bailey y Nevalainen 1981. Los azúcares reductores se midieron con el reactivo de DNS. El ensayo se realizó a pH 5,0 así como a pH 7,0.

- 40 Las preparaciones de sobrenadantes de cultivo de las cepas se analizaron en una aplicación de bioapedreado a pequeña escala en un Launder Ometer® LP-2 como sigue. Aproximadamente 7,2 g de pedazos (12 × 12 cm) de tela vaquera desaprestada se cargaron con bolas de acero en contenedores de 1,2 l que contienen 100 ml del tampón de Mc Ilvaine y 100 ml del sobrenadante de cultivo, y el Launder Ometer se hizo funcionar a 30 °C durante 120 min. Después del lavado alcalino y con el detergente, se enjuagaron cuidadosamente las muestras de tejido con agua tibia y se secaron al aire. Los resultados se evaluaron tanto de forma visual como midiendo el color como valores de reflectancia (datos sin mostrar).

- 45 Después del cribado preliminar, se eligieron cuatro cepas (*Geomyces pannorum* RF6293, RF6546 y RF6608, y *Fusarium cf. equiseti* RF6318) para más estudios de aplicación. Con ese propósito, las cepas RF6546 y RF6608 se cultivaron en un volumen de 200 ml en un agitador rotatorio (200 rpm) a una temperatura de 20 °C durante 4 a 7 días en un medio que contiene (g/l): celulosa Solka Floc 10,0, polvo de maíz fermentado 1,5, harina de soja 0,5, CaCO₃ 0,5, (NH₄)₂HPO₄ 1,5, KH₂PO₄ 2,0, MgSO₄·H₂O 0,5, NaCl 0,5, NH₄NO₃ 0,5, Tween-80 0,5, solución de elementos traza n.º 1 0,5, solución de elementos traza n.º 2 0,5, aceite de parafina 0,5; el pH se ajustó a 6,4. Solución de elementos traza n.º 1 (mg/l): MnSO₄ 1,6, ZnSO₄·H₂O 3,45, CoCl₂·H₂O 2,0; solución de elementos traza n.º 2 (mg/l): FeSO₄·H₂O 5,0. Las cepas RF6293 y RF6318 se cultivaron en un volumen de 200 ml en un agitador rotatorio (200

rpm) a una temperatura de 20 °C durante 4 a 6 días en un medio que contiene (g/l): celulosa Solka Floc 30,0, polvo de maíz fermentado 9,0, harina de soja 1,5, CaCO₃ 1,5, (NH₄)₂HPO₄ 4,5, KH₂PO₄ 6,0, MgSO₄·H₂O 1,5, NaCl 0,5, NH₄NO₃ 1,5, Tween-80 0,5, solución de elementos traza n.º 1 0,5, solución de elementos traza n.º 2 0,5, aceite de parafina 0,5; el pH se ajustó a 6,4. Solución de elementos traza n.º 1 (mg/l): MnSO₄ 1,6, ZnSO₄·H₂O 3,45, CoCl₂·H₂O 2,0; solución de elementos traza n.º 2 (mg/l): FeSO₄·H₂O 5,0.

Ejemplo 2. Clonación de los genes de las endoglucanasas de *Geomyces pannorum* RF6293, RF6546, RF6608, y de *Fusarium cf. equiseti* RF6318

Se utilizaron métodos estándares de biología molecular para el aislamiento y los tratamientos enzimáticos del ADN (plásmidos, fragmentos de ADN), para las transformaciones de *E. coli*, etc. Los métodos básicos utilizados se describen en los manuales estándares de biología molecular, p. ej., Sambrook et al. (1989) y Sambrook y Russell (2001).

Se utilizó el vector Lambda DASH®II/*Bam*HI (Stratagene, EE. UU.) para la construcción de las genotecas genómicas de *Geomyces pannorum* RF6293, RF6546, RF6608, y de *Fusarium cf. equiseti* RF6318 de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Los ADN cromosómicos, aislados mediante el método de Raeder y Broda (1985) se digirieron parcialmente con *Sau*3A. Los ADN digeridos se fraccionaron según el tamaño y los fragmentos del tamaño elegido (5-20 kb) se ligaron con los brazos del vector lambda digerido con *Bam*HI. Las mezclas de ligación se empaquetaron con los extractos de empaquetamiento Gigapack III Gold de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Stratagene, EE. UU.). Los títulos de las genotecas genómicas construidas se presentan en la tabla 1.

Tabla 1. Título de las genotecas genómicas construidas

Cepa	Título de la genoteca genómica ufc/ml ($\times 10^6$)	Título de la genoteca genómica amplificada ufc/ml ($\times 10^8$)
<i>Geomyces pannorum</i> RF6293	0,38	100,0
<i>Geomyces pannorum</i> RF6546	0,04	6
<i>Geomyces pannorum</i> R6608	0,04	0,3
<i>Fusarium cf. equiseti</i> RF6318	0,46	60,0

Las genotecas genómicas de *Geomyces pannorum* RF6293, RF6546, RF6608, y de *Fusarium cf. equiseti* RF6318 se cribaron con las sondas que se amplificaron por PCR con cebadores degenerados y el ADN genómico como molde. Las secuencias de los cebadores heterólogos se basaron en las secuencias de endoglucanasa conservadas (tabla 2, SEQ ID n.ºs 1 a 5). Las secuencias conservadas se identificaron mediante el alineamiento de las secuencias de aminoácidos previamente publicadas de *Humicola grisea* var. *thermoidea* AB003107, *Fusarium oxysporum* L2938, *Melanocarpus albomyces* AJ515703 y *Gibberella zeae* AY342397. Las mezclas de reacción para PCR contenían Tris-HCl a 10 mM, pH 8,8, KCl a 50 mM, Triton X-100 al 0,1%, MgCl₂ a 1,5 mM, dNTPs a 0,1 mM, 1 µM de cada cebador y 1-2 unidades de la ADN polimerasa Dynazyme II (Finnzymes, Finlandia), y 0,5-1 µg de ADN genómico. Las condiciones para las reacciones de PCR fueron las siguientes: desnaturalización inicial de 5 min a 95 °C, seguida de 30 ciclos de 1 min a 95 °C, 30 s de alineamiento a 52,5 °C (gradiente de $\pm 7,5$ °C), extensión de 1 min a 72 °C y una extensión final a 72 °C durante 5 min. Los moldes de ADN genómico utilizados en las reacciones de PCR se recogen en la tabla 3.

Tabla 2. Los oligonucleótidos degenerados ensayados como cebadores de PCR para amplificar sondas para el cribado de los genes de las endoglucanasas de *Geomyces pannorum* RF6547, RF6546, RF6608, y de *Fusarium cf. equiseti* RF6318

Oligonucleótido	Longitud (pb)	Secuencia ^(a)	SEQ ID n.º
Cel45_S1	20	TAYTGGGAYTGYTGYAARCC (s)	1
Cel45_S2	17	TGGTGYTGYGCNTGYTA (s)	2
Cel45_AS1	17	TARCANGCRCARCACCA (as)	3

Oligonucleótido	Longitud (pb)	Secuencia ^(a)	SEQ ID n.º
Cel45_AS2	17	GTRCANCRCRTCAADAT (as)	4
Cel45_AS3	23	TTRTCSGCRTTYTGRAACCARTC (as)	5

^(a) D = A o G o T, R = A o G, S = C o G, N = A o G o T o C, Y = T o C; “s” entre paréntesis = hebra sentido, “as” entre paréntesis = hebra antisentido.

- Los productos de ADN que tienen los tamaños esperados (estimados a partir de las secuencias de endoglucanasa publicadas) se obtuvieron de varias reacciones. Los fragmentos de ADN de los tamaños esperados se aislaron a partir de las reacciones de PCR más específicas y se clonaron en el vector pCR® 4-TOPO® (Invitrogen, EE. UU.). Los insertos se caracterizaron por secuenciación y mediante la realización de hibridaciones de transferencia Southern con los ADN digeridos con varias enzimas de restricción. Los fragmentos de PCR, que se eligieron para ser utilizados como sondas para escrutar las genotecas genómicas de *Geomyces pannorum* RF6293, RF6546, RF6608, y de *Fusarium cf. equiseti* RF6318 se presentan en la tabla 3.

Tabla 3. Los cebadores utilizados en las reacciones de PCR y las sondas elegidas para el cribado de los genes de las endoglucanasas de las genotecas genómicas de *Geomyces pannorum* RF6293, RF6546, RF6608, y de *Fusarium cf. equiseti* RF6318. Se muestra el ADN molde genómico y el nombre del plásmido que contiene el fragmento de la sonda.

Gen	Cebador directo	Cebador inverso	ADN genómico utilizado como molde en la reacción de PCR	Fragmento obtenido (kb)	SEQ ID n.º	Inserto en el plásmido
RF6293_cel45A	Cel45_S1	Cel45_AS3	RF6293	0,6 kb	6	pALK2038
RF6293_cel45B	Cel45_S1	Cel45_AS3	RF6289	0,6 kb	7	pALK2039
RF6318_cel45A	Cel45_S1	Cel45_AS3	RF6318	0,6 kb	8	pALK2047
RF6546_cel45A	Cel45_S1	Cel45_AS3	RF6546	0,6 kb	9	pALK2040
RF6608_cel45A	Cel45_S1	Cel45_AS3	RF6608	0,6 kb	10	pALK2042
RF6608_cel45B	Cel45_S1	Cel45_AS3	RF6608	0,6 kb	11	pALK2041

15

Las secuencias de aminoácidos deducidas de todas estas sondas tenían homología con varias secuencias de Cel45 publicadas (programa BLAST, versión 2.2.9 en el NCBI, el Centro Nacional para la Información y la Biotecnología; Altschul et al., 1990).

- Los insertos de los plásmidos recogidos en la tabla 3 se marcaron con digoxigenina de acuerdo con las instrucciones del proveedor (Roche, Alemania). Las genotecas genómicas amplificadas (de 1×10^5 a 6×10^5 calvas) se cribaron con los fragmentos de las sondas marcadas. La temperatura de hibridación para los filtros fue de 68 °C y los filtros se lavaron 2 veces 5 min a TA con SSC a 2×-SDS al 0,1% seguido de 2 veces 15 min a 68 °C con SSC a 0,1×-SDS al 0,1%. Se obtuvieron varias calvas positivas de cada una de las hibridaciones. Se purificaron cinco calvas que hibridaban fuertemente de cada escrutinio. Los ADN de los fagos se aislaron y caracterizaron mediante hibridaciones por transferencia Southern. Los fragmentos de restricción elegidos que se hibridan a la sonda se subclonaron en el vector pBluescript II KS+ y se secuenciaron las regiones relevantes de los clones.

- En total, se clonaron seis genes de *cel45*; uno de las cepas de *Geomyces pannorum* RF6546 y de *Fusarium cf. equiseti* RF6318, y dos de los genes de *cel45* de las cepas de *Geomyces pannorum*, RF6293 y RF6608. En la tabla 4 se resume la información de las sondas utilizadas para el cribado de los genes, los clones de fagos de los cuales se aislaron los genes, los fragmentos de restricción elegidos que contienen los genes completos con sus regiones promotora y terminadora, el nombre de los plásmidos y los números del depósito de DSM para las cepas de *E. coli* que llevan estos plásmidos.

30

Tabla 4. Las sondas utilizadas para clonar los genes de las endoglucanasas, el clon de fago y los subclones elegidos, el número de plásmido y el número del depósito de la correspondiente cepa de *E. coli*

Gen	Sonda utilizada en el cribado	Clon de fago	El fragmento subclonado en pBluscript II KS+	Plásmido n.º	Depósito de <i>E. coli</i> n.º
<i>Gp_RF6293_cel45A</i>	pALK2038	F78	3,5 kb <i>HindIII</i>	pALK2206	DSM 18916
<i>Gp_RF6293_cel45B</i>	pALK2039	F105	2,3 kb <i>XbaI</i>	pALK2221	DSM19171
<i>Fe_RF6318_cel45A</i>	pALK2047	F122	2,5 kb <i>EcoRI</i>	pALK2226	DSM 19173
<i>Gp_RF6546_cel45A</i>	pALK2040	F85	6,0 kb <i>NotI</i>	pALK2208	DSM 18915
<i>Gp_RF6608_cel45A</i>	pALK2042	F88	2,5 kb <i>XbaI</i>	pALK2207	DSM 18917
<i>Gp_RF6608_cel45B</i>	pALK2041	F108	9,0 kb <i>XbaI</i>	pALK2219	DSM 19170

5 La información relevante sobre los genes y las secuencias preteicas deducidas (SEQ ID n.ºs 12 a 23) se resume en la tabla 5 y en la tabla 6, respectivamente.

Tabla 5. El resumen sobre los genes de las endoglucanasas aislados de *Geomyces pannorum* RF6293, RF6546, RF6608, y de *Fusarium cf. equiseti* RF6318.

Gen	Longitud con intrones (pb) ^(a)	Región codificante (pb) ^(b)	N.º de intrones	Longitud de los intrones (pb)	SEQ ID n.º
<i>Gp_RF6293_cel45A</i>	1036	912	1	121	12
<i>Gp_RF6293_cel45B</i>	966	846	2	58,59	14
<i>Fe_RF6318_cel45A</i>	1162	1098	1	61	16
<i>Gp_RF6546_cel45A</i>	1028	912	1	113	18
<i>Gp_RF6608_cel45A</i>	1026	912	1	111	20
<i>Gp_RF6608_cel45B</i>	969	846	2	61, 59	22

^(a) Está incluido el codón de parada

^(b) No está incluido el codón de parada

10 Tabla 6. El resumen de las secuencias de aminoácidos deducidas de la secuencia de los genes de las endoglucanasas de *Geomyces pannorum* RF6293, RF6546, RF6608, y de *Fusarium cf. equiseti* RF6318

Proteína de endoglucanasa	N.º de aas	Longitud de ss NN ^(a)	CBD ^(b)	MM (Da) predicha, ss no incluida ^(c)	pl predicho (ss no incl)	SEQ ID n.º
<i>Gp_RF6293_Cel45A</i>	304	22	T247 a L282	28678	5,13	13
<i>Gp_RF6293_Cel45B</i>	282	26		27309	4,17	15
<i>Fc_RF6318_Cel45A</i>	366	20	A306 a N346	36284	8,25	17

Proteína de endoglucanasa	N.º de aas	Longitud de ss NN ^(a)	CBD ^(b)	MM (Da) predicha, ss no incluida ^(c)	pl predicho (ss no incl)	SEQ ID n.º
Gp_RF6546_Cel45A	304	22	T247 a L282	28762	4,93	19
Gp_RF6608_Cel45A	304	22	T247 a L282	28504	4,33	21
Gp_RF6608_Cel45B	282	26		30324	4,37	23

^(a) La predicción de la secuencia señal (ss) se hizo con el programa SignalP V3.0 (Nielsen et al., 1997; Bendtsen et al., 2004); el valor de NN se obtuvo mediante redes neurales.

^(b) El dominio de fijación a celulosa (CBD), en donde se indican los aminoácidos de la región del CBD. La secuencia señal predicha no estaba incluida.

5 ^(c) La predicción se hizo con la herramienta Compute pI/MW en el servidor ExpPASy (Gastelger et al., 2003).

Las comparaciones recíprocas de las secuencias deducidas de Cel45 a partir de las cepas de *Geomyces pannorum* RF6293, RF6546, RF6608, y de *Fusarium cf. equiseti* RF6318 se presentan en las tablas 7 y 8. Se muestran las secuencias de aminoácidos completas y el núcleo de las proteínas sin la región del CBD de las secuencias de Cel45 deducidas. Para determinar el grado de identidad se utilizó un programa de Clone Manager (versión 9) que incluye las funciones «Comparar dos secuencias/Global/Comparar secuencias como aminoácidos/matriz de ponderación BLOSUM62».

Tabla 7. Los valores de identidad (%) obtenidos del alineamiento de las secuencias de aminoácidos de Cel45 deducidas de *Geomyces pannorum* RF6293, RF6546 y RF6608, y de *Fusarium cf. equiseti* RF6318. Se alinearon las secuencias de aminoácidos completas, que incluía la secuencia señal.

	Gp_RF6293	Gp_RF6293	Fe_RF6318	Gp_RF6546	Gp_RF6608	Gp_RF6608
Proteína	Cel45A	Cel45B	Cel45A	Cel45A	Cel45A	Cel45B
Gp_RF6293_Cel45A	100	39	46	85	87	38
Gp_RF6293_Cel45B		100	30	40	38	89
Fe_RF6318_Cel45A			100	45	45	31
Gp_RF6546_Cel45A				100	87	38
Gp_RF6608_Cel45A					100	38
Gp_RF6608_Cel45B						100

15

Tabla 8. Los valores de identidad (%) obtenidos del alineamiento de las secuencias de aminoácidos de Cel45 deducidas de *Geomyces pannorum* RF6293, RF6546, RF6608, y de *Fusarium cf. equiseti* RF6318. Se alinearon las secuencias centrales, excluidas la secuencia señal y las regiones de conector-CBD.

	Gp_RF6293	Gp_RF6293	Fe_RF6318	Gp_RF6546	Gp_RF6608	Gp_RF6608
Proteína	Cel45A	Cel45B	Cel45A	Cel45A	Cel45A	Cel45B
Gp_RF6293_Cel45A	100	41	58	88	89	41
Gp_RF6293_Cel45B		100	39	42	42	89
Fe_RF6318_Cel45A			100	60	60	39
Gp_RF6546_Cel45A				100	92	42
Gp_RF6608_Cel45A					100	41
Gp_RF6608_Cel45B						100

20 La comparación de las secuencias de las endoglucanasas Cel45 deducidas de *Geomyces pannorum* RF6293, RF6546, RF6608, y de *Fusarium cf. equiseti* RF6318 con las secuencias encontradas en las bases de datos se muestra en las tablas 9A y 9B.

Tabla 9A. Secuencias que tienen la mayor identidad con las secuencias de las endoglucanasas deducidas de *Geomyces pannorum* RF6293, RF6546, RF6608, y de *Fusarium cf. equiseti* RF6318. Se alinearon las secuencias

aminoácidas completas, que incluían la secuencia señal. La búsqueda en la base de datos se realizó con BLAST (tblastn, base de datos nr/nt) y se utilizó el programa Clone Manager 9 (Comparar dos secuencias/Global/Comparar secuencias como aminoácidos/matriz de ponderación BLOSUM62) para determinar el grado de identidad.

Organismo y número de acceso	Identidad (%)
Gp_RF6293_Cel45A	100
<i>Neurospora crassa</i> , XM_952014	57
Gp_RF6293_Cel45B	100
<i>Pyrenophora tritici-repentis</i> , XM_001935986	47
Fe_RF6318_Cel45A	100
<i>Gibberella zeae</i> , AY342397	86
<i>Gibberella zeae</i> , XM_382834	86
Gp_RF6546_Cel45A	100
<i>Neurospora crassa</i> , XM_952014	57
Gp_RF6608_Cel45A	100
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , XM_001597582	58
Gp_RF6608_Cel45B	100
<i>Pyrenophora tritici-repentis</i> , XM_001935986	48

5

Tabla 9B. Secuencias de publicación de patente que tienen la mayor identidad con las secuencias de las endoglucanasas deducidas de *Geomyces pannorum* RF6293, RF6546, y de *Fusarium cf. equiseti* RF6318. Se alinearon las secuencias de aminoácidos completas, incluida la secuencia señal. Las búsquedas en las bases de datos del NCBI Chemical Abstracts Service (CAS) Registry System, DGECE y Patented Protein Sequences se realizó con BLAST y se utilizó el programa Clone Manager 9 (Comparar dos secuencias/Global/Comparar secuencias como aminoácidos/matriz de ponderación BLOSUM62) para determinar el grado de identidad.

Organismo y número de acceso	Identidad (%)
Gp_RF6293_Cel45A	100
US7256032, SEQ ID: 21	64
Fe_RF6318_Cel45A	100
US5610129 A, SEQ ID: 4	78
Gp_RF6546_Cel45A	100
US2005070003A1, SEQ ID: 6	61

Ejemplo 3. Producción de las proteínas Cel45 recombinantes en *Trichoderma reesei*.

Se construyeron los plásmidos de expresión para la sobreexpresión de las proteínas Cel45 recombinantes de *Geomyces pannorum* RF6293 y RF6546, y de *Fusarium cf. equiseti* RF6318 en *Trichoderma reesei*. Los plásmidos de expresión contruidos se recogen en la tabla 10. Los genes de cel45 recombinantes, incluidas sus propias secuencias señal, se fusionaron exactamente con el promotor *cbh1/cel7A* de *T. reesei* (p *cbh1*). La terminación de la transcripción se aseguró mediante el terminador de *cbh1/cel7A* de *T. reesei* (t *cbh1*) y se utilizó el gen marcador *amdS* de *A. nidulans* para seleccionar los transformantes, tal y como se describe en Paloheimo et al. (2003). Los casetes de expresión lineales (figura 1) se aislaron del esqueleto del vector después de la digestión con *NotI* y se introdujeron por transformación en los protoplastos de *T. reesei* A47 y/o A51 (en ambas cepas se han delecionado los genes que codifican las cuatro principales celulasas CBHI/Cel7A, CBHII/Cel6A, EGI/Cel7B y EGII/Cel5A). Las transformaciones se realizaron como en Penttilä et al. (1987) con las modificaciones descritas en Karhunen et al. (1993), seleccionando la acetamida como la única fuente de nitrógeno (gen marcador *amdS*). Los transformantes se

purificaron en las placas de selección por medio de un solo conidio antes de esporularlos en PD.

Tabla 10. Los casetes de expresión contruidos para sobreproducir las proteínas Cel45 de *Geomyces pannorum* RF6293 y RF6546, y de *Fusarium cf. equiseti* RF6318 en *Trichoderma reesei*. La estructura global de los casetes de expresión era como se describe en la figura 1. Los genes *cel45* clonados se fusionaron exactamente con el promotor *cbh1/cel7A* de *T. reesei*.

Proteína de endoglucanasa	Plásmido de expresión	Casete de expresión ^(a)	Terminador ^(b)
Gp_RF6293_Cel45A	pALK2215	8,6 kb <i>NotI</i>	196 pb (<i>MylI</i>)
Gp_RF6293_Cel45B	pALK2224	8,6 kb <i>NotI</i>	196 pb (<i>Sall</i>)
Fe_RF6318_Cel45A	pALK2230	8,9 kb <i>NotI</i>	335 pb (<i>EcoRI</i>)
Gp_RF6546_Cel45A	pALK2218	8,6 kb <i>NotI</i>	225 pb (<i>SspI</i>)

^(a) El casete de expresión para la transformación de *T. reesei* se aisló del esqueleto del vector mediante la digestión con *NotI*.

^(b) El número de nucleótidos después del codón de parada del gen recombinante clonado que se incluyó en el casete de expresión. El sitio de restricción en el extremo 3' del fragmento del gen genómico que se utilizó para la construcción del casete de expresión se indica entre paréntesis.

La producción de las endoglucanasas desde los transformantes se analizó a partir de los sobrenadantes de cultivo de los cultivos en matraces con agitación (50 ml). Los transformantes se hicieron crecer durante 7 días en un medio complejo inductor de la celulasa basado en la lactosa (Joutsjoki et al., 1993) tamponado con KH_2PO_4 al 5%. La actividad endoglucanasa se analizó con carboximetilcelulosa (CMC) al 3% (p/v) como sustrato en el tampón de citrato a 50 mM, de acuerdo con Bailey y Nevalainen 1981, y con Haakana et al., 2004. Los genotipos de los transformantes elegidos se confirmaron por transferencia Southern, en donde se incluyeron varias digestiones genómicas y se utilizó el correspondiente casete de expresión como sonda. La producción heteróloga de las proteínas de las endoglucanasas recombinantes se analizó por SDS-PAGE con la posterior tinción con Coomassie.

Las preparaciones enzimáticas recombinantes de Cel45A se caracterizaron en términos de la termoestabilidad y el pH óptimo. Los pH óptimos de las proteínas Cel45A sobreproducidas se determinaron en el tampón de McIlvaine universal dentro de un margen de pH de 4,0-8,0 con carboximetilcelulosa (CMC) al 3% (p/v) como sustrato (figura 2A). La estabilidad térmica de las proteínas endoglucanásicas recombinantes se determinó al medir la actividad CMCasa en el tampón de McIlvaine universal al pH óptimo con un tiempo de reacción de 1 h (figura 2B).

Los transformantes elegidos productores de endoglucanasa se cultivaron en los biorreactores de laboratorio a 28 °C en el medio indicado más arriba durante 3 o 4 días con control del pH de $4,4 \pm 0,2$ ($\text{NH}_3/\text{H}_3\text{PO}_4$) para obtener material para los ensayos de aplicación. Los sobrenadantes se recuperaron mediante centrifugación y se filtraron a través de los filtros Seitz-K 150 y EK (Pall SeitzSchenk Filtersystems GmbH, Bad Kreuznach, Alemania).

Ejemplo 4. Comportamiento de las proteínas Cel45 recombinantes en el tratamiento de la tela vaquera a diferentes temperaturas

A las proteínas Cel45 recombinantes producidas como se describe en el ejemplo 3 con el uso de *Trichoderma* como hospedador se les analizó su efecto en el bioapedreado de la tela vaquera a diferentes temperaturas para crear un aspecto desgastado similar al proporcionado por las piedras pómez. Se utilizaron las enzimas de Cel45 comerciales Ecoston®N400 (Roal Oy, Finlandia) y Denimax™ 399S (Novozymes) para la comparación.

Un par de tejanos hechos de tela vaquera asargada teñida con índigo que se compró a un proveedor inglés se utilizó como el principal material problema después del desaprestado con la α -amilasa ECOSTONE® A200, y 2 pares de tejanos Apache desaprestados (Labels Fashion Limited, GB) como material de relleno. Los tratamientos con la celulasa se realizaron con el extractor de lavadora Wascator FOM 71 CLS de Electrolux en las condiciones descritas en la tabla 11.

Tabla11. Los parámetros del procedimiento o las condiciones de la prueba que se utilizan en los tratamientos con la celulasa

Parámetro del procedimiento	
Carga de tela vaquera	1,6 kg
Agua	17 l
Tampón/control del pH (pH 6)	Ajustado con $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y ácido cítrico
Tiempo	55 min
Temperatura	20, 30, 40, 50 o 60 °C
Dosis de la celulasa	250-1500 UACN/g de tela

- Las enzimas se dosificaron como unidades de actividad de celulasa neutra (UACN) por peso de tejido. La actividad enzimática se midió como la liberación de azúcares reductores desde la carboximetilcelulosa (CMC al 3%) a 50 °C en tampón de Hepes a 50 mM, pH 7,0 (UACN, Haakana et al., 2004). Las proteínas Cel45 recombinantes se dosificaron como 1250 UACN/g de tejido, Ecoston®N400 1500 UACN/g de tejido y Denimax™ 399S 250 UACN/g. La dosificación de cada enzima era suficiente para dar unas diferencias fácilmente medibles/detectables (incremento de la luminosidad = $\Delta L^* > 2$ unidades) en todo el margen de temperaturas. Las enzimas se inactivaron después del secado incrementando el pH por encima de 11 al añadirles 4,2 g de NaOH (10 min, 40 °C) y enjuagarlas tres veces.
- Los tejidos se secaron en una secadora de tambor.

- El efecto de bioapedreado/nivel de abrasión del principal material problema se evaluó midiéndole el color como valores de reflectancia con un espectrofotómetro Minolta CM 2500 y el uso de las coordenadas espaciales de color $L^*a^*b^*$ (luminosidad D65/2°). El color del anverso y del reverso de la tela vaquera se midió después del desapeado (a saber, antes del tratamiento con la celulasa) y después del tratamiento con la celulasa. Cada medición del anverso de la tela vaquera era la media de aproximadamente 40 mediciones. Los perfiles de temperatura en la aplicación de la tela vaquera también se ilustraron mediante el cálculo del funcionamiento relativo (%) a 30 °C en comparación con 50 °C (relación 30:50) y el funcionamiento relativo (%) a 40 °C en comparación a una temperatura óptima (relación 40:TO). Los resultados se muestran en las tablas 12 a 14 y en la figura 3.

- Tabla 12. Termogramas de las preparaciones de Cel45 en el tratamiento de la tela vaquera. Los tratamientos con las preparaciones enzimáticas comerciales de Cel45 se utilizaron para la comparación.

Enzima	Temp. (°C)	ΔL^* relativo (%)
Gp_RF6293_Cel45A	60	54
Gp_RF6293_Cel45A	50	95
Gp_RF6293_Cel45A	40	100
Gp_RF6293_Cel45A	30	93
Gp_RF6293_Cel45A	20	65
Gp_RF6546_Cel45A	60	99
Gp_RF6546_Cel45A	50	100
Gp_RF6546_Cel45A	40	81

Enzima	Temp. (°C)	ΔL^* relativo (%)
<i>Gp</i> _RF6546_Cel45A	30	74
<i>Fe</i> _RF6318_Cel45A	50	96
<i>Fe</i> _RF6318_Cel45A	40	100
<i>Fe</i> _RF6318_Cel45A	30	76
<i>Fe</i> _RF6318_Cel45A	20	62
Ecostone® N400	60	100
Ecostone® N400	50	91
Ecostone® N400	40	75
Ecostone® N400	30	64
Denimax™ 399S	60	100
Denimax™ 399S	50	92
Denimax™ 399S	40	62
Denimax™ 399S	30	40

Tabla 13. Relaciones 30:50 y 40:TO calculadas de los termogramas de las nuevas enzimas Cel45 y de las preparaciones comerciales de Cel45

Enzima	Relación 30:50 (%)	Relación 40:TO (%)
<i>Gp</i> _RF6293_Cel45A	98	100
<i>Gp</i> _RF6546_Cel45A	74	81
<i>Fe</i> _RF6318_Cel45A	79	100
Ecostone® N400	70	75
Denimax™ 399S	43	62

- Los resultados de la tabla 12 y de la figura 3 muestran que las nuevas enzimas de Cel45 recombinantes tienen termogramas más bajos en la aplicación que las enzimas Cel5 comerciales Ecostone® N400 y Denimax™ 399S. *Gp*_RF6293_Cel45A muestra el funcionamiento óptimo en un margen de temperaturas muy amplio de 30 a 50 °C, lo cual resulta sorprendente, porque la temperatura óptima en las condiciones analíticas era notablemente más elevada (de 55 a 60 °C, figura 2B). El margen de temperatura óptima para *Gp*_RF6546_Cel45A y

Fe_RF6318_Cel45A es también más bajo que para las enzimas comerciales.

- 5 Tanto *Gp_RF6293_Cel45A* como *Fe_RF6318_Cel45A* funcionan mejor a 40 °C que a 50 °C, lo que es una propiedad única en comparación con otras enzimas que pertenecen a la familia de cel45, como las preparaciones comerciales utilizadas de referencia y que típicamente funcionan mejor a 50-60 °C. Los resultados de la tabla 13 muestran que las dos relaciones 30:50 y 40:TO son más favorables con estas nuevas endoglucanasas que con las preparaciones de Cel45 comerciales.

Los resultados de la tabla 14 muestran que con la enzima *Gp_RF6293_Cel45A* recombinante se puede obtener un efecto de bioapedreado/abrasión más elevado a una temperatura baja (30 °C) en comparación con las enzimas Cel45 comerciales.

- 10 Tabla 14. Mediciones del color del anverso de la tela vaquera tratada con la preparación de *Gp_RF6293_Cel45A* a 30 °C y pH 6. Los tratamientos con las preparaciones enzimáticas comerciales se utilizaron para la comparación. L* indica la luminosidad.

Enzima	Actividad/g de prenda	Antes del tratamiento con celulasa	Después del tratamiento con celulasa	ΔL^*
		L*	L*	
<i>Gp_RF6293_Cel45A</i>	1250 UACN/g	16,87	22,19	5,32
Ecostone® N400	1500 UACN/g	16,95	21,75	4,80
Denimax™ 399S	250 UACN/g	16,82	19,29	2,47
Denimax™ 399S	1250 UACN/g	16,82	21,36	4,54

- 15 Ejemplo 5. Comportamiento de las proteínas Cel45 recombinantes en el tratamiento de la tela vaquera a pH diferente

A las proteínas Cel45 recombinantes producidas como se describe en el ejemplo 3 mediante el uso de *Trichoderma* como hospedador se les analizó su efecto sobre el bioapedreado de la tela vaquera a pH diferente para crear un aspecto desgastado parecido al que proporcionan las piedras pómez.

- 20 El sistema problema para el bioapedreado era como en el ejemplo 4, salvo que se utilizó un lote diferente de tejanos y la temperatura fue de 40 °C y el pH de 5 a 7. También se evaluó el efecto del tratamiento de la celulasa como en el ejemplo 4.

Los resultados se presentan en la tabla 15 y en la figura 4, que muestran que el margen de pH óptimo para *Gp_RF6293_Cel45A* es de 5 a 6,5 y para *Fe_RF6318_Cel45A* es de 6 a 6,5.

- 25 Tabla 15. Mediciones del color del lado anverso de la tela vaquera tratada con las preparaciones de Cel45 recombinantes a pH diferentes a 40 °C. L* indica la luminosidad.

Enzima	pH	Antes del tratamiento con celulasa	Después del tratamiento con celulasa	ΔL^*
		L*	L*	
<i>Gp_RF6293_Cel45A</i>	5	16,70	22,33	5,63
<i>Gp_RF6293_Cel45A</i>	6	16,63	22,36	5,73
<i>Gp_RF6293_Cel45A</i>	6,5	16,75	22,2	5,45

<i>Gp</i> _RF6293_Cel45A	7	16,75	21,16	4,41
<i>Fe</i> _RF6318_Cel45A	5	16,55	19,5	2,95
<i>Fe</i> _RF6318_Cel45A	6	16,53	20,66	4,13
<i>Fe</i> _RF6318_Cel45A	6,5	16,47	20,22	3,75
<i>Fe</i> _RF6318_Cel45A	7	16,53	19,92	3,39

Ejemplo 6. Comportamiento de las proteínas Cel45 recombinantes en el bioacabado (desfrisado/desbarbado/eliminación de pelusas)

5 La capacidad de las proteínas Cel45 recombinantes producidas tal y como se describe en el ejemplo 3 mediante el uso de *Trichoderma* como hospedador se analizó en el desfrisado del género de punto de algodón y se comparó con la enzima Cel45 con unas propiedades excelentes con respecto al desfrisado (patente internacional WO2006/117432). Los tratamientos con la celulasa se realizaron con un extractor de lavado Wascator FOM 71 CLS de Electrolux en las condiciones descritas en la tabla 16.

10 Tres vellones de hilo hechos de algodón al 100% (tipo 9761, Orneule, Finlandia) se utilizaron como material problema con material de relleno. La tela primero se prelavó durante 10 min a 50 °C y se enjuagó 3 veces. Después de eso, la tela de punto de algodón se trató con la celulasa a 40 °C o 50 °C durante 60 minutos. Las enzimas se dosificaron como unidades de actividad de celulasa neutra (UACN) por el peso del tejido. Después del escurrido, se inactivó la enzima (durante 10 min a 60 °C) mediante el incremento del pH por encima de 11 con hidróxido de sodio. A continuación, el tejido se enjuagó tres veces y se secó en una secadora de tambor.

15 Tabla 16. Los parámetros del procedimiento/condiciones de la prueba que se utilizan en los tratamientos de bioacabado

Parámetro del procedimiento	
Carga de tela	1,0 kg
Agua	15 l
Ajuste del pH	Con ácido acético (80%)
Tiempo	60 min
Temperatura	40 °C/50 °C
Dosis de la celulasa	250 UACN/g de tela

20 Las muestras del género de punto se evaluaron visualmente de acuerdo con la cantidad detectada de fibrillas y pelusa superficiales. El resultado de cada evaluación se cuantificó mediante la indicación del resultado respecto a una escala que consiste en estándares. Estos estándares eran piezas de la misma tela lavada con diferentes cantidades de celulasa y tenían un margen de intensidad de fibrillas/pelusa superficiales de 1 a 5 con intervalos de media unidad. El número 0 era una muestra de control tratada sin la enzima. Cuanto mayor es el número, mejor es el efecto de desfrisado/desbarbado. El número 5 significa que se retiraron las fibrillas/pelusa superficiales. Los resultados se muestran en las tablas 17 y 18. Los resultados de las tablas 17 y 18 muestran que

25 *Gp*_RF6293_Cel45A, *Gp*_RF6546_Cel45A y *Fe*_RF6318_Cel45A tienen excelentes propiedades de desfrisado. Era sorprendente que *Gp*_RF6293_Cel45A fuera eficaz a una dosificación de la actividad mucho más baja a la hora del desfrisado/desbarbado que en el tratamiento de la tela vaquera en los ejemplos anteriores. También se encontró que el margen de pH más óptimo para *Gp*_RF6293_Cel45A para el desfrisado era de 5,5 a aproximadamente 7.

Una celulasa neutra que tiene excelentes propiedades de desfrizado, como la proteína *Gp_RF6293_Cel45A*, permite que el tratamiento de bioacabado se realice a la vez que la tinción.

Tabla 17. Los resultados de los tratamientos de bioacabado con las proteínas Cel45 recombinantes a 40 °C y pH 6

Enzima	Actividad/g de tejido	Evaluación
Cel45 (solicitud de patente internacional WO2006/117432)	250 UACN/g	3,5
<i>Gp_RF6293_Cel45A</i>	500 UACN/g	5
<i>Gp_RF6293_Cel45A</i>	250 UACN/g	4
<i>Gp_RF6293_Cel45A</i>	125 UACN/g	3

- 5 4-5 significa un efecto de desfrizado/eliminación de pelusas excelente, 3 un efecto de desfrizado/eliminación de pelusas bueno, 0 ningún efecto de desfrizado/eliminación de pelusas (tratamiento sin enzima).

Tabla 18. Los resultados de los tratamientos de bioacabado con las proteínas Cel45 recombinantes a 50 °C y pH 6

Enzima	g de tejido	Condiciones	Evaluación
Control	0	pH 6, 50 °C	0
<i>Gp_RF6293_Cel45A</i>	500 UACN/g	pH 6, 50 °C	5
<i>Gp_RF6546_Cel45A</i>	1000 UACN/g	pH 6, 50 °C	4
<i>Fe_RF6318_Cel45A</i>	1250 UACN/g	pH 6, 50 °C	5
<i>Fe_RF6318_Cel45A</i>	625 UACN/g	pH 6, 50 °C	4,5

Referencias

- Altschul SF, W Gish, W Miller, EW Myers and DJ Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215:403-410.
- Bailey M and Nevalainen H. 1981. Induction, isolation and testing of stable *Trichoderma reesei* mutants with improved production of solubilizing cellulase. *Enzyme Microb. Technol.* 3:153-157.
- Bendtsen JD, H Nielsen, G von Heijne and S Brunak. 2004. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J. Mol.Biol.* 340:783-795.
- Gasteiger E, A Gattiker, C Hoogland, I Ivanyi, RD Appel and A Bairoch. 2003. ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res.* 31:3784-3788.
- Haakana H, Miettinen-Oinonen A, Joutsjoki V, Mäntylä A, Suominen P and Vehmaanperä J. 2004. Cloning of cellulase genes from *Melanocarpus albomyces* and their efficient expression in *Trichoderma reesei*. *Enzyme Microb. Technol.* 34:159-167.
- Henrissat B. (1991) A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* 280: 309-316.
- Henrissat B. and Bairoch A. (1993) New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* 293: 781-788.
- Henrissat B. and Bairoch A. (1996).Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. *Biochem. J.* 316: 695-696.
- Joutsjoki, VV, TK Torkkeli and KMH Nevalainen. 1993. Transformation of *Trichoderma reesei* with the *Hormoconis resinae* glucoamylase P (*gamP*) gene: production of a heterologous glucoamylase by *Trichoderma reesei*. *Curr. Genet.* 24:223-228.
- Karhunen T, A Mäntylä, KMH Nevalainen and PL Suominen. 1993. High frequency one-step gene replacement in *Trichoderma reesei*. I. Endoglucanase I overproduction. *Mol. Gen. Genet.* 241:515-522.
- Malardier L, Daboussi MJ , Julien J, Roussel F, Scazzocchio C and Brygoo Y. 1989. Cloning of the nitrate reductase gene (*niaD*) of *Aspergillus nidulans* and its use for transformation of *Fusarium oxysporum*. *Gene* 15:147-156.

Needleman S. and Wunsch C. (1970) A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. *Journal of Molecular Biology* 48, 443-453.

Nielsen H, J Engelbrecht, S Brunak and G von Heijne. 1997. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Engineering* 10:1-6.

Nierstrasz V.A. and Warmoeskerken M.M.C.G. (2003) Process engineering and industrial enzyme applications. In: *Textile processing with enzymes*. A.Cavaco-Paulo and G.M.Gübitz (eds.) Woodhead Publishing Ltd, Cambridge. pp.120-157.

Rice P, Longden I and Bleasby A. (2000). EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite. *Trends in Genetics* 16:276-277.

Paloheimo M, A Mäntylä, J Kallio, and P Suominen. 2003. High-yield production of a bacterial xylanase in the filamentous fungus *Trichoderma reesei* requires a carrier polypeptide with an intact domain structure. *Appl. Env. Microbiol.* 69:7073-7082.

Penttilä M, H Nevalainen, M Rättö, E Salminen and J Knowles. 1987. A versatile transformation system for the cellulolytic filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Gene* 61:155-164.

Raeder U and P Broda. 1985. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Lett. Appl. Microbiol.* 1:17-20.

Sambrook J, EF Fritsch and T Maniatis. 1989. *Molecular cloning, a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, US.

Sambrook J and DW Russell. 2001. *Molecular cloning, a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, US.

van Zyl WH, Lynd LR, den Haan R, McBride JE. 2007 Consolidated bioprocessing for bioethanol production using *Saccharomyces cerevisiae*. *Adv Biochem Eng Biotechnol.*;108:205-35.

Secuencias

SEQ ID n.º	Secuencia
1	Cebador oligonucleotídico Cel45_S1
2	Cebador oligonucleotídico Cel45_S2
3	Cebador oligonucleotídico Cel45_AS1
4	Cebador oligonucleotídico Cel45_AS2
5	Cebador oligonucleotídico Cel45_AS3
6	Fragmento de PCR obtenido de <i>G. pannorum</i> RF6293 con los cebadores Cel45_S1 y Cel45_AS3
7	Fragmento de PCR obtenido de <i>G. pannorum</i> RF6289 con los cebadores Cel45_S1 y Cel45_AS3
8	Fragmento de PCR obtenido de <i>F. cf. equiseti</i> RF6318 con los cebadores Cel45_S1 y Cel45_AS3

SEQ ID n.º	Secuencia
9	Fragmento de PCR obtenido de <i>F. cf. equiseti</i> RF6546 con los cebadores Cel45_S1 y Cel45_AS3
10	Fragmento de PCR obtenido de <i>G. pannorum</i> RF6608 con los cebadores Cel45_S1 y Cel45_AS3
11	Fragmento de PCR obtenido de <i>G. pannorum</i> RF6608 con los cebadores Cel45_S1 y Cel45_AS3
12	Secuencia de nucleótidos del gen <i>cel45A</i> de <i>G. pannorum</i> RF6293
13	Secuencia de aminoácidos deducida de Cel45A de <i>G. pannorum</i> RF6293
14	Secuencia de nucleótidos del gen <i>cel45B</i> de <i>G. pannorum</i> RF6293
15	Secuencia de aminoácidos deducida de Cel45B de <i>G. pannorum</i> RF6293
16	Secuencia de nucleótidos del gen <i>cel45A</i> de <i>F. cf. equiseti</i> RF6318
17	Secuencia de aminoácidos deducida de Cel45A de <i>F. cf. equiseti</i> RF6318
18	Secuencia de nucleótidos del gen <i>cel45A</i> de <i>G. pannorum</i> RF6546
19	Secuencia de aminoácidos deducida de Cel45A de <i>G. pannorum</i> RF6546
20	Secuencia de nucleótidos del gen <i>cel45A</i> de <i>G. pannorum</i> RF6608
21	Secuencia de aminoácidos deducida de Cel45A de <i>G. pannorum</i> RF6608
22	Secuencia de nucleótidos del gen <i>cel45B</i> de <i>G. pannorum</i> RF6608
23	Secuencia de aminoácidos deducida de Cel45B de <i>G. pannorum</i> RF6608

Microorganismos depositados

Cepa depositada	Colección del cultivo	Fecha del depósito	Número de acceso
<i>Geomyces pannorum</i> RF6293	1)	7 de abril de 2006	CBS 119567
<i>Fusarium cf. equiseti</i> RF6318	1)	7 de abril de 2006	CBS 119568
<i>Geomyces pannorum</i> RF6546	1)	16 de junio de 2006	CBS 119958
<i>Geomyces pannorum</i> RF6608	1)	16 de junio de 2006	CBS 119962
Cepa de <i>E. coli</i> que incluye el plásmido pALK2206	2)	10 de enero de 2007	DSM 18916
Cepa de <i>E. coli</i> que incluye el plásmido pALK2221	2)	16 de marzo de 2007	DSM 19171
Cepa de <i>E. coli</i> que incluye el plásmido pALK2226	2)	16 de marzo de 2007	DSM 19173

ES 2 554 652 T3

Cepa de *E. coli* que incluye el 2)
plásmido pALK2208

10 de enero de 2007 DSM 18915

Cepa de *E. coli* que incluye el 2)
plásmido pALK2207

10 de enero de 2007 DSM 18917

Cepa de *E. coli* que incluye el 2)
plásmido pALK2219

16 de marzo de 2007 DSM 19170

- 1) Centraalbureau Voor Schimmelcultures en Upsalalaan 8, 3508 AD, Utrecht, Países Bajos.
- 2) Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Inhoffenstrasse 7B, D-38124 Braunschweig, Alemania.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> AB Enzymes Oy

5 <120> Endoglucanasas fúngicas, su producción y su uso

<130> 2081228PC

<160> 23

10 <170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 20

15 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador

20 <400> 1

taytgggayt gytgyaarcc 20

<210> 2

25 <211> 17

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

30 <223> cebador

<220>

<221> característica miscelánea

<222> (12)..(12)

35 <223> n es a, c, g, o t

<400> 2

tggtgytgyg cntgyta 17

40 <210> 3

<211> 17

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

45 <220>

<223> cebador

<220>

<221> característica miscelánea

50 <222> (6)..(6)

<223> n es a, c, g, o t

<400> 3

tarcangcrc arcacca 17

55 <210> 4

<211> 17

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

60 <220>

<223> cebador

<220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (6)..(6)
 5 <223> n es a, c, g, o t

 <400> 4
 gtrcancrrt craadat 17

 10 <210> 5
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 15 <220>
 <223> cebador

 <400> 5
 ttrtcsgrt tytgraacca rtc 23
 20
 <210> 6
 <211> 648
 <212> ADN
 <213> Geomyces pannorum
 25
 <400> 6
 tactgggact gctgcaaacc ctcttgccgc ttggtcaggca aggcctcatt caaaaccggt 60
 cccgtgcagt cctgtgacaa gggcgacaat gtgctgcgag acgcagacac caagtccgca 120
 tgcgacaacg gtggcccagc ctttatgtgc tccgatgaga gcccatgggc cgtctcagac 180
 agcctggcct atggattcgc tgcggtgtcc atatcggtg gcactgaggc gagctggtgc 240
 tgtgcttgc acgagttgac gttcacgagc ggcccagtgt caggcaagaa gatggtcgtg 300
 caggcgacaa atacgggtgg tgaccttggc cagaatcact ttgatatcgg cgtacgtata 360
 ccgtttctgt cctcgtcttt cttcttttcta cccctcgacg tcccttcaca tcccctctcc 420
 atcagctcct acacctcatt tatataagaa tccctcaact aaccaccacc agatgcccg 480
 cggcggtctt ggctctttca acgcctgcac tccccaatac ggcacgcctt ccaccggtg 540
 gggaaatcaa tacggcggcc tcacctcgcg gagccaatgc gacgccttcc ccaggccct 600
 caaagccggt tgctactgga ggttcgactg gttccaaaac gccgcaca 648

 <210> 7
 30 <211> 588
 <212> ADN
 <213> Geomyces pannorum

 <400> 7

ES 2 554 652 T3

tattgggatt gttgtaagcc gtcctgcggc tgggcccagaca aagcagactt cgtcgacaag 60
 tctccagtc aatcatgcga tatcaacgca aatccgctgc tggatgttac tcaggggacc 120
 ggttgcaatg gcggcaatgc gttcggatgt gcgtcgaact cgcctggtggc cgtcaatgac 180
 acgttctcct acggcttcgt gggcactttc ctcatctggcg gcgacgagtc cagctgggtgc 240
 tgcagctgct tccaattgaa ctttaccagc ggggcagtc aaggcaaate gatgattgtg 300
 caggcctcca acacgaatta cgattctcca gacgcgaatg tcttctactt tgggtgtatgt 360
 actcctttcc cgcgagattg ggagttacgc ccgtactaat gccttctatc agatacctgg 420
 tggaaataca agctatgctg gcgcttgtgc tatcgaatac aacgtctcag attctgtgtt 480
 cggcacggaa aacgtggggc tatctaatac caccgactgt gatgaccttc cgcgagcact 540
 gaagcctggt tgccagtggc ggttcgactg gttccagaat gcggataa 588

<210> 8

<211> 579

5 <212> ADN

<213> Fusarium cf. equiseti

<400> 8

tactgggact gctgcaaacc ttcttgcctt tggggcggca aggctaaagt caacgctccc 60
 gctctgactt gtgacaacaa ggacaacccc atcaccaaca ccaactctgt caacggttgt 120
 gaggggtggcg gttctgctta tgcttgcaac aactactctc cttggggcgt caacgacgat 180
 cttgtctatg gtttctactg tactaagctt gctggtggca ccgaggccag ctggtgctgt 240
 gcttggttatg cgtatgtctc agtcgctctg atacatcctc ccgtgttttc atgctaactg 300
 tatctctctc agtctcacct ttacgaccgg tccagtgaag ggcaagaaga tgattgtcca 360
 gtccaccaac actggaggcg atcttggtga caaccacttc gatcttatga tgcccgggcg 420
 cggagtcggt atcttcgacg gatgcacctc tcagttcgga aaggcccttg gtggtgctca 480
 gtacggcggc atctctctc gaagcgaatg tgatagcttc cccgagctgc tcaaggatgg 540
 gtgccactgg cgatttgact ggttccaaaa cgcgataa 579

10

<210> 9

<211> 638

<212> ADN

<213> Geomyces pannorum

15

<220>

<221> característica miscelánea

<222> (450)..(450)

<223> n es a, c, g, o t

20

<400> 9

ES 2 554 652 T3

tactgggact gctgcaaacc gtcttgccgc tggacaggca aggccaccct caccagcggc 60
cccgtgcagt cctgtgacaa gaacgacaac gtgctcgag acccagccac caagtccgca 120
tgcgacaatg gtggcccggc gttcatgtgc tcgaatgaga gtccgtgggc cgtctcggac 180
agtttggcgt atggatacgc cgcggtgtcg attgcgggtg gaacggaggc gagctggtgc 240
tgtgcttget acgagttgac gtttacgagc ggcccgggtg cgggcaagaa gatgattgtg 300
caggcgacta atacgggtgg tgatcttggc cagaatcact tcgatatcgg cgtgcgtatt 360
ccatttccct cgcctcttcc tacccttaa ctttctttca atactccttc ccaccagctt 420
ctgaaccgca tttatataag aatcacccan ctaacacccc ccagatgcc ggcgcgcgct 480
tcggcatctt caacgcctgc acccccctaat acggcaccct ctccgcgggc tggggcgccc 540
aatacggcgg catctcttcc cgcagccaat gcgacgcctt ccctgagaaa ctcaaggcgg 600
gatgctactg gcgcttcgac tggtttcaaa acgccgat 638

<210> 10

<211> 636

5 <212> ADN

<213> Geomyces pannorum

<400> 10

tactgggact gctgcaaacc gtccctgcgc tggacaggca aggcctcctt gacgagcggc 60
cccgtgcagg cctgtgacaa gaacgacaac gtgctcgccg acgcagatac caagtccgoc 120
tgcgacaacg gcggcccagc ctacatgtgc tctgatgaga gcccatgggc cgtctcggac 180
agcctggcgt atggatacgc cgcggtgtcg atcgcggggc ggacggaggc gagctggtgc 240
tgtgcctgct acgagttgac gtttacgagc ggcccgggtg ctggcaagaa gatgatcgtg 300
caggcgacga atacgggtgg tgaccttggc cagaatcaat tcgatctcgg cgtgcgtata 360
ccattcctcc ctcttcccc tcgaacgtcc cttcgcattc cccctccac cagttcctac 420
acctaattta cacacgaatt cccccccact aacgccccct agatgcccg cggcggcttc 480
ggcctcttca acgcctgcac cccccagtac ggcacgccct ccaccggctg gggcgcccaa 540
tacggcggtg tctcctcgcg gagccagtgc gacgccttcc ccacggccct caaagccggc 600
tgctactggc gcttcgactg gttccagaac gcggac 636

10

<210> 11

<211> 590

<212> ADN

<213> Geomyces pannorum

15

<400> 11

tactgggact gctgcaaacc gtccctgcgc tgggcccaga aagcagactt cgtcgacaag 60

ES 2 554 652 T3

tctccagtcc aatcatgcga taaaaacgca aatccgctgc tagataatto ccaggggact 120
 gggttgaatg gcggaatgc tttcggatgt gcgtcaaact cgccgtgggc cgttaatgac 180
 acgttctcct acggcttcgt gggcactttc ctcggtggcg gcgacgagtc tagctggtgc 240
 tgtagctgct accaattgaa ctttaccagc ggggcagtca agggcaaatac aatgattgtg 300
 caagcctcga acacgaatta cgattccccg aacgcgaatg tctttactct tgggtgtacgt 360
 tgctcattct tccccagagc gagcgagtca cgcccgctact aatgccattt atcagatacc 420
 tgggtgggaat actagctacg ctggcgcggtg tgctctcgaa tacagtgtcc caaatctctgt 480
 gttcggcacg gaaaaatgtg gcgtgtcaaa tcgcaccgac tgtgacaatac ttccccgcagc 540
 actgaagcct ggttgccagt ggcggttcga ctggttccag aatgcggcat 590

<210> 12

<211> 1036

5 <212> ADN

<213> Geomyces pannorum

<220>

<221> Intron

10 <222> (445)..(565)

<400> 12

atggctctct ccaagctcac tctcctagcc ctccctccctc tctttctcgc taccacctca 60
 ctgcgccctc caggcaatgg gaaaacaacc cgctactggg actgttgcaa gccctcctgc 120
 gcctggtcag gcaaggcctc attcaaaacc ggtcccgctg agtcctgtga caaggcgac 180
 aatgtgctcg cagacgcaga caccaagtcg gcattgcgaca acggtggccc agcctttatg 240
 tgctccgatg agagcccatg ggcggtctca gacagcctgg cctatggatt cgctgcggtg 300
 tccatatacg gtggcactga ggcgagctgg tgctgtgctt gctacgagtt gacgttcacg 360
 agcggcccag tgtcaggcaa gaagatggtc gtgcaggcga caaatacggg tggtgacctt 420
 ggccagaata actttgatat cggcgtagct ataccgtttc tgcctcgtc tttcttcttt 480
 ctaccctcgc acgtcccttc acatccctc tccatcagct cctacacctc atttatataa 540
 gaatccctca actaaccacc accagatgcc cggcgggcgc ttcggcctct tcaacgcctg 600
 cactcccca taaggcacgc ctccacccg ctgggggaaat caatacggcg gcctcacctc 660
 gcggagccaa tgcgacgcct tccccaggc cctcaaagcc ggttgcctact ggaggttcga 720
 ctggttccaa aacgccgaca acccttcgt cagcttcaag agcgttgctg gtccgctggc 780
 cctcacgaat aaatcggggt gtgtccgctc ggatgacacg ccaacgggag atggaaacgt 840
 gccaacagct agtggagtgg ccccgagcag ctcgacgagt gcggggacga cgacgcctgc 900
 gaccgggcca gggacaggag gagcgacagt ggcgaagtat gggcagtgtg gggggtcggg 960
 gtggacgggg ggaacgggtt gtgcgtctgg ctcgacttgc aaggcgacta accagtggta 1020
 15 ctgcagtgct ctgtaa 1036

<210> 13

<211> 304

<212> PRT

20 <213> Geomyces pannorum

ES 2 554 652 T3

<400> 13

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

Ala Thr Pro Ser Leu Ala Ala Ser Gly Asn Gly Lys Thr Thr Arg Tyr
20 25 30

Trp Asp Cys Cys Lys Pro Ser Cys Ala Trp Ser Gly Lys Ala Ser Phe
35 40 45

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

Asp Ala Asp Thr Lys Ser Ala Cys Asp Asn Gly Gly Pro Ala Phe Met
65 70 75 80

Cys Ser Asp Glu Ser Pro Trp Ala Val Ser Asp Ser Leu Ala Tyr Gly
85 90 95

Phe Ala Ala Val Ser Ile Ser Gly Gly Thr Glu Ala Ser Trp Cys Cys
100 105 110

Ala Cys Tyr Glu Leu Thr Phe Thr Ser Gly Pro Val Ser Gly Lys Lys
115 120 125

Met Val Val Gln Ala Thr Asn Thr Gly Gly Asp Leu Gly Gln Asn His
130 135 140

Phe Asp Ile Gly Met Pro Gly Gly Gly Phe Gly Leu Phe Asn Ala Cys
145 150 155 160

Thr Pro Gln Tyr Gly Thr Pro Ser Thr Gly Trp Gly Asn Gln Tyr Gly
165 170 175

Gly Leu Thr Ser Arg Ser Gln Cys Asp Ala Phe Pro Gln Ala Leu Lys
180 185 190

ES 2 554 652 T3

Ala Gly Cys Tyr Trp Arg Phe Asp Trp Phe Gln Asn Ala Asp Asn Pro
195 200 205

Ser Val Ser Phe Lys Ser Val Ala Cys Pro Leu Ala Leu Thr Asn Lys
210 215 220

Ser Gly Cys Val Arg Ser Asp Asp Thr Pro Thr Gly Asp Gly Asn Val
225 230 235 240

Pro Thr Ala Ser Gly Val Ala Pro Ala Ser Ser Thr Ser Ala Gly Thr
245 250 255

Thr Thr Pro Ser Thr Gly Pro Gly Thr Gly Gly Ala Thr Val Ala Lys
260 265 270

Tyr Gly Gln Cys Gly Gly Ser Gly Trp Thr Gly Gly Thr Val Cys Ala
275 280 285

Ser Gly Ser Thr Cys Lys Ala Thr Asn Gln Trp Tyr Ser Gln Cys Leu
290 295 300

<210> 14

<211> 966

5 <212> ADN

<213> Geomyces pannorum

<220>

<221> Intron

10 <222> (475)..(532)

<220>

<221> Intron

<222> (715)..(773)

15

<400> 14

atgacgaatc tatcaagatc cctacgccac accttcaccc tctctctctt tgetctcgtt 60

ttctccagtg ttgatgcgat atccgacgta tttgggccgt cactgcggt aacctcgcg 120

tattgggact gctgtaagcc gtcctgcggc tgggcccaca aaggagactt cgtcgacaag 180

tctccagtcc aatcgtgcga tatcaacgca aatccgctgc tggatgttac ccaggggacc 240

ggttgcaatg gcggcaatgc gttcggatgt gcgtcgaact cgcctggggc cgtcaatgac 300

acgttctcct acggettcgt gggcactttc ctcatggcg gcgacgagtc cagctgggtgc 360

tgcagctget tccaattgaa ctttaccage ggggcagtca aaggcaaata gatgattgtg 420

caggcctcca acacgaatta cgattcccca ggcgcgaatg tcttactct tgggtgatgt 480

actcctttct ccgcagattg agagttacgc ccgtactaat gccttctatc agatacctgg 540

ES 2 554 652 T3

tggaaataca agctatgctg ggcggtgtgc tatcgaatac aacgttccaa attctgtgtt 600
 cggcacggaa aacgtgggcg tatccaatcg caccgactgt gatgactttc ccgcagcact 660
 gaagcctggg tgccagtggc ggttcgactg gttcaaggac gccgtggagc caaagtgagt 720
 acctatttta acccattcca agattcgcgc gaaatctaac gtgggaatta cagtgttgag 780
 tataagcgcg tagcatgtcc gaaggttctc acggatatca cccactgcaa acgaaacgat 840
 gacgatacgg ttgacgaaga tgcgatcaag gcgaattcac catccgcagc ttcaacactg 900
 tcacgatgg gccccacagc tatcactgtg ctgtttatgt ggtggatgct acaaacgctc 960
 ggctaa 966

<210> 15

<211> 282

5 <212> PRT

<213> Geomyces pannorum

<400> 15

Met Thr Asn Leu Ser Arg Ser Leu Arg His Thr Phe Thr Leu Leu Leu
 1 5 10 15

Phe Ala Leu Val Phe Ser Ser Val Asp Ala Ile Ser Asp Val Phe Gly
 20 25 30

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

Cys Gly Trp Ala Asp Lys Gly Asp Phe Val Asp Lys Ser Pro Val Gln
 50 55 60

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

Gly Cys Asn Gly Gly Asn Ala Phe Gly Cys Ala Ser Asn Ser Pro Trp
 85 90 95

Ala Val Asn Asp Thr Phe Ser Tyr Gly Phe Val Gly Thr Phe Leu Ile
 100 105 110

Gly Gly Asp Glu Ser Ser Trp Cys Cys Ser Cys Phe Gln Leu Asn Phe
 115 120 125

Thr Ser Gly Ala Val Lys Gly Lys Ser Met Ile Val Gln Ala Ser Asn
 130 135 140

10

ES 2 554 652 T3

Thr Asn Tyr Asp Ser Pro Gly Ala Asn Val Phe Thr Leu Gly Ile Pro
145 150 155 160

Gly Gly Asn Thr Ser Tyr Ala Gly Ala Cys Ala Ile Glu Tyr Asn Val
165 170 175

Pro Asn Ser Val Phe Gly Thr Glu Asn Val Gly Val Ser Asn Arg Thr
180 185 190

Asp Cys Asp Asp Phe Pro Ala Ala Leu Lys Pro Gly Cys Gln Trp Arg
195 200 205

Phe Asp Trp Phe Lys Asp Ala Val Glu Pro Ser Val Glu Tyr Lys Arg
210 215 220

Val Ala Cys Pro Lys Val Leu Thr Asp Ile Thr His Cys Lys Arg Asn
225 230 235 240

Asp Asp Asp Thr Val Asp Glu Asp Ala Ile Lys Ala Asn Ser Pro Ser
245 250 255

Ala Ala Ser Thr Leu Ser Ser Met Gly Pro Thr Ala Ile Thr Val Leu
260 265 270

Phe Met Trp Trp Met Leu Gln Thr Leu Gly
275 280

<210> 16

<211> 1162

5 <212> ADN

<213> Fusarium cf. equiseti

<220>

<221> Intron

10 <222> (330)..(390)

<400> 16

atgcgttctt ttgctctcct cgccttagtc ggtcctcttg ccgtgagcgc tgcttctgga 60

agtggccact ctactcgata ctgggactgc tgcaagcctt cttgctcttg gagcggcaag 120

gctaaaagtca acgctccgc tctgacttgt gacaacaagg acaaccccat caccaacacc 180

aactctgtca acggttgatg ggggtggcgt tctgcttatg cttgcaccaa ctactctcct 240

tgggccgtca acgacgatct tgcctatggt ttcactgcta ctaagcttgc tgggtggcacc 300

gaggccagct ggtgctgtgc ttgttatgag tatgtctcag tgcctctgat acatcatccc 360

gtgttttcat gctaaactgta tctctctcag tctcaccttt acgaccggtc cagtgaaggg 420

ES 2 554 652 T3

```

caagaagatg attgtccagt ccaccaaacac tggaggcgat cttggtgaca accacttcga      480
tcttatgatg cccggcggcg gagtcggtat cttcgacgga tgcacctctc agttcggaaa      540
ggcccttggt ggtgctcagt acggcggcat ctcctctcga agcgaatgtg atagcttccc      600
cgagctgctc aaggatgggt gccactggcg atttgactgg ttcaagaacg cggacaaccc      660
tgacttcacc ttcgagcagg tccagtgcgc caaggaactc cttgctatta gtggttgcaa      720
gcgtgacgac gattccagct tccctgcctt cagtgggaac accacacca gcaaggctaa      780
gccgagtggg aagaagacta ctgctgctgc tcagcctcag aagaccgagc aggctgtccc      840
tgttgttcag aagccggctg ctactaagcc cgcctccgag cctgtcgttt ccaagcctgc      900
tgtctccaag cctgccgcgc cggacccac caaggttgtc agcaagccca agtcaacctc      960
aaaagtcggt ggaaccaaga ctacaagga ctgccctgcc actaagccaa ccaagccggc     1020
tgctccccag aagtctgctg tcgctatgta ctaccagtgc ggtggttcca agtcgccta     1080
ccccgatggc aacctccctt gcgcttcggg aagcaagtgt gtcaagatga acgattacta     1140
ctctcagtgt gtccccaact aa                                             1162

```

<210> 17

<211> 366

5 <212> PRT

<213> Fusarium cf. equiseti

<400> 17

Met Arg Ser Phe Ala Leu Leu Ala Leu Val Gly Pro Leu Ala Val Ser
1 5 10 15

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

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

Thr Cys Asp Asn Lys Asp Asn Pro Ile Thr Asn Thr Asn Ser Val Asn
50 55 60

Gly Cys Glu Gly Gly Gly Ser Ala Tyr Ala Cys Thr Asn Tyr Ser Pro
65 70 75 80

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

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

10

ES 2 554 652 T3

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

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

Gly Gly Gly Val Gly Ile Phe Asp Gly Cys Thr Ser Gln Phe Gly Lys
145 150 155 160

Ala Leu Gly Gly Ala Gln Tyr Gly Gly Ile Ser Ser Arg Ser Glu Cys
165 170 175

Asp Ser Phe Pro Glu Leu Leu Lys Asp Gly Cys His Trp Arg Phe Asp
180 185 190

Trp Phe Lys Asn Ala Asp Asn Pro Asp Phe Thr Phe Glu Gln Val Gln
195 200 205

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

Ser Ser Phe Pro Ala Phe Ser Gly Asn Thr Thr Pro Ser Lys Ala Lys
225 230 235 240

Pro Ser Gly Lys Lys Thr Thr Ala Ala Ala Gln Pro Gln Lys Thr Glu
245 250 255

Gln Ala Val Pro Val Val Gln Lys Pro Ala Ala Thr Lys Pro Ala Ser
260 265 270

Glu Pro Val Val Ser Lys Pro Ala Val Ser Lys Pro Ala Ala Ala Asp
275 280 285

Pro Thr Lys Val Val Ser Lys Pro Lys Ser Thr Ser Lys Val Gly Gly
290 295 300

Thr Lys Thr His Lys Asp Cys Pro Ala Thr Lys Pro Thr Lys Pro Ala
305 310 315 320

Ala Pro Gln Lys Ser Ala Val Ala Met Tyr Tyr Gln Cys Gly Gly Ser
325 330 335

Lys Ser Ala Tyr Pro Asp Gly Asn Leu Pro Cys Ala Ser Gly Ser Lys
340 345 350

Cys Val Lys Met Asn Asp Tyr Tyr Ser Gln Cys Val Pro Asn
355 360 365

- 5 <210> 18
- <211> 1028
- <212> ADN
- <213> Geomyces pannorum

- 10 <220>
- <221> Intron

<222> (445)..(557)

<400> 18

```

atggctctct ccaaacgcac cctcctcgcc ctccctccct tcttcctagc cgtccctcc 60
ctcgccgtct cgggcacagg caaaacaacc cgctactggg actgctgcaa gccgtcttgc 120
ggctggacag gcaaggccac cctcaccagc ggccccgtgc agtcctgtga caagaacgac 180
aacgtgctcg cagaccagag caccaagtcc gcatgogaca atggtggccc ggcgttcattg 240
tgctcgaatg agagtccgtg ggccgtctcg gacagtttgg cgtatggata cgccgcggtg 300
tcgattgcgg gtggaacgga ggcgagctgg tgctgtgctt gctacgagtt gacgtttacg 360
agcggcccgg tgcgggcaa gaagatgatt gtgcaggcga ctaatacggg tggatgacct 420
ggccagaatc acttcgatat cggcgtgcgt attccatttc cctcgccctt ttctaccctt 480
taactttctt tcaatactcc ttcccaccag cttctgaacc gcatttatat aagaatcacc 540
caactaacac ccccagatg ccggcgggcg gcttcggcat cttcaacgcc tgcaccccc 600
aatacggcac cccctccacc ggctggggcg cccaatacgg cggcatctct tcccgcagcc 660
aatgcgacgc cttccctgag aaactcaagg cgggatgcta ctggcgettc gactggttcc 720
agaacgccga caaccctct gtcagcttcc agagcgctgc ttgcccactg gctattacga 780
ataaatcagg ctgtgtgcgt gcggatgata agccgacggg gggtagggac gtgccgacgg 840
tgagcggggg tgctcctccg gcgacctcga cgggtccggg gacgacgacg ccatcgagtg 900
ggacggggaa tggggggacg gtggcgaagt atgcgcagtg tggggggaat gggtaggacg 960
gtggtacggt ttgtgaggcg gggtcgactt gcaaggctac taatgagtgg tatgcgcagt 1020
gcctgtaa 1028

```

5

<210> 19

<211> 304

<212> PRT

<213> Geomyces pannorum

10

<400> 19

```

Met Ala Leu Ser Lys Arg Thr Leu Leu Ala Leu Leu Pro Phe Phe Leu
1           5           10           15

```

ES 2 554 652 T3

Ala Val Pro Ser Leu Ala Val Ser Gly Thr Gly Lys Thr Thr Arg Tyr
 20 25 30
 Trp Asp Cys Cys Lys Pro Ser Cys Gly Trp Thr Gly Lys Ala Thr Leu
 35 40 45
 Thr Ser Gly Pro Val Gln Ser Cys Asp Lys Asn Asp Asn Val Leu Ala
 50 55 60
 Asp Pro Asp Thr Lys Ser Ala Cys Asp Asn Gly Gly Pro Ala Phe Met
 65 70 75 80
 Cys Ser Asn Glu Ser Pro Trp Ala Val Ser Asp Ser Leu Ala Tyr Gly
 85 90 95
 Tyr Ala Ala Val Ser Ile Ala Gly Gly Thr Glu Ala Ser Trp Cys Cys
 100 105 110
 Ala Cys Tyr Glu Leu Thr Phe Thr Ser Gly Pro Val Ser Gly Lys Lys
 115 120 125
 Met Ile Val Gln Ala Thr Asn Thr Gly Gly Asp Leu Gly Gln Asn His
 130 135 140
 Phe Asp Ile Gly Met Pro Gly Gly Gly Phe Gly Ile Phe Asn Ala Cys
 145 150 155 160
 Thr Pro Gln Tyr Gly Thr Pro Ser Thr Gly Trp Gly Ala Gln Tyr Gly
 165 170 175
 Gly Ile Ser Ser Arg Ser Gln Cys Asp Ala Phe Pro Glu Lys Leu Lys
 180 185 190
 Ala Gly Cys Tyr Trp Arg Phe Asp Trp Phe Gln Asn Ala Asp Asn Pro
 195 200 205
 Ser Val Ser Phe Gln Ser Val Ala Cys Pro Leu Ala Ile Thr Asn Lys
 210 215 220
 Ser Gly Cys Val Arg Ala Asp Asp Lys Pro Thr Gly Gly Gly Thr Val
 225 230 235 240
 Pro Thr Val Ser Gly Gly Ala Pro Pro Ala Thr Ser Thr Gly Pro Gly
 245 250 255
 Thr Thr Thr Pro Ser Ser Gly Thr Gly Asn Gly Gly Thr Val Ala Lys
 260 265 270
 Tyr Ala Gln Cys Gly Gly Asn Gly Trp Thr Gly Gly Thr Val Cys Glu
 275 280 285
 Ala Gly Ser Thr Cys Lys Ala Thr Asn Glu Trp Tyr Ala Gln Cys Leu
 290 295 300

ES 2 554 652 T3

<210> 20
 <211> 1026
 <212> ADN
 5 <213> Geomyces pannorum

<220>
 <221> Intron
 <222> (445)..(555)

10

<400> 20
 atggctctct ccaagctcac cctcctcgcc ctccctccct tcttcctcgc cgccccctcc 60
 ctgcccgtct cgggcaactgg ccaaacaacc cgctactggg actgctgcaa gccgtcctgc 120
 gcctggacag gcaaggcctc cttgacgagc ggccccgtgc aggcctgtga caagaacgac 180
 aacgtgctcg ccgacgcaga taccaagtcc gcctgcgaca acggcggccc agcctacatg 240
 tgctctgatg agagcccatg ggccgtctcg gacagcctgg cgtatggata cgccgcggtg 300
 tcgatcgcgg gcgggacgga ggcgagctgg tgctgtgcct gctacgagtt gacgtttacg 360
 agcggccccg tgtctggcaa gaagatgacg gtgcaggcga cgaatacggg tggtagacct 420
 ggccagaatc aattcgatct cggcgtgcgt ataccattcc tccctccttc ccctcgaacg 480
 tcccttcgca ttccccctc caccagttcc tacacctaat ttacacacga attccccccc 540
 actaacgccc cctagatgcc cggcggcgcc ttccggcctc tcaacgcctg cccccccaa 600
 tacggcacgc cctccaccgg ctggggcgcc caatacggcg gtatctcctc gcggagccag 660
 tgcgacgcct tccccacggc cctcaaagcc ggctgtact ggcgcttcga ctggttccag 720
 aacgccgaca acccgaccgt cagcttccag agcgtcgcgt gtccgctggc gctgacgaat 780
 aaatcgggct gcgtgcgcgc ggatgatacg ccgacgggga gtgggacggg gtcgacggcg 840
 agtgggggag gggcggtgag ctcgacgagt gcggggacga cgacgcgctc gagcgggacg 900
 gggactgggg gtgcgacggg ggcaagttt gggcagtgtg gggggtcggg gtggacgggg 960
 gggacgactt gtgcggctgg atcgacttgc caggtgaata accagtggta ttcgcagtgc 1020
 ttgtaa 1026

<210> 21
 15 <211> 304
 <212> PRT
 <213> Geomyces pannorum

<400> 21

ES 2 554 652 T3

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

ES 2 554 652 T3

Ser Gly Cys Val Arg Ala Asp Asp Thr Pro Thr Gly Ser Gly Thr Val
225 230 235 240

Ser Thr Ala Ser Gly Gly Gly Ala Val Ser Ser Thr Ser Ala Gly Thr
245 250 255

Thr Thr Pro Ser Ser Gly Thr Gly Thr Gly Gly Ala Thr Val Ala Lys
260 265 270

Phe Gly Gln Cys Gly Gly Ser Gly Trp Thr Gly Gly Thr Thr Cys Ala
275 280 285

Ala Gly Ser Thr Cys Gln Val Asn Asn Gln Trp Tyr Ser Gln Cys Leu
290 295 300

<210> 22

<211> 969

5 <212> ADN

<213> Geomyces pannorum

<220>

<221> Intron

10 <222> (475)..(535)

<220>

<221> Intron

<222> (718)..(776)

15

<400> 22

```
atgacgaatc tatcaaggtc cctacgccac atcttcgccg tctctctctt tgctctcggt 60
ttctctctgtg ttgatgctgt gtccgacgtg tttgggcoct ccaccgcggt aacatctcgg 120
tattgggact gctgcaagcc gtccctgcggc tgggcogaca aagcagactt cgtcgacaag 180
tctccagtc aatcatgcga taaaaacgca aatccgctgc tagataattc ccaggggact 240
ggttgcaatg gcggaatgc tttcgatgt gcgtcaaact cgccgtgggc cgttaatgac 300
acgttctcct acggcttcgt gggcactttc ctcggtggcg gcgacgagtc tagctggtgc 360
tgtagctgct accaattgaa cttaccagc ggggcagtcagg ggggcaaate aatgattgtg 420
caagcctcga acacgaatta cgattccccc aacgcgaatg tctttactct tgggtgtacgt 480
tgctcattct tccccagagc gagcgagtc cgcccgctact aatgccattt atcagatacc 540
tgggtgggaat actagctacg ctggcgcggtg tgctctcgaa tacagtgtcc caaattctgt 600
gttcggcacg gaaaatgtgg gcgtgtcaaa tcgcaccgac tgtgacaatc tccccgcagc 660
actgaagcct gggtgccagt ggcggttcga ctgggttcaag gacactgagg gaccaaagtg 720
agtacctatt ctaaccatt ttaacaatcc cccgttatct aacggtgaaa ttacagtgtc 780
gagtataagc gcgtgacatg cccaaagggt ctcacggata tcacccactg caaacgagag 840
gatgacgaaa gagtcgaaga agatgcgatc aaggccaatt caccatctgc ggcttcagca 900
ctgccgtcta tgggtccctac agctatctct gcaatattta tgtggtggat gctacaaaacg 960
ctcggtga
```

20

<210> 23

ES 2 554 652 T3

<211> 282
 <212> PRT
 <213> Geomyces pannorum

5 <400> 23
 Met Thr Asn Leu Ser Arg Ser Leu Arg His Ile Phe Ala Val Leu Leu
 1 5 10 15
 Phe Ala Leu Val Phe Ser Cys Val Asp Ala Val Ser Asp Val Phe Gly
 20 25 30
 Pro Ser Thr Ala Val Thr Ser Arg Tyr Trp Asp Cys Cys Lys Pro Ser
 35 40 45
 Cys Gly Trp Ala Asp Lys Ala Asp Phe Val Asp Lys Ser Pro Val Gln
 50 55 60
 Ser Cys Asp Lys Asn Ala Asn Pro Leu Leu Asp Asn Ser Gln Gly Thr
 65 70 75 80
 Gly Cys Asn Gly Gly Asn Ala Phe Gly Cys Ala Ser Asn Ser Pro Trp
 85 90 95
 Ala Val Asn Asp Thr Phe Ser Tyr Gly Phe Val Gly Thr Phe Leu Val
 100 105 110
 Gly Gly Asp Glu Ser Ser Trp Cys Cys Ser Cys Tyr Gln Leu Asn Phe
 115 120 125
 Thr Ser Gly Ala Val Lys Gly Lys Ser Met Ile Val Gln Ala Ser Asn
 130 135 140
 Thr Asn Tyr Asp Ser Pro Asn Ala Asn Val Phe Thr Leu Gly Ile Pro
 145 150 155 160
 Gly Gly Asn Thr Ser Tyr Ala Gly Ala Cys Ala Leu Glu Tyr Ser Val
 165 170 175

ES 2 554 652 T3

Pro	Asn	Ser	Val	Phe	Gly	Thr	Glu	Asn	Val	Gly	Val	Ser	Asn	Arg	Thr
			180					185					190		
Asp	Cys	Asp	Asn	Leu	Pro	Ala	Ala	Leu	Lys	Pro	Gly	Cys	Gln	Trp	Arg
		195					200					205			
Phe	Asp	Trp	Phe	Lys	Asp	Thr	Glu	Gly	Pro	Ser	Val	Glu	Tyr	Lys	Arg
	210					215					220				
Val	Thr	Cys	Pro	Lys	Val	Leu	Thr	Asp	Ile	Thr	His	Cys	Lys	Arg	Glu
225					230					235					240
Asp	Asp	Glu	Arg	Val	Glu	Glu	Asp	Ala	Ile	Lys	Ala	Asn	Ser	Pro	Ser
				245					250					255	
Ala	Ala	Ser	Ala	Leu	Pro	Ser	Met	Val	Pro	Thr	Ala	Ile	Ser	Ala	Ile
			260					265					270		
Phe	Met	Trp	Trp	Met	Leu	Gln	Thr	Leu	Gly						
	275						280								

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido de endoglucanasa de hongo, que pertenece a la familia 45 de las glucosilhidrolasas y que tiene un funcionamiento relativo (%) a 30 °C en comparación con 50 °C de al menos el 72% o un funcionamiento relativo (%) a 40 °C en comparación con la temperatura óptima de al menos el 80%, cuando se analiza en la aplicación sobre tela vaquera, y que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 65% con la SEQ ID n.º 13, una identidad de secuencia de al menos el 90% con la SEQ ID n.º 17, o una identidad de secuencia de al menos el 90% con la SEQ ID n.º 19.
2. El polipéptido de endoglucanasa de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 90%, preferiblemente al menos el 95% y lo más preferiblemente al menos el 98%, con la SEQ ID n.º 13, o que tiene una identidad de secuencia de al menos el 95% y preferiblemente al menos el 98% con la SEQ ID n.º 17, o que tiene una identidad de secuencia de al menos el 95%, preferiblemente al menos el 98%, con la SEQ ID n.º 19.
3. El polipéptido de endoglucanasa de acuerdo con la reivindicación 1, que procede de *Geomyces* o *Fusarium*, preferiblemente de *G. pannorum* o *F. cf equiseti*, lo más preferiblemente de RF6293 (CBS 119567), RF6318 (CBS 119568) o RF6546 (CBS 119958).
4. Un polinucleótido aislado seleccionado del grupo que consiste en:
 - a) una secuencia de nucleótidos que tiene la SEQ ID n.º 12, 16 o 18, o una secuencia que codifica el polipéptido de endoglucanasa de acuerdo con la reivindicación 1,
 - b) una hebra complementaria de a),
 - c) una secuencia degenerada, como resultado del código genético, con respecto a cualquiera de las secuencias de a) o b), o
 - d) un polinucleótido, que comprende un polinucleótido portado por *E. coli* DSM 18916, DSM 19173 o DSM 18915.
5. Un vector de expresión, que comprende un polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 4.
6. Una célula hospedadora, que comprende el vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 5.
7. Método para la producción de un polipéptido de endoglucanasa de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende las etapas de transformar una célula hospedadora con un vector de expresión que codifica dicho polipéptido y cultivar dicha célula hospedadora en las condiciones que permiten la expresión de dicho polipéptido, y facultativamente recuperar y purificar dicho polipéptido.
8. Una preparación enzimática, que comprende el polipéptido de endoglucanasa de acuerdo con la reivindicación 1.
9. Un procedimiento para tratar el material celulósico, en donde dicho procedimiento comprende poner en contacto el material celulósico con el polipéptido de endoglucanasa de acuerdo con la reivindicación 1, o la preparación enzimática de acuerdo con la reivindicación 8.
10. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, que se realiza a una temperatura de ≤ 50 °C, preferiblemente ≤ 40 °C.
11. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, que se realiza a un pH de aproximadamente 3 a 9, preferiblemente de 4 a 8 y más preferiblemente de 5 a 6,5.
12. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, que es bioapedreado, bioacabado, hidrólisis del material lignocelulósico, o una aplicación alimentaria.
13. Composición detergente, que comprende el polipéptido de endoglucanasa de acuerdo con la reivindicación 1 o la preparación enzimática de acuerdo con la reivindicación 8.
14. Pienso para consumo animal, que comprende el polipéptido de endoglucanasa de acuerdo con la reivindicación 1 o la preparación enzimática de acuerdo con la reivindicación 8.
15. Cepa de *E. coli* que tiene el número de acceso DSM 18916, DSM 19173 o DSM 18915.

Fig. 1

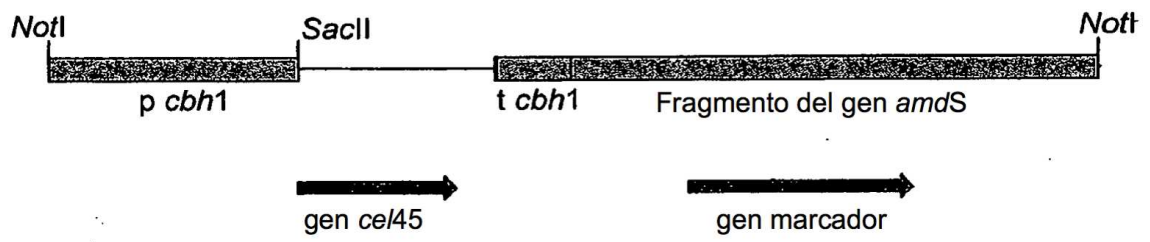
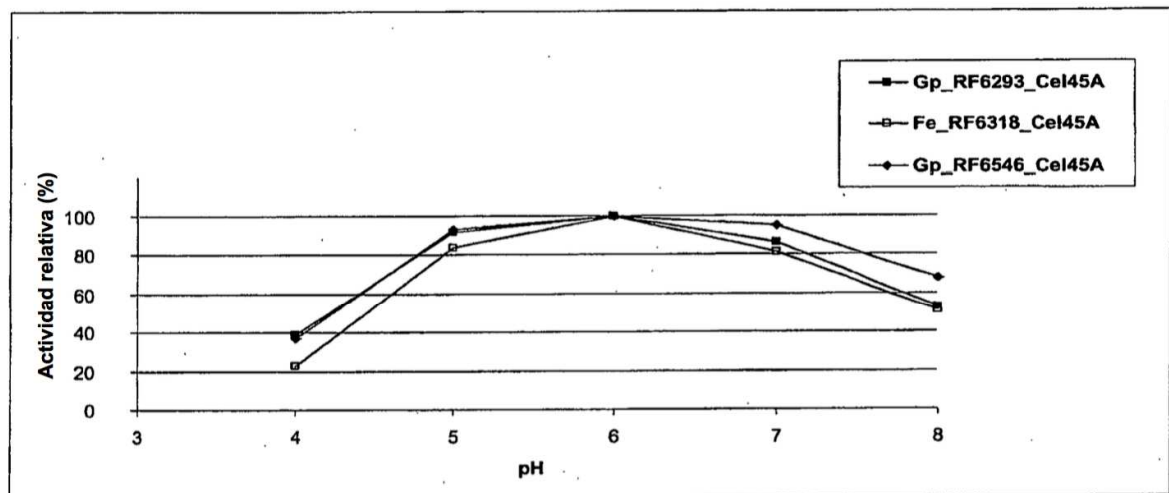


Fig. 2

A)



B)

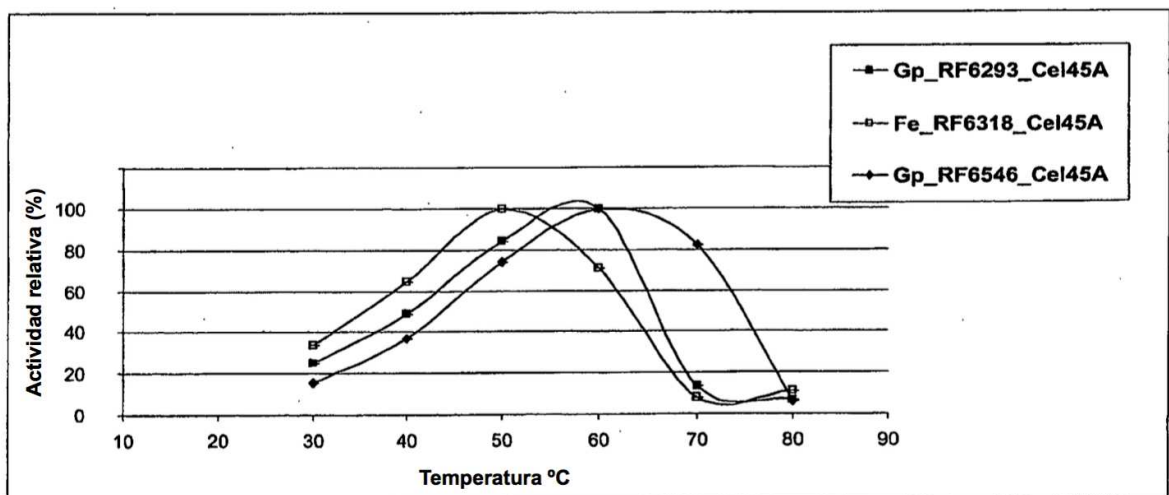


Fig. 3

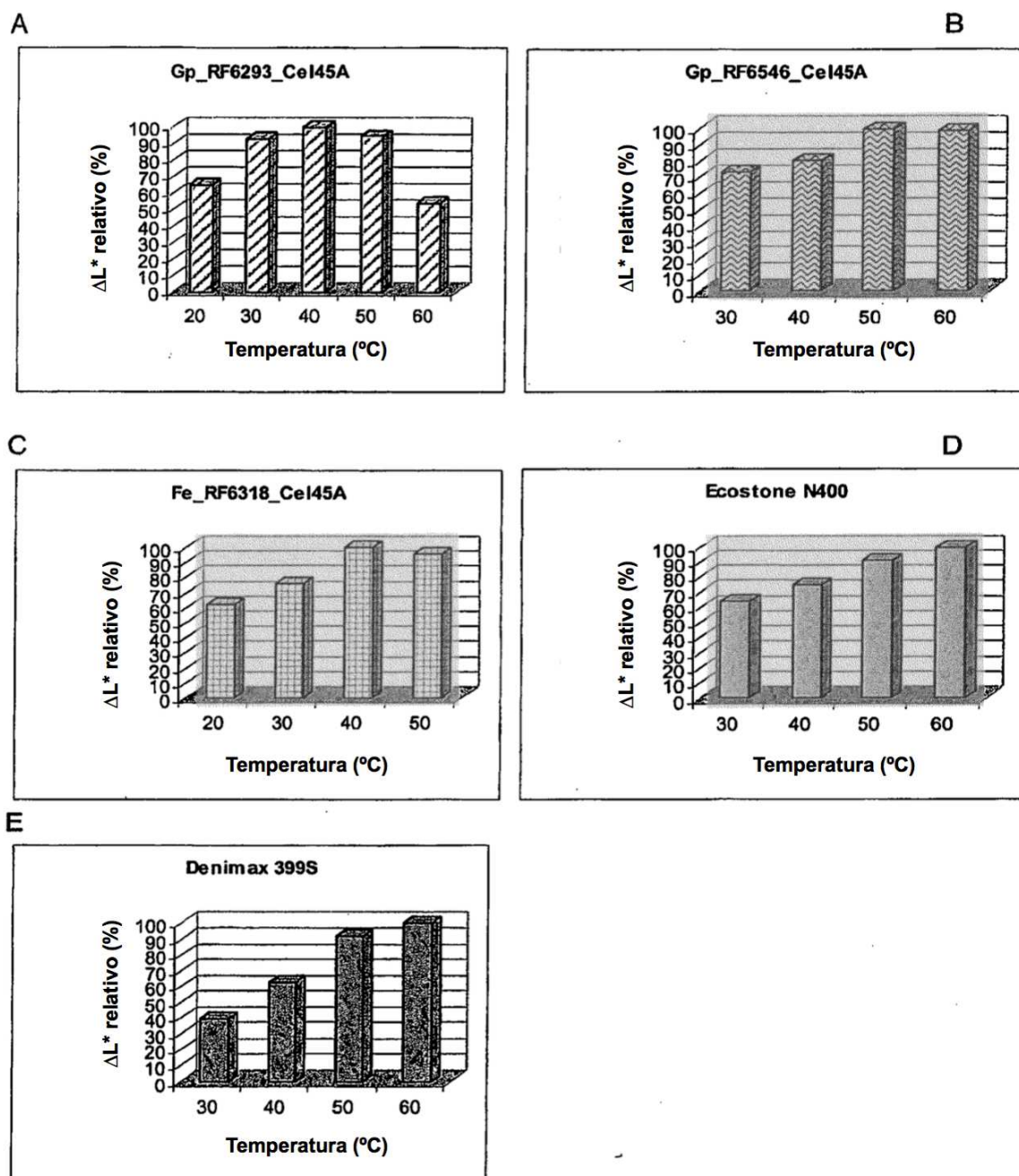


Fig. 4A

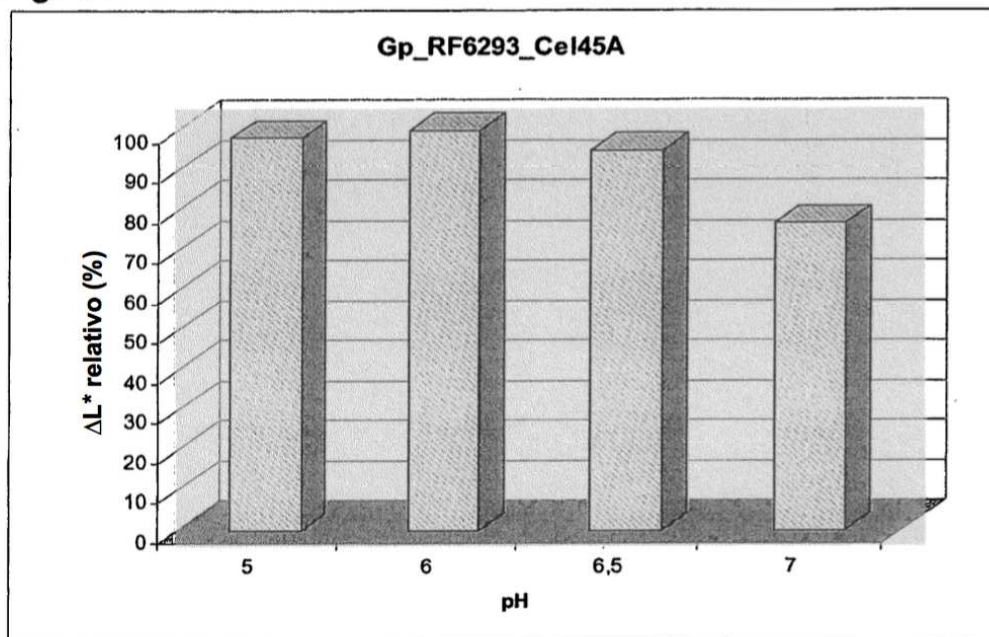


Fig. 4B

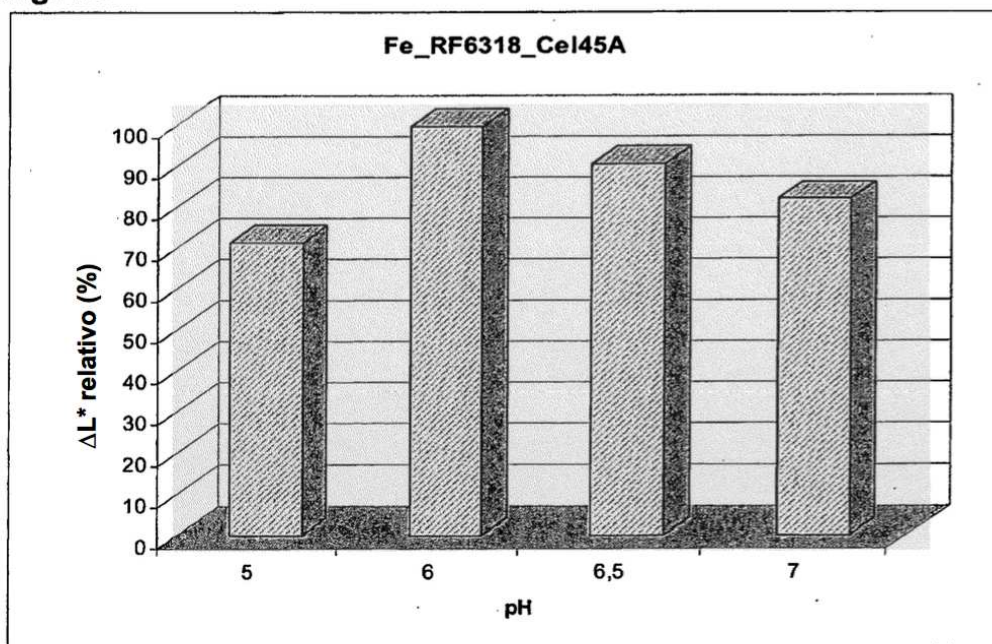


Fig. 5

