

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 556 728**

51 Int. Cl.:

C12N 15/09	(2006.01) D21H 17/22	(2006.01)
C11D 3/386	(2006.01) C12P 7/10	(2006.01)
C11D 7/42	(2006.01) D06M 16/00	(2006.01)
C12N 1/15	(2006.01) D21H 21/10	(2006.01)
C12N 1/19	(2006.01) C12N 15/55	(2006.01)
C12N 9/42	(2006.01)	
C12P 7/08	(2006.01)	
C12P 21/02	(2006.01)	
D06L 3/11	(2006.01)	
D21C 5/02	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.03.2008 E 08721927 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.10.2015 EP 2135944**

54 Título: **Endoglucanasa PPCE y preparación de celulasa que contiene la misma**

30 Prioridad:

12.03.2007 JP 2007061266

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

19.01.2016

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**MORIYA, TATSUKI;
NAKANE, AKITAKA;
TSUJIUCHI, GOH y
FUKUSHIMA, TAKAYOSHI**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 556 728 T3

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

DESCRIPCIÓN

Endoglucanasa PPCE y preparación de celulasa que contiene la misma

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a una endoglucanasa PPCE, una preparación de celulasa que contiene la endoglucanasa PPCE, y un procedimiento para tratar un tejido que contiene celulosa utilizando la endoglucanasa PPCE o la preparación de celulasa.

Técnica anterior

10 Convencionalmente, un tejido que contiene celulosa se ha tratado con celulasa para conferir propiedades deseadas al tejido. Por ejemplo, en la industria textil, un tratamiento con celulasa se realiza para mejorar la sensación al tacto y el aspecto de un tejido que contiene celulosa, o para conferir un aspecto de "lavado a la piedra" a un tejido coloreado que contiene celulosa, proporcionando de ese modo al tejido un cambio de color localizado [referencia de patente 1].

15 Las celulasas usadas para dichos usos incluyen endoglucanasas que pertenecen a la familia 45, endoglucanasas que pertenecen a la familia 5, y endoglucanasas que pertenecen a la familia 12. Es normal en este campo técnico que estas endoglucanasas pueden seleccionarse apropiadamente de acuerdo con sus propiedades (por ejemplo, un pH óptimo, una temperatura óptima, un efecto para mejorar la textura de un tejido, o una influencia sobre la resistencia de las fibras). Las endoglucanasas que pertenecen a la familia 45 se usan principalmente en condiciones neutras, las endoglucanasas que pertenecen a la familia 12 se usan en condiciones ácidas a condiciones neutras, y las endoglucanasas que pertenecen a la familia 5 se usan principalmente en condiciones ácidas. Ejemplos de endoglucanasas que pertenecen a la familia 45 incluyen un componente de endoglucanasa purificado de 43 kDa derivado del género Humicola [referencia de patente 2], endoglucanasa NCE5 derivada del género Humicola [referencia de patente 3], y endoglucanasa RCE I derivada del género Rhizopus [referencia de patente 9].

20 Ejemplos de endoglucanasas que pertenecen a la familia 5 incluyen la endoglucanasa SCE3 derivada del género Trichoderma [referencia de patente 5]. Ejemplos de endoglucanasas que pertenecen a la familia 12 incluyen la endoglucanasa EG III derivada del género Trichoderma [referencia no de patente 1] y la endoglucanasa FI-CMCasa derivada del género Aspergillus [referencia no de patente 2]. Se sabe que el género Penicillium produce endoglucanasa que tiene un peso molecular de 25 kDa [referencia no de patente 3].

30 Cuando estas enzimas se usan para el procesamiento de tejidos, las reacciones se realizan generalmente en condiciones óptimas. Las temperaturas óptimas de estas enzimas conocidas están dentro de un área intermedia de temperatura (por ejemplo, 40°C a 60°C) y los pH óptimos de las mismas están aproximadamente entre una condición ácida y una condición neutra (por ejemplo, pH 4,0 a pH 8,0). En este campo técnico, no existen casos de una enzima que tenga una temperatura óptima baja (tal como inferior a 40°C) o un pH óptimo fuertemente ácido (tal como menos de pH 4,0) que se usen habitualmente de forma industrial. En el procesamiento industrial de tejidos que contienen celulosa, habitualmente se proporciona una preparación de celulasa como una preparación que comprende una gran cantidad de endoglucanasa que tiene una alta actividad. Como proceso para fabricar dicha preparación, se conocen procesos de sobre-expresión de un componente de endoglucanasa deseado que tiene alta actividad en células huésped usando técnicas recombinantes genéticas [referencias de patente 6, 7].

40 Como células huésped preferibles usadas en estos procesos, pueden mencionarse, por ejemplo, hongos filamentosos que pertenecen a Hyphomycetes, tales como hongos filamentosos que pertenecen al género Aspergillus, Humicola, o Trichoderma. Cuando se produce la celulasa usada en el procesamiento de tejidos en condiciones ácidas o fuertemente ácidas, el género Trichoderma que produce celulasa ácida es preferible como células huésped, en comparación con el género Aspergillus o Humicola que producen celulasa neutra, porque se espera un efecto sinérgico causado por la celulasa derivada del huésped. Particularmente, en vista de la producción industrial de la enzima, los hongos filamentosos que pertenecen al género Trichoderma que tienen una alta productividad son más preferibles [referencia de patente 8]. Sin embargo, cuando se usa un hongo filamentosos que pertenece al género Trichoderma para expresar un gen derivado de una especie diferente (es decir, gen exógeno), la expresión a menudo se inhibe porque características en la secuencia nucleotídica del gen (tal como uso de codones en el gen) son diferentes. En este caso, es necesario modificar el gen exógeno. Por ejemplo, cuando se sobre-expresa la endoglucanasa RCE I derivada del género Rhizopus que pertenece a Zygomycetes en Humicola insolens, el gen que codifica RCE I debe optimizarse de acuerdo con el uso de codones en la célula huésped [referencia de patente 4]. Sin embargo, si se realiza dicha optimización, será difícil expresar un gen exógeno tanto como los genes endógenos. Además, incluso cuando la enzima de interés realmente se expresa y produce en un huésped, se prevé que la enzima se digiera con proteasas o similares contenidas en un líquido de cultivo durante el cultivo para obtener la enzima como productos digeridos o fragmentos parciales.

55 [Referencia de patente 1] Patente Europea N° 307.564 [referencia de patente 2] Publicación Internacional WO98/03640 [referencia de patente 3] Publicación Internacional WO01/090375 [referencia de patente 4] Publicación Internacional WO00/24879 [referencia de patente 5] Publicación Internacional WO98/54332 [referencia de patente 6] Publicación Internacional WO91/17243 [referencia de patente 7] Publicación Internacional WO98/03667 [referencia

de patente 8] Publicación Internacional WO05/054475 [referencia no de patente 1] Okada, H. y col., "Appl. Environ. Microbiol", 64, 1998, pág. 555-563 [referencia no de patente 2] Ooi, T. y col., "Nucleic Acids Research", 18, 1990, pág. 5884 [referencia no de patente 3] K. Mahalingeshwara y col., "Carbohydrate Research" 190, 1989, pág. 279-297.

- 5 El documento RU 2 238 974 C2 describe enzimas endoglucanasa III de *Penicillium verruculosum*. Las enzimas tienen una temperatura máxima de 95 a 55°C y un pH óptimo de pH 3,5 a pH 4,5.

Current Genetics, Nueva York, NY, EE.UU, vol. 41, nº 2, 1 de Mayo de 2002 describe nuevas enzimas endoglucanasa de hongos que son miembros de la familia GH 12. Las enzimas se encontraron por comparación de secuencias.

- 10 El documento WO 00/14208 A1 describe enzimas tipo endoglucanasa III derivadas de la EG III de *Trichoderma reesei* que difiere de la enzima de *Trichoderma* en varias posiciones definidas de aminoácido y muestra una estabilidad mejorada en presencia de estrés térmico o mediado por tensioactivo.

Divulgación de la invención

Problemas a resolver por la invención

- 15 Para su uso en el procesamiento de tejidos, se aislaron diversas celulasas de hongos filamentosos que pertenecen al género *Humicola*, *Trichoderma*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Phycomyces*, *Staphylotrichum* o similares, y también se aislaron genes que codifican las celulasas. En particular, los grupos de enzimas que pertenecen a celulasa de familia 5, familia 12, y familia 45, derivadas de hongos filamentosos, muestran actividades ventajosas en el procesamiento de tejidos, y por tanto, se usan ampliamente en este campo técnico. Sin embargo, estos grupos de enzimas son
- 20 enzimas que tienen una temperatura óptima moderada y un pH óptimo ácido o neutro, pero no existe una enzima de baja temperatura ni una enzima fuertemente ácida. En este campo técnico, es muy deseada una enzima que tenga una alta actividad frente a fibras y una baja temperatura óptima y/o un pH óptimo fuertemente ácido. Además, para usar de forma práctica una enzima que tenga dicho perfil específico, es necesario conseguir la sobre-expresión de un gen de interés en un huésped excelente, tal como hongos filamentosos que pertenecen al género *Trichoderma*, y
- 25 proporcionar una preparación de celulasa que tenga una alta actividad a bajo coste. Si dicha preparación de celulasa se proporcionad de forma práctica, proporcionará enormes beneficios industriales. Sin embargo, dicha preparación de celulasa no se ha proporcionado de forma práctica, y no se ha informado de dicho proceso usando técnicas recombinantes genéticas.

Medios para resolver los problemas

- 30 Los presentes inventores descubrieron una nueva proteína que tiene actividad endoglucanasa y un gen de la misma de *Penicillium pinophilum* PF1365 (FERM BP-10780). La presente invención proporciona endoglucanasa PPCE, una preparación de celulasa que contiene la endoglucanasa PPCE, y un procedimiento para tratar un tejido que contiene celulosa utilizando endoglucanasa PPCE o la preparación de celulasa. Los presentes inventores descubrieron que la nueva proteína que tiene actividad endoglucanasa, que se aisló de *Penicillium pinophilum* PF1365 (FERM BP-
- 35 10780), mostraba actividades extremadamente elevadas para mejorar el aspecto de un tejido que contiene celulosa y para conferir un aspecto de "lavado a la piedra" a un tejido que contiene celulosa coloreada. En particular, la endoglucanasa PPCE (a partir de ahora, simplemente mencionada como "PPCE") mostraba una actividad notablemente alta en el procesamiento de tejidos, en comparación con la endoglucanasa SCE3 [referencia de patente 5] y la endoglucanasa EG III [referencia no de patente 1], que se usan ampliamente como celulasa típica para el procesamiento de tejidos, principalmente en condiciones ácidas. Además, la endoglucanasa PPCE mostró características sorprendentes de que su pH óptimo y temperatura óptima eran notablemente bajos, es decir, aproximadamente pH 3 y 30°C, respectivamente, en comparación con celulasas conocidas para el procesamiento de tejidos. Incluso si se comparan con la temperatura óptima (50 a 55°C) y el pH óptimo (pH 4,0 a 5,0) de la endoglucanasa I derivada de *Penicillium pinophilum* IMI87160ii [referencia no de patente 3], que no se había usado
- 40 en el procesamiento de tejidos, el pH óptimo y la temperatura óptima de la endoglucanasa PPCE eran notablemente bajos.

- Los presentes inventores aislaron un gen que codifica la endoglucanasa PPCE derivada de *Penicillium pinophilum* PF1365 (FERM BP-10780), y obtuvieron una producción industrialmente a gran escala de PPCE en *Trichoderma viride* utilizando una secuencia reguladora de un gen de celulasa *cbhI* (documento WO98/11239). Por lo tanto, la
- 50 presente invención proporciona la nueva proteína que tiene actividad endoglucanasa derivada de *Penicillium pinophilum* PF1365 (FERM BP-10780) y el gen de la misma, y una preparación de celulasa que contiene la proteína y tiene excelentes propiedades. Además, la presente invención proporciona una célula huésped transformada con el gen que codifica la proteína, y un procedimiento para obtener la proteína de interés cultivando la célula huésped. Además, la presente invención proporciona un procedimiento para tratar un tejido que contiene celulosa con la
- 55 proteína de la presente invención o la preparación de celulasa de la presente invención.

Por lo tanto, la presente invención incluye las siguientes invenciones.

- (1) Una proteína seleccionada entre el grupo que consiste en las siguientes proteínas (e) a (i):

- (e) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos 16-236 de la SEC ID N° 4,
 (f) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos 1-236 de la SEC ID N° 4,
 5 (g) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 30,
 (h) una proteína modificada que comprende una secuencia de aminoácidos en que uno o múltiples aminoácidos están deletados, sustituidos, añadidos y/o modificados en la secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos 16-236 o 1-236 de la SEC ID N° 4, y que tiene una actividad endoglucanasa.
- (2) Un polinucleótido que codifica la proteína de (1).
- 10 (3) Un polinucleótido seleccionado entre los siguientes (j) o (k): (j) un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N° 3 o 28, o la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos 46-834 de la SEC ID N° 3 o 28.
- (4) Un vector de expresión que comprende el polinucleótido de (2) o (3).
- (5) Una célula huésped transformada con el vector de expresión de (4).
- 15 (6) La célula huésped de (5), en la que el huésped es una levadura o un hongo filamentoso.
- (7) La célula huésped de (6), en la que el hongo filamentoso es un microorganismo que pertenece al género Trichoderma, Humicola, Aspergillus, Acremonium, o Penicillium.
- (8) La célula huésped de (7), en la que el hongo filamentoso es un microorganismo que pertenece al género Trichoderma.
- 20 (9) La célula huésped de (8), en la que el hongo filamentoso es Trichoderma viride.
- (10) Un proceso para producir la proteína de (1), que comprende las etapas de: cultivar las células huésped de una cualquiera de (5) a (9), y recoger la proteína de las células huésped o un cultivo obtenido mediante cultivo.
- (11) Una preparación de celulasa que comprende la proteína de (1).
- (12) Una composición detergente que comprende la proteína de (1) o la preparación de celulasa de (11).
- 25 (13) Un procedimiento para tratar un tejido que contiene celulosa, que comprende la etapa de poner el tejido que contiene celulosa en contacto con la proteína de (1), la preparación de celulasa de (11), o la composición detergente de (12).
- (14) Un procedimiento para reducir el peso para mejorar la sensación al tacto y el aspecto de un tejido que contiene celulosa, que comprende la etapa de poner el tejido que contiene celulosa en contacto con la proteína de (1), la preparación de celulasa de (11), o la composición detergente de (12).
- 30 (15) Un procedimiento para proporcionar un cambio de color localizado a un tejido que contiene celulosa coloreada, que comprende la etapa de poner el tejido que contiene celulosa coloreada en contacto con la proteína de (1), la preparación de celulasa de (11), o la composición detergente de (12).
- (16) Un procedimiento de aclarado del color de un tejido que contiene celulosa coloreada, que comprende la etapa de poner el tejido que contiene celulosa coloreada en contacto con la proteína de (1), la preparación de celulasa de (11), o la composición detergente de (12).
- 35 (17) Un procedimiento para reducir la formación de pelusas de un tejido que contiene celulosa o reducir la tasa de formación de pelusas, que comprende la etapa de poner el tejido que contiene celulosa en contacto con la proteína de (1), la preparación de celulasa de (11), o la composición detergente de (12).
- (18) Un procedimiento para reducir la rigidez de un tejido que contiene celulosa o reducir la tasa de formación de rigidez, que comprende la etapa de poner el tejido que contiene celulosa en contacto con la proteína de (1), la preparación de celulasa de (11), o la composición detergente de (12).
- (19) El procedimiento de una cualquiera de (13) a (18), en el que la etapa de poner en contacto el tejido con la composición detergente se realiza por remojo, lavado, o aclarado del tejido.
- 40 (20) Un procedimiento para destañar papel de desecho, caracterizado por el uso de la proteína de (1) o la preparación de celulasa de (11), en el proceso de tratamiento del papel de desecho junto con un agente de destintado
- (21) Un procedimiento para mejorar la liberación de agua de la pulpa de papel, que comprende la etapa de tratar la pulpa de papel con la proteína de (1), o la preparación de celulasa de (11).

(22) Un procedimiento para mejorar la digestibilidad de pienso animal, que comprende la etapa de tratar un pienso animal con la proteína de (1), o la preparación de celulasa de (11).

(23) Un procedimiento para producir etanol de biomasa digiriendo y sacarificando una sustancia basada en celulosa, que comprende la etapa de tratar la sustancia basada en celulosa con la proteína de (1), o la preparación de celulasa de (11).

Efectos de la invención

La proteína de la presente invención, la endoglucanasa PPCE, está disponible para lavado o procesamiento de tejidos, tal como mejora de la sensación al tacto y el aspecto de un tejido que contiene celulosa, proporcionar un cambio de color localizado al tejido, aclarado del color, reducción de pelusas o una reducción de la rigidez.

Mejor modo de realizar la invención

Proteína que tiene actividad endoglucanasa

El término "endoglucanasa" como se usa en el presente documento significa una enzima que muestra una actividad endoglucanasa, es decir, endo-1,4-p-glucanasa (EC 3.2.1.4), que tiene una actividad hidrolizante del enlace β 1,4-glucopiranosilo de β -1,4-glucano.

La expresión "actividad endoglucanasa" como se usa en el presente documento significa una actividad CMCasa. La expresión "actividad CMCasa" como se usa en el presente documento significa una actividad de hidrólisis de carboximetilcelulosa (CMC; Tokyo Kasei Kogyo Co., Ltd.). Cuando se incuba una solución que contiene una proteína (enzima) a ensayar y CMC durante un periodo predeterminado y se mide la cantidad de azúcar reductor liberado, la cantidad de la enzima que produce el azúcar reductor correspondiente a 1 mmol de glucosa por minuto se define como 1 unidad de actividad CMCasa.

La actividad endoglucanasa puede medirse, por ejemplo, mediante el siguiente procedimiento. Es decir, se añaden 0,5 ml de una solución que contiene una proteína a ensayar a 0,5 ml de una solución de CMC al 2% disuelta en un tampón acetato-acetato sódico de 50 mmol/l (pH 6,0), y la mezcla se incuba a 50°C durante 30 minutos. Se mide una concentración del azúcar reductor generado en la mezcla de reacción mediante el procedimiento de ácido 3,5-dinitrosalicílico (procedimiento DNS). Más particularmente, después de la incubación durante 30 minutos, se añaden 3,0 ml de un reactivo DNS a 1,0 ml de la mezcla de reacción, se incuba el conjunto en un baño de agua en ebullición durante 5 minutos y se diluye con 8,0 ml de agua destilada, y se mide la absorbancia a 540 nm. Se produce una curva de calibración usando soluciones de glucosa preparadas por dilución por etapas, y se determina una cantidad de azúcar reductor generado en la mezcla de reacción enzimática como la de glucosa convertida. La actividad se calcula definiendo como 1 unidad la cantidad de la enzima que produce el azúcar reductor correspondiente a 1 mmol de glucosa por minuto.

El reactivo DNS puede prepararse de acuerdo con divulgaciones en referencias tales como Sakuzo Hukui, "Seikagaku Jikken-hou 1, Kangen-Tou no Teiryō-hou (Laboratory Manual for Biological Chemistry, Vol. 1, Assay of Reducing Sugar)", pág. 19-20, Japan Scientific Societies Press, o por el siguiente procedimiento. A 300 ml de una solución acuosa al 4,5% de hidrato sódico, se añaden 880 ml de una solución de ácido 3,5-dinitrosalicílico al 1% y 255 g de sal de Rochelle (Solución A). A 22 ml de una solución acuosa al 1,0% de hidrato sódico, se añaden 10 g de fenol cristalino, y después se añade agua para disolverlo y ajustar el volumen a 100 ml (Solución B). Después, se disuelven 6,9 g de hidrógeno carbonato sódico en 69 ml de Solución B, y se vierte la Solución A en la misma. El conjunto se mezcla con agitación para disolver la sal de Rochelle, se deja reposar durante 2 días, y después se filtra.

La proteína de la presente invención puede obtenerse de hongos filamentosos, tal como un microorganismo que pertenece al género Penicillium, preferentemente Penicillium pinophilum, más preferentemente Penicillium pinophilum PF1365 (FERM BP-10780), y puede usarse una cepa mutante derivada de los mismos. La secuencia de aminoácidos N-terminal de la proteína de la presente invención es típicamente la de la SEC ID N° 2. La secuencia de aminoácidos N-terminal puede determinarse, por ejemplo, de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 2. De acuerdo con la presente invención, se proporciona una proteína derivada de Penicillium pinophilum, y que tiene las siguientes propiedades (A), (B), y (C):

(A) tiene actividad endoglucanasa,

(B) tiene el extremo N-terminal de la misma (1) la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 2, o (2) una secuencia de aminoácidos en que un aminoácido está deletado, sustituido, o añadido en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 2, y

(C) tiene un peso molecular promedio de 25 kDa a 27 kDa, determinado por SDS-PAGE.

El peso molecular promedio determinado por SDS-PAGE puede determinarse con el procedimiento descrito en el Ejemplo 1.

La proteína de la presente invención derivada de Penicillium pinophilum típicamente consiste en la secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos 16-236 de la SEC ID N° 4, y el resto de glutamina (Gln) N-terminal se

convierte en un resto de ácido piroglutámico (pyroGlu) por modificación (es decir, la proteína consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 30).

De acuerdo con otra realización de la presente invención, se proporciona una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 4 (o una secuencia parcial de la misma), y una proteína modificada o una proteína homóloga de la misma. Ejemplos de "la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 4 o una secuencia parcial de la misma" incluyen:

- una proteína madura que tiene la secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos 16-236 de la SEC ID N° 4;
- una proteína precursora que comprende la secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos 1-236 de la SEC ID N° 4 en que está añadido un péptido señal (de la 1ª a la 15ª posición);
- una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos en que está añadida una o más secuencias apropiadas al extremo N-terminal y/o C-terminal de la proteína madura que tiene la secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos 16-236 de la SEC ID N° 4; y
- una proteína en que está modificado el aminoácido N-terminal y/o el aminoácido C-terminal de la proteína madura que tiene la secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos 16-236 de la SEC ID N° 4.

La expresión "adición de secuencia de aminoácidos" como se usa en el presente documento incluye una adición de parte o la totalidad del péptido señal que consiste en los aminoácidos 1-15 de la SEC ID N° 4 al extremo N-terminal de la proteína madura que tiene la secuencia de aminoácidos que consisten en los aminoácidos 16-236 de la SEC ID N° 4.

La expresión "modificación de secuencia de aminoácidos" como se usa en el presente documento incluye una modificación del extremo N-terminal de la proteína madura que tiene la secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos 16-236 de la SEC ID N° 4 por una enzima derivada de un huésped. Esta modificación incluye una modificación del resto de glutamina (Gln) N-terminal de la proteína madura en un resto de ácido piroglutámico (pyroGlu).

Ejemplos del péptido señal incluyen la secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos 1-15 de la SEC ID N° 4, es decir, la secuencia de aminoácidos que consiste en 15 restos de aminoácido codificados por la secuencia de nucleótidos desde el codón ATG en la 1ª a 3ª posición hasta el codón en la 43ª a 45ª posición.

La expresión "proteína modificada" como se usa en el presente documento significa una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos en que uno o múltiples aminoácidos (preferentemente uno o varios aminoácidos) están delecionados, sustituidos, añadidos y/o modificados en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 4 (o una secuencia parcial de la misma), y que tiene actividad endoglucanasa.

La cantidad de aminoácidos a modificar tal como "delecionar, sustituir, o añadir" es uno o múltiples aminoácidos (preferentemente uno o varios aminoácidos), por ejemplo, 1 a 20, preferentemente 1 a 10, más preferentemente 1 a 5, más preferentemente 1 a 3. La proteína modificada incluye una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos en que uno o múltiples aminoácidos están sustituidos de forma conservativa en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 4, y que tiene actividad endoglucanasa.

La expresión "sustitución conservativa" como se usa en el presente documento significa que uno o múltiples restos de aminoácido contenidos en una proteína están reemplazados con diferentes aminoácidos que tienen propiedades químicas similares de modo que las actividades de la proteína no cambien sustancialmente. Como sustitución conservativa, puede mencionarse, por ejemplo, una sustitución de un resto hidrófobo por otro resto hidrófobo, o una sustitución de un resto polar por otro resto polar con la misma carga. Los aminoácidos que tienen propiedades químicas similares y pueden sustituirse de forma conservativa entre sí son conocidos para los expertos en la materia.

Más particularmente, como aminoácidos no polares (hidrófobos), pueden mencionarse, por ejemplo, alanina, valina, isoleucina, leucina, prolina, triptófano, fenilalanina, metionina. Como aminoácidos polares (neutros), pueden mencionarse, por ejemplo, glicina, serina, treonina, tirosina, glutamina, asparagina, o cisteína. Como aminoácidos básicos que tienen una carga positiva, pueden mencionarse, por ejemplo, arginina, histidina, o lisina.

Como aminoácidos ácidos que tienen una carga negativa, pueden mencionarse, por ejemplo, ácido aspártico o ácido glutámico.

La proteína de la presente invención puede aislarse y purificarse de un microorganismo, por ejemplo, como se describe en el Ejemplo 1. La proteína de la presente invención puede obtenerse expresando un polinucleótido que codifica la proteína de la presente invención en un huésped apropiado por técnicas recombinantes genéticas, y aislando y purificando la proteína producida, como se describe a continuación.

Se describen adicionalmente en el presente documento ejemplos de una proteína homóloga que incluye una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene un 90% de homología o más (preferentemente un 95% o más, más preferentemente un 98% o más, mucho más preferentemente un 99% o más) con la secuencia de

aminoácidos que consiste en los aminoácidos 16-236 o 1-236 de la SEC ID N° 4 o con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 30, y que tiene actividad endoglucanasa. La homología como se usa en el presente documento se muestra como un valor calculado por un software disponible en el mercado de procesamiento de información genética GENETYX (GENETYX Corporation), de acuerdo con parámetros por defecto en un programa de búsqueda de homología.

Parámetros por defecto:

Tamaño unitario a comparar = 2
Lugar de recogida = 1

Polinucleótido que codifica proteína que tiene actividad endoglucanasa

De acuerdo con la presente invención, se proporcionan polinucleótidos que codifican una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 4 o una secuencia parcial de la misma, o una proteína modificada de la misma. Cuando se da la secuencia de aminoácidos de una proteína, puede seleccionarse fácilmente una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos, y por tanto pueden seleccionarse diversas secuencias de nucleótidos que codifican la proteína de la presente invención. El término "polinucleótido" como se usa en el presente documento incluye ADN y ARN, y es preferible ADN.

Típicamente, el polinucleótido de la presente invención puede seleccionarse entre el grupo que consiste en: (a) un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N° 3 o 28 (o una secuencia parcial de la misma), y (b) un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos en que una o múltiples nucleótidos están deletados, sustituidos, y/o añadidos en la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N° 3 o 28 (o una secuencia parcial de la misma), y que codifica una proteína que tiene actividad endoglucanasa.

Ejemplos del polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N° 3 o una secuencia parcial de la misma incluyen un polinucleótido que la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos 1-834 de la SEC ID N° 3, y un polinucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos 46-834 de la SEC ID N° 3.

El polinucleótido de la presente invención incluye un polinucleótido de origen natural. Además, puede sintetizarse la totalidad. Además, la síntesis puede realizarse usando parte del polinucleótido de origen natural. Típicamente, el polinucleótido de la presente invención puede obtenerse realizando una reacción de PCR usando ADN genómico de Penicillium pinophilum como un molde. Además, el polinucleótido de la presente invención puede obtenerse de acuerdo con un procedimiento habitual comúnmente usado en ingeniería genética, por ejemplo, preparando una biblioteca de ADN genómico y explorando la biblioteca usando una sonda de ADN apropiada diseñada en base a la información de una secuencia parcial de aminoácidos.

En la presente invención, una secuencia típica de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de la endoglucanasa PPCE tiene la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N° 3. La secuencia de nucleótidos de la SEC ID N° 3 tiene una fase de lectura abierta desde el codón ATG en la 1ª a 3ª posición hasta el codón TAG en la 832ª a 834ª posición y dos intrones en la 411ª a 469ª y 691ª a 754ª posición. La secuencia de nucleótidos en las 46ª a 48ª posición corresponde al aminoácido N-terminal de una proteína madura de la endoglucanasa PPCE que consiste en 221 restos de aminoácido.

Vector de expresión y transformante

De acuerdo con la presente invención, se proporciona un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 4 o una secuencia parcial de la misma, o una proteína modificada (a partir de ahora mencionada como el polinucleótido de la presente invención) de modo que el polinucleótido pueda replicarse y la proteína codificada por el polinucleótido puede expresarse en un microorganismo huésped. El vector de expresión de la presente invención puede construirse en base a un vector de auto-replicación (tal como un plásmido), que existe como elemento extra-cromosómico y puede replicarse independientemente de la replicación de los cromosomas. Como alternativa, el vector de expresión de la presente invención puede ser un vector que se integra en el genoma del microorganismo huésped y se replica junto con los cromosomas, cuando el huésped se transforma con el vector. La construcción del vector de la presente invención puede realizarse por procesos o procedimientos habituales comúnmente usados en ingeniería genética. Para expresar una proteína que tiene una actividad deseada por transformación de un microorganismo huésped con el vector de expresión de la presente invención, es preferible que el vector de expresión contenga, por ejemplo, un polinucleótido capaz de controlar la expresión, además del polinucleótido de la presente invención. Como polinucleótido capaz de controlar la expresión, por ejemplo, puede usarse un promotor, un terminador, o un polinucleótido que codifica un péptido señal, en la presente invención. El promotor que puede usarse en la presente invención no está particularmente limitado, siempre que muestre una actividad transcripcional en un microorganismo huésped. El promotor puede obtenerse como un polinucleótido que controla la expresión de un gen que codifica una proteína igual o diferente de la derivada del microorganismo huésped.

El péptido señal no está particularmente limitado, siempre que contribuya a la secreción de la proteína en un

microorganismo huésped. El péptido señal puede obtenerse como un polinucleótido derivado de un gen que codifica una proteína igual o diferente de la derivada del microorganismo huésped.

5 El vector de expresión de la presente invención puede contener un marcador genético para seleccionar un transformante obtenido por introducción del vector de expresión en un microorganismo huésped. El marcador genético puede seleccionarse apropiadamente de acuerdo con el procedimiento para seleccionar un transformante. Como marcador genético, por ejemplo, puede usarse un gen de resistencia a fármacos o un gen que complementa una mutación auxotrófica en la presente invención.

10 El marcador genético puede insertarse en un vector diferente al vector de expresión, y este vector que contiene el marcador genético puede mezclarse con el vector de expresión para transformar un huésped con estos vectores simultáneamente (también llamado co-transformación). De acuerdo con la presente invención, se proporciona un microorganismo transformado con el vector de expresión. No está particularmente limitado el sistema huésped-vector que puede usarse en la presente invención. Por ejemplo, puede usarse un sistema que utiliza *E. coli*, *Actinomyces*, levaduras, u hongos filamentosos, o un sistema para la expresión de una proteína de fusión usando dicho microorganismo. La transformación de un microorganismo con el vector de expresión puede realizarse de
15 acuerdo con un procedimiento habitual.

En la presente invención, el transformante de la presente invención se cultiva, y el transformante resultante o cultivo se usa para obtener la proteína de la presente invención. De acuerdo con otra realización de la presente invención, puede proporcionarse el proceso para producir la nueva proteína de la presente invención. El cultivo del transformante (incluyendo condiciones de cultivo) puede realizarse de un modo sustancialmente similar al de un huésped original usado para preparar el transformante.
20

Como procedimiento para recuperar la proteína de interés después del cultivo del transformante, pueden realizarse procedimientos habitualmente usados. Como proceso preferible para producir la nueva proteína de la presente invención, se proporciona un procedimiento para expresar la proteína en un hongo filamentosos que pertenece a Hyphomycetes. Como hongo filamentosos preferible que puede usarse como huésped en la presente invención, pueden mencionarse, por ejemplo, hongos filamentosos que pertenecen al género Trichoderma, Humicola, Aspergillus, Acremonium, o Penicillium, más preferentemente Trichoderma o Humicola. Más particularmente, pueden mencionarse, por ejemplo, Trichoderma viride, Trichoderma reesei, Trichoderma longibrachiatum, Humicola insolens, Humicola thermoidea, Aspergillus niger, Aspergillus oryzae, Acremonium cellulolyticus, o Penicillium pinophilum, preferentemente Trichoderma viride o Humicola insolens.
25

30 Uso de celulasa/preparación de celulasa

La presente invención se refiere a una preparación de celulasa que comprende la proteína de la presente invención (por ejemplo, una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 4 o una secuencia parcial de la misma, una proteína modificada de la misma, o una proteína que se puede obtener por cultivo de la célula huésped de la presente invención).

35 Convencionalmente, la preparación de celulasa puede contener, por ejemplo, cargas (por ejemplo, lactosa, cloruro sódico, o sorbitol), antisépticos, y/o tensioactivos no iónicos, además de la enzima celulasa. La forma de la preparación de celulasa puede ser sólida o líquida, tal como polvo, particulado, gránulo, gránulo que no produce polvo, o formulación líquida. Además de la proteína de la presente invención, la preparación de celulasa de la presente invención puede contener otras enzimas celulasa, tales como celobiohidrolasa, β -glucosidasa, y/o
40 endoglucanasa diferente a la endoglucanasa de la presente invención. El gránulo que no produce polvo (preferentemente un gránulo que no tiene propiedades de pulverización), es decir una forma de preparación de celulasa, puede producirse de acuerdo con el procedimiento habitual de granulación en seco. Es decir, se mezcla una proteína en polvo de la presente invención con una o múltiples sustancias seleccionadas entre el grupo que comprende sales inorgánicas (tales como sulfato sódico o cloruro sódico), minerales (tales como bentonita o montmorillonita), y sustancias orgánicas (tales como almidón o celulosa molida). Después de ello, los polvos o la
45 suspensión finamente suspendida de uno o múltiples tensioactivos no iónicos se añaden a la mezcla, y después el producto obtenido se mezcla completamente o amasa. Dependiendo de la situación, se añade opcionalmente un polímero sintético (tal como polietilenglicol) o un polímero natural (tal como almidón), que une sólidos, a la mezcla y se amasa adicionalmente. Después de ello, se realiza granulación mediante molde o por extrusión, usando, por
50 ejemplo, un disco pelleter, y el material moldeado obtenido después se convierte en una forma esférica usando un marumerizador seguido por secado, de modo que puedan producirse gránulos que no producen polvo. La cantidad de uno o múltiples tensioactivos no iónicos no está particularmente limitada, y es preferentemente del 0,1 al 50% en peso, más preferentemente del 0,1 al 30% en peso, mucho más preferentemente del 1 al 10% en peso del peso total de la preparación de celulasa de presente invención. También es posible recubrir la superficie de los gránulos con
55 un polímero o similar para controlar la penetración de oxígeno o agua. Además, la preparación líquida, que es una de las preparaciones de celulasa (preferentemente un líquido estabilizado), puede prepararse mezclando un estabilizante de endoglucanasa (tal como un polímero sintético o natural) con una solución que contiene la proteína de la presente invención y, si fuera necesario, añadiendo sales inorgánicas y/o un conservante sintético.

En este caso, puede mezclarse uno o múltiples tensioactivos no iónicos con la preparación líquida. La cantidad del

uno o múltiples tensioactivos no iónicos no está particularmente limitada, y preferentemente del 0,1 al 50% en peso, más preferentemente del 0,1 al 30% en peso, mucho más preferentemente del 1 al 10% en peso del peso total de la preparación de celulasa de presente invención. Además, la presente invención proporciona una composición detergente que comprende la proteína de la presente invención o la preparación de celulasa de la presente invención. La composición detergente de la presente invención también puede comprender tensioactivos, que pueden ser aniónicos, no iónicos, catiónicos, anfotéricos, o zwitteriónicos, o una mezcla de los mismos. La composición detergente puede comprender otras composiciones detergentes conocidas en la técnica, por ejemplo, un aditivo, lejía, agente blanqueante, inhibidor de manchas, secuestrante, polímero liberador de suciedad, aroma, otras enzimas (tales como proteasa, lipasa, o amilasa), estabilizante para enzimas, granulante, abrillantador óptico, y/o agente espumante. Como tensioactivos aniónicos típicos, pueden mencionarse, por ejemplo, alquil benzeno sulfonato lineal (LAS), alquil sulfato (AS), sulfonato de α -olefina (AOS), sulfonato de polioxietilén alquiléter (AES), α -sulfo éster de ácido graso (α -SFMe), o sales de metales alcalinos de ácido graso de origen natural. Como tensioactivos no iónicos, pueden mencionarse, por ejemplo, polioxietilén alquil éter (AE), alquilpolietilenglicol éter, nonilfenol polietilenglicol éter, etoxilato de éster metílico de ácido graso, sacarosa, o éster de ácido graso de glucosa, o ésteres de alquilglucósido o alquilglucósido polietoxilado.

El procedimiento de la presente invención para tratar un tejido que contiene celulosa se realiza poniendo el tejido que contiene celulosa en contacto con la proteína de la presente invención, la preparación de celulasa de la presente invención, o la composición detergente de la invención. Pueden mejorarse las siguientes propiedades del tejido que contiene celulosa mediante el procedimiento de la presente invención:

- (1) Mejora de la sensación al tacto y aspecto de un tejido reduciendo el peso;
- (2) Proporcionar un cambio de color localizado a un tejido que contiene celulosa coloreada, es decir, proporcionar un aspecto tipo lavado a la piedra y textura a un tejido que contiene celulosa coloreada, típicamente tejido vaquero;
- (3) Aclaramiento del color de un tejido que contiene celulosa coloreada;
- (4) Flexibilización de un tejido (reducción de la tasa de rigidez, y una reducción de la rigidez); y
- (5) Eliminación de pelusas (reducción de la tasa de la formación de pelusas, y reducción de pelusas).

Más particularmente, el procedimiento de la presente invención puede realizarse añadiendo a la proteína de la presente invención, la preparación de celulasa de la presente invención, o la composición detergente de la presente invención en agua en que un tejido se empapa o empapará, por ejemplo, durante el remojo, lavado, o aclarado de un tejido. Las condiciones tales como temperatura de contacto o la cantidad de la proteína, la preparación de celulasa, o la composición de celulasa a añadir pueden determinarse apropiadamente de acuerdo con otras diversas condiciones. Por ejemplo, para la mejora de la sensación al tacto y el aspecto de un tejido que contiene celulosa reduciendo el peso, la proteína, la preparación de celulasa, o la composición detergente en una concentración de proteína de 0,1 a 50 mg/l se usa preferentemente a una temperatura de aproximadamente 10 a 60°C. Para proporcionar un cambio de color localizado a un tejido que contiene celulosa coloreada, la proteína, la preparación de celulasa, o la composición detergente en una concentración de proteína de 0,1 a 100 mg/l se usa preferentemente a una temperatura de aproximadamente 20 a 60°C. Para aclaramiento del color de un tejido que contiene celulosa coloreada, la proteína, la preparación de celulasa, o la composición detergente en una concentración de proteína de 0,01 a 20 mg/l se usa preferentemente a una temperatura de aproximadamente 10 a 60°C. Para reducir la rigidez de un tejido que contiene celulosa o reducir la tasa de la formación de rigidez, la proteína, la preparación de celulasa, o la composición detergente en una concentración de proteína de 0,01 a 20 mg/l se usa preferentemente a una temperatura de aproximadamente 10 a 60°C. Para la reducción de pelusas de un tejido que contiene celulosa o la reducción de la tasa de la formación de pelusas, la proteína, la preparación de celulasa, o la composición detergente en una concentración de proteína de 0,01 a 20 mg/l se usa preferentemente a una temperatura de aproximadamente 10 a 60°C.

Además, la presente invención se refiere a un procedimiento para destintar papel de desecho, caracterizado por el uso de la proteína de la presente invención o la preparación de celulasa de la presente invención, en el proceso para tratar el papel de desecho junto con un agente de destintado. La proteína o la preparación de celulasa de la presente invención es útil en el proceso para producir papel reciclado a partir de papel de desecho, ya que puede mejorarse la eficacia del destintado haciendo reaccionar el papel de desecho con la misma. De acuerdo con el procedimiento de destintado, la blancura del papel de desecho puede mejorarse de forma notable reduciendo las fibras con tinta residual. El agente de destintado no está particularmente limitado, siempre que sea un agente que pueda usarse en destintar papel de desecho en general. Como agente de destintado, pueden mencionarse, por ejemplo, álcalis (tales como hidróxido sódico o carbonato sódico), silicato sódico, peróxido de hidrógeno, fosfatos, tensioactivos aniónicos o no iónicos, aceptores tales como ácido oleico, y agentes auxiliares tal como un estabilizante del pH, un agente quelante, o un agente de dispersión. El papel de desecho que puede tratarse mediante el procedimiento de destintado no está particularmente limitado, siempre que sea papel de desecho común. Como papel de desecho, pueden mencionarse, periódicos usados, revistas usadas, y papel usado impreso de grado bajo a medio que comprende pulpa mecánica y pulpa química; papel sin madera usado que comprenden de pulpa química; o papel de desecho impreso del mismo tal como papel de revestimiento. Un papel diferente al papel de desecho común puede tratarse mediante el procedimiento de destintado, siempre que deposite tinta.

Además, la presente invención se refiere a un procedimiento para mejorar la liberación de agua de pulpa de papel,

que comprende el proceso de tratar una pulpa de papel con la proteína de la presente invención o la preparación de celulasa de la presente invención. De acuerdo con el procedimiento, se considera que este procedimiento puede mejorar significativamente la liberación de agua de pulpa de papel, sin disminución seria de la resistencia. Una pulpa de papel que puede tratarse por el procedimiento no está particularmente limitada, pero pueden mencionarse, por ejemplo, pulpa de papel de desecho, pulpa cartón reciclado, pulpa kraft, pulpa de sulfito, pulpa de tratamiento termomecánico, y otra pulpa de alto rendimiento.

La presente invención se refiere a un procedimiento para mejorar la digestibilidad de pienso animal, que comprende la etapa de tratar el pienso animal con la proteína de la presente invención o la preparación de celulasa de la presente invención. De acuerdo con este procedimiento, puede mejorarse la digestibilidad de pienso animal por digestión del glucano en el pienso animal en moléculas apropiadas que tengan un peso molecular bajo. Además, puede mejorarse la digestibilidad del glucano en pienso animal usando la proteína de la presente invención en pienso animal. De acuerdo con la presente invención, se proporciona un procedimiento para mejorar la digestibilidad de pienso animal que comprende la etapa de tratar el pienso animal con la proteína de la presente invención o la preparación de celulasa de la presente invención.

La presente invención se refiere a un procedimiento para producir etanol de biomasa, que comprende la etapa de tratar una sustancia basada en celulosa (tal como fibras de celulosa) con la proteína o la preparación de celulasa de la presente invención. De acuerdo con el procedimiento, la sustancia basada en celulosa puede digerirse y sacarificarse tratando la sustancia con la proteína de la presente invención, para producir glucosa. La glucosa resultante puede convertirse en etanol de biomasa mediante técnicas de fermentación usando otros microorganismos tales como levaduras.

Deposición de microorganismos

Penicillium pinophilum PF1365, de la que se obtuvo la endoglucanasa PPCE de la presente invención, se depositó internacionalmente en el International Patent Organism Depository National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (Dirección: AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-chome Tukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566 Japón) el 7 de febrero de 2007, y el número de depósito internacional es FERM BP-10780.

Escherichia coli JM109/p28FULL18 de la presente invención, es decir, Escherichia coli JM109 transformada con el plásmido p28FULL18 obtenida por inserción del gen de PPCE en el plásmido PCR 2.1-TOPO, se depositó internacionalmente en el International Patent Organism Depository National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (Dirección: AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-chome Tukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566 Japón) el 7 de febrero de 2007, y el número de depósito internacional es FERM BP-10781.

Trichoderma viride MC300-1, que puede usarse como huésped para el vector de expresión de la presente invención, se depositó de forma local (originalmente) en el International Patent Organism Depository National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (Dirección: AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-chome Tukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566 Japón) el 9 de septiembre de 1996, y se transfirió a un depósito internacional el 11 de agosto de 1997. El número de depósito internacional (un número en paréntesis [] después del número de depósito internacional es un número de depósito local) es FERM BP-6047 [FERM P-15842].

Ejemplos

La presente invención se ilustrará ahora adicionalmente mediante el siguiente Ejemplo, aunque sin limitarse en absoluto al mismo.

Ejemplo 1: Aislamiento y purificación del componente que tiene actividad para eliminar las pelusas de algodón coloreado a partir de Penicillium pinophilum PF1365

Penicillium pinophilum PF1365 se cultivó en un medio TS (almidón soluble al 2,0%, glucosa al 1,0%, polipeptona al 0,5%, germen de trigo al 0,6%, extracto de levadura al 0,3%, torta de soja al 0,2%, carbonato de calcio al 0,2%, pH 7,0) a 25°C en agitación. Después de cultivo durante 24 horas, el hongo se inoculó en un medio (N) (avicel al 5,0%, extracto de levadura al 2,0%, polipeptona al 0,1%, sulfato de magnesio al 0,03%, pH 6,8), y se cultivó adicionalmente a 25°C durante 5 días. Se retiraron los micelios del cultivo para obtener un sobrenadante de cultivo como una solución en bruto de preparación de celulasa. Se añadió sulfato de amonio a la solución en bruto de preparación de celulasa de modo que la concentración final de sulfato de amonio en la solución llegara a ser de 1,2 mol/l. La solución se aplicó a una columna de Fenil HP HiTrap™ (GE Healthcare Bio-Sciences) equilibrada con un tampón acetato sódico 50 mM (pH 5) que contenía 1,2 mol/l de sulfato de amonio, y se eluyó mediante un procedimiento de elución por etapas usando 1,2 mol/l, 0,96 mol/l, 0,72 mol/l, 0,48 mol/l, 0,24 mol/l, y 0 mol/l de sulfato de amonio en un tampón acetato sódico de 50 mmol/l (pH 5), para recoger las fracciones. La fracción eluida a una concentración de sulfato de amonio de 0,24 mol/l mostró una actividad de eliminación de pelusas de un tejido de algodón coloreado. La actividad de eliminación de pelusas de un tejido de algodón coloreado se evaluó por el siguiente procedimiento. Se trataron tejidos tricotados de algodón teñidos de azul en una lavadora grande para generar pelusas. Los tejidos tricotados de algodón azul con pelusas se trataron en las siguientes condiciones para la eliminación de pelusas y se evaluó la actividad de eliminación de pelusas, juzgando el grado de pelusas eliminadas de los tejidos después del tratamiento en base a una inspección visual.

Máquina de ensayo: Launder Meter L-12 (Daiei Kagaku Seiki MFG., Japón)
 Temperatura: 40°C
 Tiempo: 120 minutos
 pH de reacción: pH 2 (5 mmol/l de tampón citrato)

- 5 A una solución de tratamiento, se añadió una cantidad apropiada de perlas inoxidables junto con cada solución de fracción.

La fracción eluida a una concentración de sulfato de amonio de 0,24 mol/l se desaló usando una columna de desalado PD-10 (GE Healthcare Bio-Sciences) de acuerdo con las condiciones descritas en un manual adjunto, y se ajustó para que llegara a ser de 50 mmol/l de tampón acetato (pH 4,0). La fracción ajustada se aplicó a una columna Resource Mono S (GE Healthcare Bio-Sciences) equilibrada con 50 mmol/l de tampón acetato (pH 4,0), y se eluyó mediante un procedimiento de elución por etapas desde 50 mmol/l de tampón acetato sódico (pH 4,0) hasta 50 mmol/l de tampón acetato sódico (pH 5,0) que contenía 1 mol/l de cloruro sódico, en aumentos de 0,1 mol de NaCl, para recoger las fracciones. Como resultado, la actividad de eliminación de pelusas de un tejido de algodón coloreado se detectó en la fracción que pasaba a través de la columna sin adsorberse por la columna. Esta fracción de flujo continuo se aplicó a una columna Resource Mono Q (GE Healthcare Bio-Sciences) equilibrada con 50 mmol/l de tampón acetato (pH 4,0), y se eluyó mediante un procedimiento de elución por etapas desde 50 mmol/l de tampón acetato (pH 4,0) hasta 50 mmol/l de tampón acetato (pH 5,0) que contenía 1 mol/l de cloruro sódico, en aumentos de 0,1 mol de NaCl, para recoger las fracciones. Como resultado, la actividad de eliminación de pelusas de un tejido de algodón coloreado se detectó en la fracción que pasaba a través de la columna sin adsorberse por la columna. La fracción de flujo continuo resultante se concentró usando una membrana de ultrafiltración de 10 kDa de punto de corte (Millipore) para determinar una fracción de PPCE. Esta fracción de PPCE mostraba actividad CMCasa. Después, la solución en bruto de preparación de celulosa y las fracciones activas obtenidas en las etapas anteriores de purificación en columna se sometieron a SDS-PAGE. Esta SDS-PAGE se realizó usando un aparato de electroforesis Safety Cell Mini STC-808 (Tefco) y un gel Precast Mini de SDS al 12%-PAGEmini, 1,0 mm de grosor del gel (Tefco) de acuerdo con protocolos adjuntos al mismo. Se usó calibración PMB para electroforesis en SDS (GE Healthcare Bio-Sciences) como marcadores moleculares. Después de la electroforesis, el gel se tiñó con azul brillante de Coomassie R-250 (Nacalai Tesque), y se decoloró. Como resultado, se descubrió que una proteína que tenía un peso molecular (PM) promedio de aproximadamente 26 kDa se concentraba gradualmente por cada etapa de purificación. En particular, el contenido de la proteína de aproximadamente 26 kDa se aumentaba de forma remarcada en la fracción de PPCE, en comparación con la solución en bruto de preparación de celulosa. A partir de estos resultados, se supuso que el componente que tenía la actividad de eliminar pelusas de un tejido de algodón coloreado era la proteína que tiene un peso molecular (PM) promedio de aproximadamente 26 kDa, y se realizaron los siguientes experimentos.

35 Ejemplo 2: Identificación de la secuencia de aminoácidos N-terminal de PPCE derivada de *Penicillium pinophilum* PF1365

La fracción de PPCE obtenida en el Ejemplo 1 se sometió a SDS-PAGE, y se transfirió eléctricamente en una membrana PVDF (Millipore) usando Multiphor II (GE Healthcare Bio-Sciences). La membrana se tiñó con azul brillante G (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.), y se decoloró. De la membrana, se escindió la parte sobre la que se transfirió una proteína (PPCE) que tenía un peso molecular de aproximadamente 26 kDa. Este trozo se sometió a un secuenciador de proteínas Modelo 492 (Applied Biosystems) para determinar la secuencia de aminoácidos N-terminal, pero no se detectaron señales de degradación de Edman. Se reveló a partir de este resultado que el aminoácido N-terminal estaba protegido por modificación.

45 La membrana escindida se sumergió en una solución de polivinilpirrolidona-40 al 0,5% (Sigma)/100 mmol/l de ácido acético a 37°C durante 30 minutos para bloquear las partes no unidas a proteína en la membrana, y se trató con piroglutamato aminopeptidasa Pfu (Takara Bio) a 50°C durante 5 horas para retirar el resto N-terminal modificado de la proteína. La membrana resultante se volvió a someter al secuenciador de proteínas para obtener la siguiente secuencia de aminoácidos. Xaa es un resto desconocido de aminoácido.

Resultado de secuenciación: Gln-Ser-Leu-Xaa-Ser-Gln-Tyr-Ser-Ser-Tyr-Thr-Ser (12 restos) (SEC ID N° 1)

50 Como se obtuvieron señales tratando el aminoácido N-terminal protegido con piroglutamato aminopeptidasa Pfu, se considera que el aminoácido N-terminal de PPCE es ácido piroglutámico (pyroGlu). Además, se supone que Xaa es cisteína (Cys), porque una señal derivada de cisteína no es detectable con este secuenciador de proteínas. Por lo tanto, la secuencia de aminoácidos N-terminal de PPCE se considera la siguiente secuencia.

Secuencia de aminoácidos N-terminal de PPCE: Gln-Gln-Ser-Leu-Cys-Ser-Gln-Tyr-Ser-Ser-Tyr-Thr-Ser (13 restos; la Gln N-terminal está modificada en pyroGlu.) (SEC ID N° 2)

55 Cuando se usó esta secuencia de aminoácidos N-terminal para realizar una búsqueda de homología (GENETYX; GENETYX Corporation), esta secuencia mostró una homología con la secuencia de aminoácidos de endoglucanasa III (RU 2238974) derivada de *Penicillium verruculosum*. Este resultado sugirió que PPCE era una endoglucanasa que pertenece a la familia 12.

Ejemplo 3: Amplificación por PCR del gen de la endoglucanasa PPCE

Como la secuencia de aminoácidos N-terminal de PPCE tenía homología con la de endoglucanasa III derivada de Penicillium verrucosum que pertenece a la familia 12, se intentó amplificar un gen de endoglucanasa PPCE derivado de Penicillium pinophilum PF1365 por PCR en base a la secuencia de nucleótidos de EG III descrita en el documento RU 2238974.

(1) Aislamiento de ADN cromosómico derivado de Penicillium pinophilum PF1365

Penicillium pinophilum PF1365 se cultivó en el medio TS a 28°C durante 24 horas, y se centrifugó para recoger los micelios. Se usó un kit (ISOPLANT; Nippon Gene Co., Ltd.) para extraer el ADN cromosómico de los micelios obtenidos. La extracción se realizó de acuerdo con las condiciones descritas en el manual adjunto al mismo.

(2) Amplificación de fragmento génico de endoglucanasa de la familia 12 derivada de Penicillium pinophilum PF1365 por PCR

Se prepararon cebadores sintéticos que tenían las siguiente secuencias en base a las secuencias de aminoácidos N-terminal y C-terminal de la endoglucanasa III derivada de Penicillium verrucosum.

MSW-N: CAACAGAGTCTATGCGCTCAATACTCGAGCTACACCAGT (SEC ID N° 5)

MSW-C: CTAATTGACAGCTGCAGACCAA (SEC ID N° 6)

Se realizó una reacción de PCR usando los cebadores anteriores (MSW-N, MSW-C), el ADN cromosómico preparado en el Ejemplo 3(1) como molde, y un kit LA PCR™ Kit Ver2.1 (Takara Bio). Esta reacción de PCR se realizó realizando una reacción a 94°C durante 1 minuto, repitiendo un ciclo que consiste en una reacción a 94°C durante 30 segundos, una reacción a 60°C durante 30 segundos, y una reacción a 72°C durante 1 minuto 20 veces, y realizando una reacción a 72°C durante 10 minutos. El líquido de reacción resultante se sometió a electroforesis en gel de agarosa. Como resultado, se confirmó que se amplificaba un fragmento génico de aproximadamente 0,8 kpb, y por tanto, se intentó clonar este fragmento para determinar la secuencia de nucleótidos del mismo. El fragmento génico de aproximadamente 0,8 kpb, que se aisló por electroforesis en gel de agarosa, se escindió del gel, y se usó un sistema Wizard SVGel y PCR Clean-Up (Promega) para purificar el ADN. La purificación se realizó de acuerdo con las condiciones descritas en el manual adjunto al mismo. El ADN purificado resultante de aproximadamente 0,8 kpb se clonó en un vector TOPO (PCR 2.1-TOPO) usando un kit de clonación TOPO TA (Invitrogen). El plásmido resultante se amplificó y extrajo para determinar la secuencia de ADN del mismo de acuerdo con procedimientos convencionales. Esta extracción del plásmido se realizó usando un kit QIAfilter Plasmid (Xiagen) de acuerdo con las condiciones descritas en el manual adjunto al mismo. La secuencia de nucleótidos del ADN se determinó mediante una reacción usando un kit dRhodamine Terminator (Applied Biosystems) y el cebador universal M13 o un cebador Inv (Inverso) que tiene la siguiente secuencia como cebador.

Rev: CAGGAAACAGCTATGAC (SEC ID N° 7)

Esta reacción se realizó de acuerdo con las condiciones descritas en el manual adjunto al mismo. El líquido de reacción resultante se purificó de acuerdo con las condiciones descritas en el manual adjunto al mismo, y se analizó usando un analizador genético ABI PRISM 310 (Applied Biosystems). Como resultado, el fragmento génico amplificado por PCR era un gen que tenía homología con la endoglucanasa III derivada de Penicillium verrucosum.

Ejemplo 4: Clonación de fragmento génico de endoglucanasa de la familia 12 derivada de Penicillium pinophilum PF1365 por paseo genómico

Se intentó amplificar las regiones cadena arriba y cadena abajo del fragmento génico amplificado por PCR de la endoglucanasa de la familia 12 derivada de Penicillium pinophilum PF1365 usando un kit GenomeWalker (Becton, Dickinson and Company). Esta amplificación se realizó de acuerdo con las condiciones descritas en el manual adjunto al mismo. El ADN cromosómico extraído de Penicillium pinophilum PF1365 se digirió completamente con la enzima de restricción PvuII o StuI, y los fragmentos digeridos resultantes del ADN cromosómico se ligaron a un adaptador adjunto al kit para construir bibliotecas PvuII y StuI. Además, se prepararon cebadores sintéticos que tienen las siguientes secuencias en base a la secuencia determinada en el Ejemplo 3 para usar reacciones de PCR descritas a continuación.

24-GSP-R1: CGCCAGAGCTGGAAATGGAGTTGACATAAG (SEC ID N° 8)

24-GSP-R2: GTGCACTGGGAGCCAGAGCCACTGCTCTCA (SEC ID N° 9)

24-GSP-F1: TTTGGTATGATCTTACAGCCAGCGGATA (SEC ID N° 10)

24-GSP-F2: ATCAACCATGTTACCTACAGTGTTGACTAT (SEC ID N° 11)

Se realizó una reacción de PCR usando la biblioteca PvuII o StuI como molde, el cebador 24-GSP-R1 o 24-GSP-F1 y un cebador AP-1 adjunto al kit, y la premezcla Ex Taq (Takara Bio). Esta reacción de PCR se realizó realizando una reacción a 94°C durante 2 minutos, repitiendo el ciclo que consiste en una reacción a 94°C durante 2 segundos y una reacción a 72°C durante 3 minutos 7 veces, repitiendo un ciclo que consiste en una reacción a 94°C durante 2 segundos y una reacción a 67°C durante 3 minutos 32 veces, y realizando una reacción a 67°C durante 4 minutos. El líquido de reacción de PCR obtenido por la primera reacción de PCR se diluyó con agua desionizada, y la segunda reacción de PCR se realizó usando el líquido diluido como molde, el cebador 24-GSP-R2 o 24-GSP-F2 y

un cebador AP-2 adjunto al kit, y premezcla Ex Taq (Takara Bio). Esta reacción de PCR se realizó realizando una reacción a 94°C durante 2 minutos, repitiendo un ciclo que consiste en una reacción a 94°C durante 2 segundos y una reacción a 72°C durante 3 minutos 5 veces, repitiendo un ciclo que consiste en una reacción a 94°C durante 2 segundos y una reacción a 67°C durante 3 minutos 20 veces, y realizando una reacción a 67°C durante 4 minutos.

El líquido de reacción resultante se sometió a electroforesis en gel de agarosa. Como resultado, se confirmó que se amplificaba un fragmento génico de aproximadamente 2 kpb en la muestra obtenida usando la biblioteca PvuII como molde, realizando la primera reacción de PCR usando el cebador 24-GSP-R1 y el cebador AP-1, y realizando la segunda reacción de PCR usando el cebador 24-GSP-R2 y el cebador AP-2. Además, se confirmó que se amplificaba un fragmento génico de aproximadamente 2 kpb en la muestra obtenida usando la biblioteca StuI como molde, realizando la primera reacción de PCR usando el cebador 24-GSP-F1 y el cebador AP-1, y realizando la segunda reacción de PCR usando el cebador 24-GSP-F2 y el cebador AP-2. Estos fragmentos génicos de aproximadamente 2 kpb se escindieron de los geles, y se usó un kit de extracción de gel QIAQUICK (Xiagen) para purificar los ADN. La purificación se realizó de acuerdo con las condiciones descritas en el manual adjunto al mismo. Los ADN purificados resultantes de aproximadamente 2 kpb se clonaron individualmente en un vector TOPO (PCR 2.1-TOPO) usando un kit de clonación TOPO PCR (Invitrogen).

Los plásmidos resultantes se amplificaron y se purificaron para determinar las secuencias de ADN de los mismos de acuerdo con procedimientos convencionales. Esta purificación de los plásmidos se realizó usando un kit QIAPREP MINIPREP (Xiagen) de acuerdo con las condiciones descritas en el manual adjunto al mismo. Las secuencias de nucleótidos de los ADN se determinaron mediante una reacción usando un kit dRhodamine Terminator (Applied Biosystems) y el cebador universal M13 o el cebador Inv como cebador. Esta reacción se realizó de acuerdo con las condiciones descritas en el manual adjunto al mismo. Los líquidos de reacción resultantes se purificaron de acuerdo con las condiciones descritas en el manual adjunto al mismo, y se analizaron usando un analizador genético ABI PRISM 310 (Applied Biosystems).

Como resultado, el producto de PCR de aproximadamente 2 kpb derivado de la biblioteca PvuII contenía la región cadena arriba del gen obtenido en el Ejemplo 3(2), y el producto de PCR de aproximadamente 2 kpb derivado de la biblioteca StuI contenía la región cadena abajo del gen obtenido en el Ejemplo 3(2). Estas secuencias de nucleótidos de los productos de PCR se ligaron para determinar la longitud completa de la secuencia de nucleótidos del gen de PPCE derivado de Penicillium pinophilum PF1365. La secuencia de nucleótidos determinada del gen de PPCE (SEC ID N° 3) contenía una región homóloga con la región codificante del gen de la endoglucanasa III derivado de Penicillium verrucosum. La homología entre estos genes calculada usando un software de procesamiento de información genética disponible en el mercado GENETYX (GENETYX Corporation) fue del 82%. La homología de la secuencia de aminoácidos (SEC ID N° 4) deducida a partir de la secuencia de nucleótidos del fragmento de ADN de PPCE con la de la endoglucanasa III derivada de Penicillium verrucosum se calculó usando el GENETYX (GENETYX Corporation) como del 86%. Se realizó una búsqueda blastp, basada en la secuencia de aminoácidos (SEC ID N° 4) deducida a partir de la secuencia de nucleótidos del fragmento de ADN, frente a la base de datos conocida NCBI para descubrir que tenía una homología del 72% con la de la FI-CMCasa derivada de Aspergillus aculeatus y una homología del 53% con la de EG III derivada de Trichoderma reesei. Como todas estas proteínas eran endoglucanasas que pertenecían a la familia 12, se consideró que el fragmento de ADN obtenido era un fragmento génico que contenía la región codificante de un gen de endoglucanasa de la familia 12 derivado de Penicillium pinophilum PF1365 y las regiones cadena arriba y cadena abajo de la misma.

Ejemplo 5: Expresión del gen de PPCE en Trichoderma viride

(1) Clonación del fragmento génico para la expresión de PPCE

Se diseñaron los siguientes cebadores para mutagénesis que tienen el sitio de reconocimiento por StuI cadena arriba del codón de inicio y el sitio de reconocimiento por PstI cadena abajo del codón de terminación, y se amplificó el gen de PPCE por PCR.

32228-NSTU: CCAGGCCTGCGCATCATGAAGCTAACTTTTCTCCTG (SEC ID N° 12)

32228-CPST: CCCTGCAGCTAATTGACAGAAGCAGACC (SEC ID N° 13)

Esta reacción de PCR se realizó usando el ADN cromosómico de Penicillium pinophilum PF1365 obtenido en el Ejemplo 3(1) como molde, cebadores sintéticos de ADN 32228-NSTU y 32228-CPST, y premezcla Ex Taq (Takara Bio), realizando una reacción a 94°C durante 2 minutos, repitiendo un ciclo que consiste en una reacción a 94°C durante 1 minuto, una reacción a 50°C durante 2 minutos, y una reacción a 72°C durante 1,5 minutos 25 veces, y realizando una reacción a 72°C durante 3 minutos. La muestra después de la reacción se sometió a electroforesis en gel de agarosa, y se escindió un fragmento génico de aproximadamente 800 pb y se purificó usando un kit de extracción de gel QIAQUICK (Xiagen) de acuerdo con las condiciones descritas en el manual adjunto al mismo. El ADN purificado resultante se clonó en un vector TOPO (PCR 2.1-TOPO) usando un kit de clonación TOPO PCR (Invitrogen). El plásmido resultante se denominó p28FULL18. El plásmido p28FULL18 se amplificó y se purificó de acuerdo con procedimientos convencionales, para determinar la secuencia de ADN del mismo como se ha descrito anteriormente. Como resultado, se confirmó que el plásmido p28FULL18 contenía el gen de PPCE que tiene el sitio de reconocimiento por StuI cadena arriba del codón de inicio y el sitio de reconocimiento por PstI cadena abajo del codón de terminación. La secuencia de nucleótidos del gen de PPCE contenida en el plásmido p28FULL18 coincidía con la secuencia de nucleótidos de la región codificante de PPCE determinada en el Ejemplo 4 y, por tanto, este

fragmento génico se usó en los siguientes procedimientos para expresar el gen de PPCE.

(2) Construcción de plásmido para expresar PPCE

El plásmido p28FULL18 se digirió con las enzimas de restricción StuI y PstI, y la muestra después de la reacción se sometió a electroforesis en gel de agarosa. El fragmento génico de aproximadamente 800 pb se escindió del gel, y se usó un kit de extracción de gel QIAQUICK (Xiagen) para purificar el ADN. El plásmido pCBI-M2 (Ejemplo B1 del documento WO 2005/056787) se digirió con las enzimas de restricción StuI y PstI, y la muestra después de la reacción se sometió a electroforesis en gel de agarosa. Se escindió un fragmento génico de aproximadamente 5,6 kpb del gel, y se usó un kit de extracción de gel QIAQUICK (Xiagen) para purificar el ADN. Este fragmento génico de aproximadamente 5,6 kpb se ligó al fragmento génico previamente obtenido de aproximadamente 800 pb usando un kit de ligamiento de ADN TaKaRa Ver.1 (Takara Bio) para construir el plásmido pPPCE-F2.

(3) Preparación de Trichoderma viride transformante con plásmido pPPCE-F2

Trichoderma viride se transformó con el plásmido PPCE-F2 obtenido en el Ejemplo 5(2) de acuerdo con los procedimientos descritos en el documento WO 2005/056787. Es decir, esta transformación se realizó mediante un procedimiento de co-transformación usando Trichoderma viride cepa 2 deficiente en un gen para la biosíntesis de uracilo (pyr4) como huésped y un gen pyr4 de Neurospora crassa como marcador de selección. Más particularmente, de acuerdo con el procedimiento descrito en el documento WO 2005/056787, se prepararon protoplastos de Trichoderma viride cepa 2, y se mezclaron 100 µl de la suspensión de protoplastos con 7 µg del plásmido pPPCE-F2 y 3 µg del plásmido pPYR4 (un plásmido preparado por subclonación del gen pyr4 de Neurospora crassa en LITMUS28). Después de dejar esta mezcla en reposo en hielo durante 5 minutos, se añadieron 400 µl de una solución de PEG (polietilenglicol 4000 al 60%, 10 mmol/l de cloruro de calcio, y 10 mmol/l de tampón Tris-HCl, pH 7,5) a la mezcla, y se dejó reposar en hielo durante 20 minutos. La suspensión resultante de protoplastos se lavó con un tampón SUTC (0,5 mol/l de sacarosa, 10 mmol/l de cloruro de calcio, y 10 mmol/l de tampón Tris-HCl, pH 7,5), se recubrió con agar blando en un medio mínimo que contenía 0,5 mol/l de sacarosa, y se cultivó a 28°C durante 5 días. Después del cultivo, las colonias cultivadas se transfirieron en el medio mínimo, y las colonias cultivadas en este medio se usaron como transformantes en los siguientes procedimientos.

(4) Cultivo de Trichoderma viride transformante con plásmido pPPCE-F2

De los transformantes obtenidos en el Ejemplo 5(3), se inocularon 50 cepas en un medio PSW (glucosa al 1,0%, lactosa al 4,0%, torta de soja al 2,0%, germen de trigo al 1,0%, dihidrogenofosfato potásico al 0,2%, sulfato de amonio al 0,2%, fosfato de amonio al 0,2%, carbonato de calcio al 0,2%) y se cultivaron a 28°C durante 5 días. Después del cultivo, se retiraron los micelios por centrifugación para obtener sobrenadantes de cultivo como soluciones enzimáticas en bruto. Estas soluciones enzimáticas en bruto se sometieron a SDS-PAGE, y se confirmó que se expresaba específicamente una proteína de aproximadamente 26 kDa en los transformantes. El sobrenadante de cultivo de la cepa 322F-205, que expresaba de forma muy elevada la proteína, se usó para realizar el siguiente ensayo de lavado.

Ejemplo 6: Evaluación de actividad de eliminación de pelusas en cepa que expresa el gen de PPCE

(1) Medición de la concentración de proteína expresada

Para evaluar una actividad de eliminación de pelusas de la cepa que expresa el gen de PPCE, se expresó cada gen de EG III derivada de Trichoderma reesei (referencia no de patente 1), SCE3 derivada de Trichoderma viride (patente de referencia 5), y FI-CMCasa derivada de Aspergillus aculeatus (referencia no de patente 2) en Trichoderma viride, y se prepararon sobrenadantes de cultivo del mismo, como controles, de acuerdo con los procedimientos descritos en el Ejemplo 5. Estos sobrenadantes de cultivo para controles, y el sobrenadante de cultivo de la cepa que expresa el gen de PPCE se sometieron a SDS-PAGE usando un gel al 12% de acuerdo con los procedimientos descrito en el Ejemplo 1. Después de la electroforesis, el gel se tiñó usando un tinte de gel de proteínas SYPRO Ruby (Invitrogen) y se lavó con agua. Las bandas se analizaron usando un Molecular Imager FX (Bio-Rad Laboratories) y un Quantity One (Bio-Rad Laboratories) para determinar la relación de la proteína expresada a las proteínas totales. Además, se ensayó la concentración de proteínas totales contenidas en cada sobrenadante de cultivo usando γ globulina bovina como patrón y un kit de ensayo de proteínas (Bio-Rad Laboratories). La concentración de la proteína expresada se calculó multiplicando la concentración de proteínas totales por la relación de la proteína expresada.

Tabla 1

Cantidad de proteína expresada en transformantes de <u>Trichoderma</u>			
Proteína activa	Concentración de proteínas totales	Relación de proteína expresada	Concentración de proteína expresada
PPCE (presente invención)	13,2 µg/ml	6,1%	0,81 µg/ml
EG III	11,8 µg/ml	18,1%	2,1 µg/ml

(continuación)

Cantidad de proteína expresada en transformantes de <i>Trichoderma</i>			
SCE3	14,7 µg/ml	17,9%	2,6 µg/ml
FI-CMCasa	13,3 µg/ml	9,8%	1,3 µg/ml

(2) Medición de la actividad de eliminación de pelusas de algodón coloreado

5 Los sobrenadantes de cultivo de la cepa que expresaba PPCE y las cepas de control preparadas en el Ejemplo 6(1) se usaron para medir la actividad de eliminación de pelusas de la misma. Más particularmente, se trataron tejidos tricotados de algodón teñidos de marrón en una lavadora grande para generar pelusas. Los tejidos tricotados de algodón marrones con pelusas se trataron en las siguientes condiciones para la eliminación de pelusas y se evaluó la actividad de eliminación de pelusas, juzgando el grado de pelusas eliminadas de los tejidos después del tratamiento en base a una evaluación visual.

10 Máquina de ensayo: Launder Meter L-12 (Daiei Kagaku Seiki MFG., Japón)
 Temperatura: 40°C
 Tiempo: 60 minutos
 Solución de reacción: 5 mmol/l de tampón acetato (pH 4) 40 ml

15 A una solución de tratamiento, se añadió una cantidad apropiada de perlas inoxidables junto con cada sobrenadante de cultivo.

20 Se muestran los volúmenes de sobrenadantes de cultivo necesarios para retirar aproximadamente el 50% de las pelusas formadas en base a una evaluación visual en la Tabla 2. También se calcularon las cantidades de la proteína expresada usadas para retirar el 50% de las pelusas a partir de las concentraciones de proteína expresada determinadas en el Ejemplo 6(1). Como resultado, se esclareció que la cantidad de PPCE requería el mínimo de proteína para retirar las pelusas de los tejidos.

Tabla 2

Actividad de eliminación de pelusas en cepa que expresaba PPCE		
Proteína activa	Volumen de sobrenadante de cultivo que elimina el 50% de las pelusas	Cantidad de proteína expresada que elimina el 50% de las pelusas
PPCE (presente invención)	100 µl	0,081 µg
EG III	140 µl	0,29 µg
SCE3	150 µl	0,39 µg
FI-CMCasa	200 µl	0,26 µg

Ejemplo 7: Perfiles de temperatura y pH en la actividad de eliminación de pelusas de PPCE

(1) Perfil de temperatura en la actividad de eliminación de pelusas de PPCE

25 Los sobrenadantes de cultivo de las cepas que expresaban PPCE y EG III usadas en el Ejemplo 6 se usaron para examinar perfiles de temperatura en las siguientes condiciones para lavado. Después del tratamiento de lavado, se juzgaron los grados de eliminación de pelusas de los tejidos en base a una inspección visual, y se calcularon los volúmenes de sobrenadantes de cultivo necesarios para retirar aproximadamente el 50% de las pelusas en base a una inspección visual. Las actividades relativas se determinaron a partir de los volúmenes, cuando la actividad a la temperatura que muestra la mayor actividad de eliminación de pelusas en cada muestra se consideró del 100%.
 30 Como se muestra en la Tabla 3, la temperatura óptima de PPCE fue de 30°C, y la de EG III fue de 40°C.

Máquina de ensayo: Launder Meter L-12 (Daiei Kagaku Seiki MFG., Japón)
 Temperatura: 20°C a 60°C
 Tiempo: 60 minutos
 Solución de reacción: 5 mmol/l de tampón acetato (pH 4) 40 ml

35 A una solución de tratamiento, se añadió una cantidad apropiada de perlas inoxidables junto con cada sobrenadante de cultivo.

Tabla 3

Perfil de temperatura de cepa que expresaba PPCE		
Temperatura de reacción	PPCE (presente invención)	EG III
	Actividad relativa (%)	Actividad relativa (%)
20°C	80	75

(continuación)

Perfil de temperatura de cepa que expresaba PPCE		
30°C	100	85
40°C	95	100
50°C	80	80
60°C	40	50

(2) Perfil de pH en la actividad de eliminación de pelusas de PPCE

5 Los sobrenadantes de cultivo de las cepas que expresaban PPCE y EG III usadas en el Ejemplo 6 se usaron para examinar perfiles de pH en las siguientes condiciones para lavado. Después del tratamiento de lavado, se juzgaron los grados de eliminación de pelusas de los tejidos en base a una inspección visual, y se calcularon los volúmenes de sobrenadantes de cultivo necesarios para retirar aproximadamente el 50% de las pelusas en base a una inspección visual. Las actividades relativas se determinaron a partir de los volúmenes, cuando la actividad al pH que muestra la mayor actividad de eliminación de pelusas en cada muestra se consideró del 100%. Como se muestra en la Tabla 4, el pH óptimo de PPCE fue pH 3, y el de EG III fue pH 4.

Máquina de ensayo: Launder Meter L-12 (Daiei Kagaku Seiki MFG., Japón)

Temperatura: 40°C

Tiempo: 60 minutos

Solución de reacción: 5 mmol/l de tampón citrato o tampón acetato (pH 2 a 6) 40 ml

15 A una solución de tratamiento, se añadió una cantidad apropiada de perlas inoxidables junto con cada sobrenadante de cultivo.

Tabla 4

Perfil de pH de cepa que expresaba PPCE		
Tampón, pH	PPCE	EG III
	Actividad de lavado (%)	Actividad de lavado (%)
Citrato, pH 2	85	25
Citrato, pH 3	100	45
Citrato, pH 4	90	100
Acetato, pH 4	90	90
Acetato, pH 5	30	55
Acetato, pH 6	10 o menos	10

Ejemplo 8: Expresión del gen de PPCE de codones optimizados en *Trichoderma viride*

(1) Clonación del gen de PPCE de codones optimizados

20 Se sintetizó un gen de PPCE que consistía solamente en los codones altamente usados en el género *Trichoderma* por reacciones de PCR.

a) Preparación del fragmento PCEM1-2

Se prepararon dos oligonucleótidos sintéticos que tenían las siguientes secuencias.

PCEM-1:

25 CCAGGCCTGCGCATCATGAAGCTGACCTTCCTGCTGAACCTGGCCGTCGCCGCCAGCGCC
CAGCAGAGCCTGTGCAGCCAGTACAGCAGCTACAC (SEC ID N° 14)

PCEM-2:

TGGCTGCCGCTGCCGCTGCTCTCGCCCCACAGGTTGTTGTTGACGCTGTACTGGCCGCTG
GTGTAGCTGCTGTACTGGCT (SEC ID N° 15)

30 Se realizó una reacción de PCR usando 20 pmol de los cebadores anteriores (PCEM-1 y PCEM-2) y la ADN polimerasa Primestar MAX (Takara), en ausencia de molde, repitiendo un ciclo que consiste en una reacción a 98°C durante 10 segundos, una reacción a 55°C durante 5 segundos, y una reacción a 72°C durante 30 segundos 30 veces. El ADN resultante se purificó del líquido de reacción usando un kit de purificación de PCR QIAQUICK (Xiagen), y se eluyó en 50 µl de un tampón TE, de acuerdo con las condiciones descritas en el manual adjunto al mismo. El fragmento de ADN resultante de aproximadamente 150 pb se denominó PCEM1-2.

b) Preparación del fragmento PCEM3-4

Se prepararon dos oligonucleótidos sintéticos que tenían las siguientes secuencias.

PCEM-3:
AGCAGCGGCAGCGGCAGCCAGTGCACCTACGTCAACAGCATCAGCAGCAGCGGCGTCAGC
TGGAGCACCACTGGAACTG (SEC ID N° 16)

5 PCEM-4:
TTGGTCAGGCCGCTCAGCTGGCTGTTGGCGTAGCTCTTGACGCTGGTGCTGCCGCCGCTC
CAGTTCCAGGTGGTGCTCCA (SEC ID N° 17)

Se realizó una reacción de PCR usando 20 pmol de los cebadores anteriores (PCEM-3 y PCEM-4) en ausencia de molde, y se purificó el fragmento resultante, de acuerdo con los procedimientos descritos en el Ejemplo 8(1)a). El fragmento de ADN resultante de aproximadamente 140 pb se denominó PCEM3-4.

10 c) Preparación del fragmento PCEM5-6

Se prepararon dos oligonucleótidos sintéticos que tenían las siguientes secuencias.

PCEM-5:
CAGCTGAGCGGCCTGACCAAGAAGCTGGTCAGCAACCTGCAGAGCATCCCCACCAGCGTC
CAGTGGAGCTACAGCAACAC (SEC ID N° 18)

15 PCEM-6:
GTGACGTGGTTGATGTCGGCGGCGGTGAACAGGTCGTAGCTGACGTCGGCGACGATGTTG
GTGTTGCTGTAGCTCCACTG (SEC ID N° 19)

20 Se realizó una reacción de PCR usando 20 pmol de los cebadores anteriores (PCEM-5 y PCEM-6) en ausencia de molde, y se purificó el fragmento resultante, de acuerdo con los procedimientos descritos en el Ejemplo 8(1)a). El fragmento de ADN resultante de aproximadamente 140 pb se denominó PCEM5-6.

d) Preparación del fragmento PCEM7-8

Se prepararon dos oligonucleótidos sintéticos que tenían las siguientes secuencias.

25 PCEM-7:
GCCGACATCAACCACGTCACCTACAGCGGCGACTACGAGCTGATGATCTGGTAAATATGC
CCCCGTCGATTTCAAGTAT (SEC ID N° 20)

PCEM-8:
CAGGGGCTGGGCGCCGCGTACTTGCCAGCCTGATATCTTGATTAGCGGGAGATGTCTC
ATACTTGAAATACGACGGGG (SEC ID N° 21)

30 Se realizó una reacción de PCR usando 20 pmol de los cebadores anteriores (PCEM-7 y PCEM-8) en ausencia de molde, y se purificó el fragmento resultante, de acuerdo con los procedimientos descritos en el Ejemplo 8(1)a).

El fragmento de ADN resultante de aproximadamente 140 pb se denominó PCEM7-8.

e) Preparación del fragmento PCEM9-10

Se prepararon dos oligonucleótidos sintéticos que tenían las siguientes secuencias.

35 PCEM-9:
ACGGCGGCGCCCAGCCCCTGGGCAGCCAGATCGGCACCGCCAACGTCGGCGGCGCCACCT
GGCAGCTGTGGTACGGCGTC (SEC ID N° 22)

PCEM-10:
GCCGTTCCAGCTGGTGGTCTGGCTGCTGGCGACGAAGCTGTAGGTCTTCTGGCTGCCGTT
GACGCCGTACCACAGCTGCC (SEC ID N° 23)

40 Se realizó una reacción de PCR usando 20 pmol de los cebadores anteriores (PCEM-9 y PCEM-10) en ausencia de molde, y se purificó el fragmento resultante, de acuerdo con los procedimientos descritos en el Ejemplo 8(1)a). El fragmento de ADN resultante de aproximadamente 140 pb se denominó PCEM9-10.

f) Preparación del fragmento PCEM11-12

Se prepararon dos oligonucleótidos sintéticos que tenían las siguientes secuencias.

45 PCEM-11:
AGACCACCAGCTGGAACGGCGACATCCTGCAGTTCTTCAAGTACCTGCAGAGCAACCAGG
GCTTCCCCGCCAGCAGCCAG (SEC ID N° 24)

PCEM-12:

ATCATGTCAGATACAAGGAGTCTATAGGAACAGAAAGGGTCATGGCTTACCGATCAGGTA
CTGGCTGCTGGCGGGGAAGC (SEC ID N° 25)

5 Se realizó una reacción de PCR usando 20 pmol de los cebadores anteriores (PCEM-11 y PCEM-12) en ausencia de molde, y se purificó el fragmento resultante, de acuerdo con los procedimientos descritos en el Ejemplo 8(1)a). El fragmento de ADN resultante de aproximadamente 140 pb se denominó PCEM11-12.

g) Preparación del fragmento PCEM13-14

Se prepararon dos oligonucleótidos sintéticos que tenían las siguientes secuencias.

10 PCEM-13:
CTCCTTGATCTGACATGATTGCTTCGGTATCAGACCTGCAGTTCGGCACCGAGCCCTTC
ACCGGCAGCCAGACCACCT (SEC ID N° 2 6)

PCEM-14:
CCCTCGAGCTAGTTGACGCTGGCGCTCCAGTGGTTGACGGTCAGGGTGGTCTGGCTG CCGGT (SEC ID N° 27)

15 Se realizó una reacción de PCR usando 20 pmol de los cebadores anteriores (PCEM-13 y PCEM-14) en ausencia de molde, y se purificó el fragmento resultante, de acuerdo con los procedimientos descritos en el Ejemplo 8(1)a). El fragmento de ADN resultante de aproximadamente 120 pb se denominó PCEM13-14.

h) Preparación del fragmento PCEM1-4

20 Se realizó una segunda reacción de PCR usando 1 µl de PCEM1-2 obtenido en el Ejemplo 8(1)a) y 1 µl de PCEM3-4 obtenido en el Ejemplo 8(1)b) como moldes, 20 pmol de los cebadores anteriores (PCEM-1 y PCEM-4), y ADN polimerasa Primestar MAX (Takara), repitiendo un ciclo que consiste en una reacción a 98°C durante 10 segundos, una reacción a 55°C durante 5 segundos, y una reacción a 72°C durante 30 segundos 30 veces. El ADN resultante se purificó del líquido de reacción usando un kit de purificación de PCR QIAQUICK (Xiagen), y se eluyó en 50 µl de un tampón TE. El fragmento de ADN resultante de aproximadamente 270 pb se denominó PCEM1-4.

i) Preparación del fragmento PCEM5-8

25 Se realizó una segunda reacción de PCR usando 1 µl de PCEM5-6 obtenido en el Ejemplo 8(1)c) y 1 µl de PCEM7-8 obtenido en el Ejemplo 8(1)d) como moldes, y 20 pmol de los cebadores anteriores (PCEM-5 y PCEM-8). Esta reacción de PCR y una purificación del fragmento resultante se realizaron de acuerdo con los procedimientos descritos en el Ejemplo 8(1)h) para denominar el fragmento de ADN resultante de aproximadamente 260 pb como PCEM5-8.

30 j) Preparación del fragmento PCEM9-12

35 Se realizó una segunda reacción de PCR usando 1 µl de PCEM9-10 obtenido en el Ejemplo 8(1)e) y 1 µl de PCEM11-12 obtenido en el Ejemplo 8(1)f) como moldes, y 20 pmol de los cebadores anteriores (PCEM-9 y PCEM-12). Esta reacción de PCR y una purificación del fragmento resultante se realizaron de acuerdo con los procedimientos descritos en el Ejemplo 8(1)h) para denominar el fragmento de ADN resultante de aproximadamente 260 pb como PCEM9-12.

k) Preparación del fragmento PCEM1-8

40 Se realizó una tercera reacción de PCR usando 1 µl de PCEM1-4 obtenido en el Ejemplo 8(1)h) y 1 µl de PCEM5-8 obtenido en el Ejemplo 8(1)i) como moldes, 20 pmol de los cebadores anteriores (PCEM-1 y PCEM-8), y ADN polimerasa Primestar MAX (Takara), repitiendo un ciclo que consiste en una reacción a 98°C durante 10 segundos, una reacción a 55°C durante 5 segundos, y una reacción a 72°C durante 30 segundos 30 veces.

El ADN resultante se purificó del líquido de reacción usando un kit de purificación de PCR QIAQUICK (Xiagen), y se eluyó en 50 µl de un tampón TE. El fragmento de ADN resultante de aproximadamente 510 pb se denominó PCEM1-8.

l) Preparación del fragmento CEM9-14

45 Se realizó una tercera reacción de PCR usando 1 µl de PCEM9-12 obtenido en el Ejemplo 8(1)j) y 1 µl de PCEM13-14 obtenido en el Ejemplo 8(1)g) como moldes, y 20 pmol de los cebadores anteriores (PCEM-9 y PCEM-14). Esta reacción de PCR y una purificación del fragmento resultante se realizaron de acuerdo con los procedimientos descritos en el Ejemplo 8(1)k) para denominar el fragmento de ADN resultante de aproximadamente 360 pb como PCEM9-14.

50 m) Preparación del plásmido pCR-PCEm

Se realizó una cuarta reacción de PCR usando 1 µl de PCEM1-8 obtenido en el Ejemplo 8(1)k) y 1 µl de PCEM9-14 obtenido en el Ejemplo 8(1)l) como moldes, y 20 pmol de los cebadores anteriores (PCEM-1 y PCEM-14), repitiendo un ciclo que consiste en una reacción a 98°C durante 10 segundos, una reacción a 55°C durante 5 segundos, y una reacción a 72°C durante 30 segundos 30 veces. La muestra después de la reacción se sometió a electroforesis en gel de agarosa. Se escindió un fragmento génico de aproximadamente 800 pb del gel, se purificó usando un kit de extracción de gel QIAQUICK (Xiagen), y se eluyó en 50 µl de un tampón TE. Se añadieron un tampón, dNTP, y EXTaq (Takara) al ADN purificado resultante, y se incubaron a 72°C durante 10 minutos para añadir las bases A al ADN. El ADN tratado se clonó en un vector TOPO (PCR 2.1-TOPO) usando un kit de clonación TOPO PCR (Invitrogen) para denominar al plásmido obtenido como pCR-PCEm. Se amplificó el plásmido pCR-PCEm y se purificó de acuerdo con procedimientos convencionales, y la secuencia de ADN del mismo se analizó de acuerdo con los procedimientos descritos anteriormente. Como resultado, se confirmó que el plásmido pCR-PCEm contenía no solamente la región codificante (SEC ID N° 28) de un gen de PPCE de codones optimizados, sino también el sitio de reconocimiento por StuI cadena arriba del codón de inicio y el sitio de reconocimiento por XhoI cadena abajo del codón de terminación.

15 (2) Construcción de plásmido para expresar PPCE de codones optimizados

Se digirió el plásmido pCR-PCEm con las enzimas de restricción StuI y XhoI, y la muestra después de la reacción se sometió a electroforesis en gel de agarosa. El fragmento génico separado de aproximadamente 800 pb se escindió del gel, y se usó un kit de extracción de gel QIAQUICK (Xiagen) para purificar el ADN.

Se digirió el plásmido pCBI-M2 con las enzimas de restricción StuI y XhoI, y se cogió un fragmento génico de aproximadamente 5,6 kpb y se purificó, de un modo similar al descrito en el Ejemplo 5(2). El fragmento génico previamente obtenido de aproximadamente 800 pb se ligó a este fragmento génico de aproximadamente 5,6 kpb usando Ligation High (TOYOBO) para preparar el plásmido pPPCE-M.

20 (3) Preparación de Trichoderma viride transformante con plásmido pPPCE-M

Trichoderma viride se transformó con el plásmido pPPCE-M obtenido en el Ejemplo 8(2). Es decir, esta transformación se realizó mediante un procedimiento de co-transformación usando Trichoderma viride cepa 2 deficiente en un gen para la biosíntesis de uracilo (pyr4) como huésped y un gen pyr4 de Neurospora crassa como marcador de selección, de acuerdo con los procedimientos descritos en el Ejemplo 5(3). Trichoderma viride cepa 2 se transformó con 7 µg de plásmido pPPCE-M y 3 µg de plásmido pPYR4 para obtener 40 cepas de transformantes.

25 (4) Cultivo de Trichoderma viride transformante con plásmido pPPCE-M

De los transformantes obtenidos en el Ejemplo 8(3), se inocularon 40 cepas en el medio PSW descrito en el Ejemplo 5(4), y se cultivaron a 28°C durante 5 días. Después del cultivo, se retiraron los micelios por centrifugación para obtener sobrenadantes de cultivo como soluciones enzimáticas en bruto. Estas soluciones enzimáticas en bruto se sometieron a SDS-PAGE, y se confirmó que se expresaba específicamente una proteína de aproximadamente 26 kDa en los transformantes. Además, estas soluciones enzimáticas en bruto se usaron para medir la actividad de eliminación de pelusas de las mismas de acuerdo con el Ejemplo 7 (condiciones para la medición: temperatura = 30°C, tiempo = 60 minutos, solución de reacción = 5 mmol/l de tampón citrato, pH 3,0), y se confirmó que la actividad estaba específicamente mejorada en los transformantes en comparación con el huésped no transformado.

30 **Aplicabilidad industrial**

La presente invención es útil para diversos tratamientos para la celulosa, por ejemplo, en el tratamiento de un tejido que contiene celulosa, el destintado de papel de desecho, la mejora de la liberación de agua de pulpa de papel, la mejora de la digestibilidad de pienso animal, y la producción de bioetanol.

Aunque la presente invención se ha descrito con referencia a realizaciones específicas, son posibles diversos cambios y modificaciones obvios para los expertos en la materia sin alejarse del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

35 **Texto libre en la lista de secuencias**

Cada secuencia de las SEC ID N° 5 a 27 en la lista de secuencias es un cebador para la PCR. La secuencia de la SEC ID N° 28 es un gen de codones optimizados (modificado). La secuencia de la SEC ID N° 29 es una secuencia de aminoácidos deducida del gen de codones optimizados (modificado).

40 LISTADO DE SECUENCIAS

50 <110> MI JI SEI KA KAI SHA, LTD.

<120> Endoglucanasa PPCE y preparación de celulasa que contiene la misma

55 <130> MEJ-800

<150> JP 2007-061266
 <151> 12-03-2007

5 <160> 30

<170> Patent In versión 3.1

10 <210> 1
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Penicillium pinophilum* PF1365

15 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa se deduce que es cys un resto que el secuenciador de proteínas no determinó

20 <400> 1

Gln Ser Leu Xaa Ser Gln Tyr Ser Ser Tyr Thr Ser
 1 5 10

25 <210> 2
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> *Penicillium pinophilum* PF1365

30 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> ÁCIDO PIRROLIDÓN CARBOXÍLICO

<400> 2

35 Gln Gln Ser Leu Oys Ser Gln Tyr Ser Ser Tyr Thr Ser
 1 5 10

40 <210> 3
 <211> 834
 <212> ADN
 <213> *Penicillium pinophilum* PF1365

45 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(410)

<220>
 <221> CDS
 <222> (470)..(690)

50 <220>
 <221> CDS
 <222> (755)..(831)

55 <220>
 <221> exón
 <222> (1)..(410)

60 <220>
 <221> sig_peptide
 <222> (1)..(45)

<220>
 <221> Intrón

	<222> (411)..(469)	
	<220>	
5	<221> exón	
	<222> (470)..(690)	
	<220>	
	<221> Intrón	
10	<222> (691)..(754)	
	<220>	
	<221> exón	
	<222> (755)..(831)	
15	<400> 3	
	atg aag cta act ttt ctg ctg aac ctg gcc gtt gcc gca tct gct cag 48	
	Met Lys Leu Thr Phe Leu Leu Asn Leu Ala Val Ala Ala Ser Ala Gln	
	1 5 10 15	
	cag agc cta tgc tct caa tac tgg agc tac acc agt ggc cag tac tcc 96	
	Gln Ser Leu Oys Ser Gln Tyr Ser Ser Tyr Thr Ser Gly Gln Tyr Ser	
	20 25 30	
	gtc aac aac aac cta tgg ggt gag agc agt ggc tct ggc tcc cag tgc 144	
	Val Asn Asn Asn Leu Trp Gly Gu Ser Ser Gly Ser Gly Ser Gln Oys	
	35 40 45	
	act tat gtc aac tcc att tcc agc tct ggc gtt tca tgg tct act acc 192	
	Thr Tyr Val Asn Ser Ile Ser Ser Ser Gly Val Ser Trp Ser Thr Thr	
	50 55 60	
	tgg aac tgg tcc gga ggc agc acc tgg gtc aag agc tal gcc aat tgg 240	
	Trp Asn Trp Ser Gly Gly Ser Thr Ser Val Lys Ser Tyr Ala Asn Ser	
	65 70 75 80	
	cag ttg agt ggc ctg acc aag aag ctg gtc agc aac ttg caa agc att 288	
	Gln Leu Ser Gly Leu Thr Lys Lys Leu Val Ser Asn Leu Gln Ser Ile	
	85 90 95	
	ccg acc tct gtg cag tgg agc tat agc aat acc aac atc gtt gcc gat 336	
	Pro Thr Ser Val Gln Trp Ser Tyr Ser Asn Thr Asn Ile Val Ala Asp	
	100 105 110	
	gtt tgg tat gat ctg ttc acg gca gcg gat atc aac cat gtt acc tac 384	
	Val Ser Tyr Asp Leu Phe Thr Ala Ala Asp Ile Asn His Val Thr Tyr	
	115 120 125	
	agt ggt gac tat gag ctg atg atc tg gtaaatatgc ccccgctgta 430	
	Ser Gly Asp Tyr Gu Leu Met Ile Trp	
	130 135	
	tttcaagtat gagacatctc ccgctaataca agatatacag g ctg ggt aag tac ggc 485	

Leu Gly Lys Tyr Gly
140

ggt gcc cag ccc ct c ggc agt caa at c gga aca gcc aac gt g gga ggc 533
G y Ala G n Pro Leu G y Ser G n Ile G y Thr Ala Asn Val G y G y
145 150 155

gca acc tgg cag ct g tgg tat ggc gt a aac gga tcc caa aaa acg tac 581
Al a Thr Trp G n Leu Trp Tyr G y Val Asn G y Ser G n Lys Thr Tyr
160 165 170

agt ttc gtc gcc tcc agc caa aca act tca tgg aac ggc gat at c ttg 629
Ser Phe Val Ala Ser Ser G n Thr Thr Ser Trp Asn G y Asp Ile Leu
175 180 185 190

cag ttc ttc aag tat cta cag agc aac cag ggc ttt cca gct agc agc 677
G n Phe Phe Lys Tyr 195 Leu G n Ser Asn G n Gly Phe Pro Ala Ser Ser
200 205

cag tac ttg atc g gtaagccatg acccttctcg ttcctataga ctctt g t at 730
G n Tyr Leu Ile
210

ctgacatgal tgcctcggta tcag at ctg caa ttc ggc acg gaa ccg ttt 780
Asp Leu G n Phe Gly Thr Gu Pro Phe
215

aca gga agc cag act act ttg acg gtc aac cat tgg tct gct tct gtc 828
Thr Gly Ser G n Thr Thr Leu Thr Val Asn His Trp Ser Ala Ser Val
220 225 230 235

aat tag 834
Asn

<210> 4
<211> 236
5 <212> PRT
<213> *Penicillium pinophilum* PF1365
<400> 4

Met Lys Leu Thr Phe Leu Leu Asn Leu Ala Val Ala Ala Ser Ala G n
1 5 10 15

G n Ser Leu Cys Ser G n Tyr Ser Ser Tyr Thr Ser Gly G n Tyr Ser
20 25 30

Val Asn Asn Asn Leu Trp Gly Gu Ser Ser Gly Ser Gly Ser G n Cys
35 40 45

Thr Tyr Val Asn Ser Ile Ser Ser Ser Gly Val Ser Trp Ser Thr Thr
50 55 60

Trp Asn Trp Ser Gly Gly Ser Thr Ser Val Lys Ser Tyr Ala Asn Ser
65 70 75 80

G n Leu Ser Gly Leu Thr Lys Lys Leu Val Ser Asn Leu G n Ser Ile
85 90 95

Pro Thr Ser Val G n Trp Ser Tyr Ser Asn Thr Asn Ile Val Ala Asp
100 105 110

10

ES 2 556 728 T3

Val Ser Tyr Asp Leu Phe Thr Ala Ala Asp Ile Asn His Val Thr Tyr
 115 120 125

Ser Gly Asp Tyr Gu Leu Met Ile Trp Leu Gly Lys Tyr Gly Gly Ala
 130 135 140

Gln Pro Leu Gly Ser Gln Ile Gly Thr Ala Asn Val Gly Gly Ala Thr
 145 150 155 160

Trp Gln Leu Trp Tyr Gly Val Asn Gly Ser Gln Lys Thr Tyr Ser Phe
 165 170 175

Val Ala Ser Ser Gln Thr Thr Ser Trp Asn Gly Asp Ile Leu Gln Phe
 180 185 190

Phe Lys Tyr Leu Gln Ser Asn Gln Gly Phe Pro Ala Ser Ser Gln Tyr
 195 200 205

Leu Ile Asp Leu Gln Phe Gly Thr Glu Pro Phe Thr Gly Ser Gln Thr
 210 215 220

Thr Leu Thr Val Asn His Trp Ser Ala Ser Val Asn
 225 230 235

- 5 <210> 5
- <211> 39
- <212> ADN
- <213> secuencia artificial

- 10 <220>
- <223> Descripción de la secuencia artificial: Un cebador para la PCR (MSWN)

- <400> 5
- caacagagt c tatgcgctca at act cgagc t acaccagt 39

- 15 <210> 6
- <211> 22
- <212> ADN
- <213> secuencia artificial

- 20 <220>
- <223> Descripción de la secuencia artificial: Un cebador para la PCR (MSW C)

- <400> 6
- ctaattgaca gctgcagacc aa 22

- 25 <210> 7
- <211> 17
- <212> ADN
- <213> secuencia artificial

- 30 <220>
- <223> Descripción de la secuencia artificial: Un cebador para la PCR (Inv)

- <400> 7
- caggaaacag ctatgac 17

- 35 <210> 8
- <211> 30
- <212> ADN
- <213> secuencia artificial

ES 2 556 728 T3

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Un cebador para la PCR (24-G6P-R1)

5 <400> 8
cgccagagct ggaaatggag ttgacataag 30

<210> 9
<211> 30
10 <212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Un cebador para la PCR (24-GSP-F12)

15 <400> 9
gt gcact ggg agccagagcc actgctctca 30

<210> 10
<211> 30
20 <212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Un cebador para la PCR (24-GSP-F1)

25 <400> 10
tttcgatga t ct t cacg gcagcggat a 30

30 <210> 11
<211> 30
<212> ADN
<213> secuencia artificial

35 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Un cebador para la PCR 24-GSP-F2)

40 <400> 11
at caacat g t acct acag tggtagctat 30

<210> 12
<211> 36
<212> ADN
<213> secuencia artificial

45 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Un cebador para la PCR (32228-NSTU)

50 <400> 12
ccaggcct gc gcat cat gaa gctaactttt ct cct g 36

<210> 13
<211> 28
<212> ADN
55 <213> secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Un cebador para la PCR (32228-CPST)

60 <400> 13
ccctgcagct aattgacaga agcagacc 28

<210> 14
<211> 95
65 <212> ADN
<213> secuencia artificial

ES 2 556 728 T3

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Un cebador para la PCR (PCEM 1)

5 <400> 14

ccaggcct gc gcat cat gaa gct gacct t c ct gct gaacc tggccgt cgc cgccagcgcc 60
cagcagagcc t g tgcagcca gt acagcagc t acac 95

<210> 15
 <211> 80
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

15 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Un cebador para la PCR (PCEM 2)

<400> 15

tggct gccgc t gccgct gct ct cgccccac aggt t g t g t gacgct gt a ct ggccgct g 60
gt gt agct gc t gt act ggct 80

20 <210> 16
 <211> 80
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

25 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Un cebador para la PCR (PCEM 3)

30 <400> 16

agcagcggca gcggcagcca gt gcacct ac gt caacagca t cagcagcag cggcgt cagc 60
tggagcacca cct ggaact g 80

35 <210> 17
 <211> 80
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

40 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Un cebador para la PCR (PCEM 4)

<400> 17

t tgg t caggc cgct cagct g gct gt tggcg t agct ct t ga cgct ggt gct gccgcccgt c 60
cagt t ccagg t ggt gct cca 80

45 <210> 18
 <211> 80
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

50 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Un cebador para la PCR (PCEM 5)

<400> 18

cagct gagcg gcct gaccaa gaagct ggt c agcaacct gc agagcat ccc caccagcgt c 60
cagt ggagct acagcaacac 80

55

ES 2 556 728 T3

5 <210> 19
 <211> 80
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Un cebador para la PCR (PCEM 6)

10 <400> 19

gt gacgt ggt t gat gt cggc ggcggt gaac aggt cgt agc t gacgt cggc gacgat gt t g 60
gt gt t gct gt agct ccact g 80

15 <210> 20
 <211> 80
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Un cebador para la PCR (PCEM 7)

<400> 20

gcccacat ca accacgt cac ct acagcggc gact acgagc t gat gat ct g gt aaat at gc 60
ccccgt cgt a t t t caagt at 80

25 <210> 21
 <211> 80
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

30 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Un cebador para la PCR (PCEM 8)

<400> 21

35 **caggggct gg ggcggccgt act t gccag cct gat at ct t gat t agcgg gagat gt ct c 60**
at act t gaaa t acgacgggg 80

40 <210> 22
 <211> 80
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

45 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Un cebador para la PCR (PCEM 9)

<400> 22

acggcggcgc ccagcccct g ggcagccaga t cggcaccgc caacgt cggc ggcgccacct 60
ggcagct gt g gt acggcgt c 80

50 <210> 23
 <211> 80
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

55 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Un cebador para la PCR (PCEM 10)

ES 2 556 728 T3

	<400> 23		
		gccgt tccag ct ggt ggt ct ggct gct ggc gacgaagct g t aggt ct t ct ggct gccgt t	60
		gacgccgt ac cacagct gcc	80
5			
	<210> 24		
	<211> 80		
	<212> ADN		
	<213> secuencia artificial		
10			
	<220>		
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Un cebador para la PCR (PCEM 11)		
	<400> 24		
15		agaccaccag ct ggaacggc gacat cct gc agt t ct t caa gt acct gcag agcaaccagg	60
		gct t cccgc cagcagccag	80
	<210> 25		
	<211> 80		
	<212> ADN		
	<213> secuencia artificial		
20			
	<220>		
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Un cebador para la PCR (PCEM 12)		
25			
	<400> 25		
		at cat gt cag at acaaggag t ct at aggaa cagaaaggg t cat ggct t ac cgat caggt a	60
		ct ggct gct g gcggggaagc	80
30			
	<210> 26		
	<211> 80		
	<212> ADN		
	<213> secuencia artificial		
35			
	<220>		
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Un cebador para la PCR (PCEM 13)		
	<400> 26		
		ct cct t gl at ct gacat gal t gct t cggt a t cagacct gc agt t cggcac cgagccct t c	60
40		accggcagcc agaccaccct	80
	<210> 27		
	<211> 62		
	<212> ADN		
	<213> secuencia artificial		
45			
	<220>		
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Un cebador para la PCR (PCEM 14)		
50			
	<400> 27		
		ccct cgagct agt t gacgct ggcgct ccag t ggt t gacgg t caggg t ggt ct ggct gccg	60
		gt	62
	<210> 28		

<211> 834
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

5 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: gen de codones optimizados (modificado).

<220>
 <221> CDS
 10 <222> (1)..(410)

<220>
 <221> CDS
 15 <222> (470)..(690)

<220>
 <221> CDS
 <222> (755)..(831)

20 <220>
 <221> exón
 <222> (1)..(410)

25 <220>
 <221> sig_peptide
 <222> (1)..(45)

30 <220>
 <221> Intrón
 <222> (411)..(469)

35 <220>
 <221> exón
 <222> (470)..(690)

40 <220>
 <221> Intrón
 <222> (691)..(754)

45 <220>
 <221> exón
 <222> (755)..(831)

<400> 28

atg aag ctg acc ttc ctg ctg aac ctg gcc gtc gcc gcc agc gcc cag	48
Met Lys Leu Thr Phe Leu Leu Asn Leu Ala Val Ala Ala Ser Ala Gln	
1 5 10 15	
cag agc ctg tgc agc cag tac agc agc tac acc agc ggc cag tac agc	96
Gln Ser Leu Cys Ser Gln Tyr Ser Ser Tyr Thr Ser Gly Gln Tyr Ser	
20 25 30	
gtc aac aac aac ctg tgg ggc gag agc agc ggc agc ggc agc cag tgc	144
Val Asn Asn Asn Leu Trp Gly Gu Ser Ser Gly Ser Gly Ser Gln Cys	
35 40 45	
acc tac gtc aac agc atc agc agc agc ggc gtc agc tgg agc acc acc	192
Thr Tyr Val Asn Ser Ile Ser Ser Ser Gly Val Ser Trp Ser Thr Thr	
50 55 60	
tgg aac tgg agc ggc ggc agc acc agc gtc aag agc tac gcc aac agc	240
Trp Asn Trp Ser Gly Gly Ser Thr Ser Val Lys Ser Tyr Ala Asn Ser	
65 70 75 80	
cag ctg agc ggc ctg acc aag aag ctg gtc agc aac ctg cag agc atc	288
Gln Leu Ser Gly Leu Thr Lys Lys Leu Val Ser Asn Leu Gln Ser Ile	

ES 2 556 728 T3

```

      85              90              95
ccc acc agc gtc cag tgg agc tac agc aac acc aac atc gtc gcc gac      336
Pro Thr Ser Val Gl n Trp Ser Tyr Ser Asn Thr Asn Ile Val Ala Asp
      100              105              110

gtc agc tac gac ctg ttc acc gcc gcc gac atc aac cac gtc acc tac      384
Val Ser Tyr Asp Leu Phe Thr Ala Ala Asp Ile Asn His Val Thr Tyr
      115              120              125

agc ggc gac tac gag ctg atg atc tgg gtaaatatgc ccccgctcgt a      430
Ser Gly Asp Tyr Gl u Leu Met Ile Trp
      130              135

tttcaaglat gagacatctc ccgctaatca agat atcag g ctg ggc aag tac ggc      485
Leu Gly Lys Tyr Gly
      140

ggc gcc cag ccc ctg ggc agc cag atc ggc acc gcc aac gtc gcc gcc      533
Gly Ala Gl n Pro Leu Gly Ser Gl n Ile Gly Thr Ala Asn Val Gly Gly
      145              150              155

gcc acc tgg cag ctg tgg tac ggc gtc aac gcc agc cag aag acc tac      581
Ala Thr Trp Gl n Leu Trp Tyr Gly Val Asn Gly Ser Gl n Lys Thr Tyr
      160              165              170

agc ttc gtc gcc agc agc cag acc acc agc tgg aac gcc gac atc ctg      629
Ser Phe Val Ala Ser Ser Gl n Thr Thr Ser Trp Asn Gly Asp Ile Leu
      175              180              185

cag ttc ttc aag tac ctg cag agc aac cag ggc ttc ccc gcc agc agc      677
Gl n Phe Phe Lys Tyr Leu Gl n Ser Asn Gl n Gly Phe Pro Ala Ser Ser
      195              200              205

cag tac ctg atc g gtaagccatg acccttctg ttccctataga ctccctgtat      730
Gl n Tyr Leu Ile
      210

ctgacatgat tgcctcggta tcag ac ctg cag ttc gcc acc gag ccc ttc      780
Asp Leu Gl n Phe Gly Thr Gl u Pro Phe
      215

acc ggc agc cag acc acc ctg acc gtc aac cac tgg agc gcc agc gtc      828
Thr Gly Ser Gl n Thr Thr Leu Thr Val Asn His Trp Ser Ala Ser Val
      220              225              230              235

aac tag
Asn
      834

```

<210> 29

<211> 236

5

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

10

<223> Descripción de la secuencia artificial: una secuencia de aminoácidos deducida del gen de codones optimizados (modificado)

<400> 29

```

Met Lys Leu Thr Phe Leu Leu Asn Leu Ala Val Ala Ala Ser Ala Gl n
1          5          10

Gl n Ser Leu Cys Ser Gl n Tyr Ser Ser Tyr Thr Ser Gly Gl n Tyr Ser
20          25          30

```

Val Asn Asn Asn Leu Trp Gly Glu Ser Ser Gly Ser Gly Ser Gln Oys
 35 40 45

Thr Tyr Val Asn Ser Ile Ser Ser Ser Gly Val Ser Trp Ser Thr Thr
 50 55 60

Trp Asn Trp Ser Gly Gly Ser Thr Ser Val Lys Ser Tyr Ala Asn Ser
 65 70 75 80

Gln Leu Ser Gly Leu Thr Lys Lys Leu Val Ser Asn Leu Gln Ser Ile
 85 90 95

Pro Thr Ser Val Gln Trp Ser Tyr Ser Asn Thr Asn Ile Val Ala Asp
 100 105 110

Val Ser Tyr Asp Leu Phe Thr Ala Ala Asp Ile Asn His Val Thr Tyr
 115 120 125

Ser Gly Asp Tyr Glu Leu Met Ile Trp Leu Gly Lys Tyr Gly Gly Ala
 130 135 140

Gln Pro Leu Gly Ser Gln Ile Gly Thr Ala Asn Val Gly Gly Ala Thr
 145 150 155 160

Trp Gln Leu Trp Tyr Gly Val Asn Gly Ser Gln Lys Thr Tyr Ser Phe
 165 170 175

Val Ala Ser Ser Gln Thr Thr Ser Trp Asn Gly Asp Ile Leu Gln Phe
 180 185 190

Phe Lys Tyr Leu Gln Ser Asn Gln Gly Phe Pro Ala Ser Ser Gln Tyr
 195 200 205

Leu Ile Asp Leu Gln Phe Gly Thr Glu Pro Phe Thr Gly Ser Gln Thr
 210 215 220

Thr Leu Thr Val Asn His Trp Ser Ala Ser Val Asn
 225 230 235

<210> 30
 <211> 221
 <212> PRT
 <213> *Penicillium pinophilum* PF1365

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> ÁCIDO PIRROLIDÓN CARBOXILICO

<400> 30

Gln Gln Ser Leu Cys Ser Gln Tyr Ser Ser Tyr Thr Ser Gly Gln Tyr
 1 5 10 15

5

10

15

ES 2 556 728 T3

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

REIVINDICACIONES

1. Una proteína que tiene actividad endoglucanasa seleccionada entre el grupo que consiste en las siguientes proteínas (e) a (h):
- 5 (e) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos 16-236 de la SEC ID N° 4,
 (f) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos 1-236 de la SEC ID N° 4,
 (g) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 30,
 10 (h) una proteína modificada que comprende una secuencia de aminoácidos en que 1 a 20 aminoácidos están delecionados, sustituidos, añadidos y/o modificados en la secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos 16-236 o 1-236 de la SEC ID N° 4.
2. Un polinucleótido que codifica la proteína de acuerdo con la reivindicación 1.
3. El polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 2, que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N° 3 o 28, o la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos 46-834 de la SEC ID N° 3 o 28.
- 15 4. Un vector de expresión que comprende el polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 2 o 3.
5. Una célula huésped transformada con el vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 4.
6. La célula huésped de acuerdo con la reivindicación 5, en la que el huésped es una levadura o un hongo filamentoso.
- 20 7. La célula huésped de acuerdo con la reivindicación 6, en la que el hongo filamentoso es un microorganismo que pertenece al género *Trichoderma*, *Humicola*, *Aspergillus*, *Acremonium*, o *Penicillium*.
8. La célula huésped de acuerdo con la reivindicación 6, en la que el hongo filamentoso es un microorganismo que pertenece al género *Trichoderma*.
9. La célula huésped de acuerdo con la reivindicación 8, en la que el hongo filamentoso es *Trichoderma viride*.
10. Un proceso para producir la proteína de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende las etapas de:
- 25 cultivar las célula huésped de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9, y recoger la proteína de las células huésped o un cultivo obtenido mediante cultivo.
11. Una preparación de celulasa que comprende la proteína de acuerdo con la reivindicación 1.
12. Una composición detergente que comprende la proteína de acuerdo con la reivindicación 1 o la preparación de celulasa de acuerdo con la reivindicación 11.
- 30 13. Un procedimiento para tratar un tejido que contiene celulosa, que comprende la etapa de poner el tejido que contiene celulosa en contacto con la proteína de acuerdo con la reivindicación 1, la preparación de celulasa de acuerdo con la reivindicación 11, o la composición detergente de acuerdo con la reivindicación 12.
14. Un procedimiento para reducir el peso para mejorar sensación al tacto y el aspecto de un tejido que contiene celulosa, que comprende la etapa de poner el tejido que contiene celulosa en contacto con la proteína de acuerdo con la reivindicación 1, la preparación de celulasa de acuerdo con la reivindicación 11, o la composición detergente de acuerdo con la reivindicación 12.
- 35 15. Un procedimiento para proporcionar un cambio de color localizado a un tejido que contiene celulosa coloreada, que comprende la etapa de poner el tejido que contiene celulosa coloreada en contacto con la proteína de acuerdo con la reivindicación 1, la preparación de celulasa de acuerdo con la reivindicación 11, o la composición detergente de acuerdo con la reivindicación 12.
- 40 16. Un procedimiento de aclarado del color de un tejido que contiene celulosa coloreada, que comprende la etapa de poner el tejido que contiene celulosa coloreada en contacto con la proteína de acuerdo con la reivindicación 1, la preparación de celulasa de acuerdo con la reivindicación 11, o la composición detergente de acuerdo con la reivindicación 12.
- 45 17. Un procedimiento para reducir la formación de pelusas de un tejido que contiene celulosa o reducir la tasa de formación de pelusas, que comprende la etapa de poner el tejido que contiene celulosa en contacto con la proteína de acuerdo con la reivindicación 1, la preparación de celulasa de acuerdo con la reivindicación 11, o la composición detergente de acuerdo con la reivindicación 12.
- 50 18. Un procedimiento para reducir la rigidez de un tejido que contiene celulosa o reducir la tasa de formación de rigidez, que comprende la etapa de poner el tejido que contiene celulosa en contacto con la proteína de acuerdo con

la reivindicación 1, la preparación de celulasa de acuerdo con la reivindicación 11, o la composición detergente de acuerdo con la reivindicación 12.

19. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 18, en el que la etapa de poner en contacto el tejido con la composición detergente se realiza por remojo, lavado, o aclarado del tejido.

5 20. Un procedimiento para destintar papel de desecho, **caracterizado por** el uso de la proteína de acuerdo con la reivindicación 1 o la preparación de celulasa de acuerdo con la reivindicación 11, en el proceso de tratamiento de papel de desecho junto con un agente de destintado.

10 21. Un procedimiento para mejorar la liberación de agua de pulpa de papel, que comprende la etapa de tratar la pulpa de papel con la proteína de acuerdo con la reivindicación 1 o la preparación de celulasa de acuerdo con la reivindicación 11.

22. Un procedimiento para mejorar la digestibilidad de pienso animal, que comprende la etapa de tratar el pienso animal con la proteína de acuerdo con la reivindicación 1 o la preparación de celulasa de acuerdo con la reivindicación 11.

15 23. Un procedimiento para producir etanol de biomasa digiriendo y sacarificando una sustancia basada en celulosa, que comprende la etapa de tratar la sustancia basada en celulosa con la proteína de acuerdo con la reivindicación 1 o la preparación de celulasa de acuerdo con la reivindicación 11.