

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 575 526**

51 Int. Cl.:

**C12N 9/42** (2006.01)

**C12N 15/52** (2006.01)

**D06M 16/00** (2006.01)

**C11D 3/386** (2006.01)

**D21H 11/20** (2006.01)

**A23K 10/14** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.10.2004 E 04792875 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.04.2016 EP 1700917**

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

30 Prioridad:

**03.12.2003 JP 2003404020**

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

**29.06.2016**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**KOGA, JINICHIRO;  
BABA, YUKO;  
NAKANE, AKITAKA;  
HANAMURA, SATOSHI;  
NISHIMURA, TOMOKO;  
GOMI, SHUICHI;  
KUBOTA, HIDETOSHI y  
KONO, TOSHIAKI**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 575 526 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 STCE y preparación de celulasa que contiene la misma

**Campo técnico**

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

**Técnica antecedente**

10 Convencionalmente, el tejido que contiene celulosa se había tratado con celulasa para darle al tejido las propiedades que se deseaban. Por ejemplo, en la industria textil, el tratamiento con una celulasa se lleva a cabo para mejorar el tacto y apariencia del tejido que contiene celulosa, o para darle una apariencia de "lavado a la piedra" a un tejido que contiene celulosa coloreada, proporcionando en el tejido de esta manera un cambio de color localizado [Patente Europea N° 307.564 (referencia patente 1)].

15 Se sabe que, cuando el tejido que contiene celulosa se lava repetidamente, se produce la formación de pelusa en el tejido, que hace que el color del tejido teñido no esté claro. El color del tejido teñido se puede clarificar añadiendo celulasa a un detergente para eliminar de esta manera la pelusa o para evitar la formación de pelusa [Patente Europea N° 220.016 (referencia patente 2), documento WO 95/02675 (referencia patente 3), documento WO 97/3014 (referencia patente 4), y documento WO 98/08926 (referencia patente 5)], y se encuentran en el mercado actualmente detergentes que contienen celulasa, particularmente en los países occidentales.

20 En cuanto a las celulasas que pueden estar contenidas en un detergente, se sabe que, en los detergentes, la actividad de clarificación del color (es decir, la actividad para eliminar la pelusa del tejido y clarificar el color del tejido) de un componente de endoglucanasa purificada (EGV) de 43 kD derivado de un microorganismo que pertenece al género *Humicola* era aproximadamente de 30 veces la de una preparación de celulasa que contenía una pluralidad de componentes celulasa convencionales [documento WO 91/17243 (referencia patente 6)]. Además, se sabe que el color de un tejido teñido se puede clarificar haciendo reaccionar una endoglucanasa NCE5 derivada de un microorganismo que pertenece al género *Humicola* (a la que se hace referencia a partir de aquí simplemente como "NCE5") con el tejido teñido en un detergente [documento WO 01/90375 (referencia patente 7)]. Además, se sabe que, en los detergentes, la actividad de clarificación del color del líquido del cultivo obtenido cultivando *Humicola insolens* en el que se sobre-expresaba una endoglucanasa RCEI derivada de un microorganismo que pertenece al género *Rhizopus* (al que se hace referencia a partir de ahora a veces simplemente como "RCEI") era más de 20 veces la del líquido del cultivo que se obtenía cultivando *Humicola insolens* en el que la RCEI no se sobre-expresaba [documento WO 00/24879 (referencia patente 8)].

35 Como se ha descrito anteriormente, se sabe que varias endoglucanasas presentan actividad de clarificación del color, es decir, actividad para clarificar el color de tejidos teñidos, pero hay pocas endoglucanasas que presentan suficientemente esta actividad cuando están contenidas en los detergentes actualmente en el mercado occidental. Se considera que la inhibición o reducción de la actividad en los detergentes se produce por la gran cantidad de tensioactivos aniónicos o adyuvantes de detergencia que están contenidos en los detergentes.

40 Además, el agua de grifo que se utiliza para el lavado en los países occidentales es generalmente dura, y contiene una gran cantidad de cationes divalentes, tales como  $\text{Ca}^{2+}$  o  $\text{Mg}^{2+}$ . Debido a que los cationes divalentes reducen drásticamente la actividad detergente de cada tensioactivo contenido en los detergentes, los detergentes contienen uno o más adyuvantes de detergencia que adsorben los cationes divalentes ["Fragrance Journal", 1995, vol. 11, p. 33-55 (referencia no patente 1)]. Además, debido a que la dureza del agua de grifo varía según los países o regiones, el tipo y/o cantidad de adyuvantes de detergencia se seleccionan apropiadamente de acuerdo con los países o regiones. Además se sabe que los cationes divalentes no solo afectan a la actividad detergente del detergente, sino también a la actividad celulasa [Mansfield, S.D. y col., "Enzyme Microb. Technol." 23, 1998, p. 133-140 (referencia no patente 2), y Jenkins, C.C. y Suberkropp, K., "Freshwater Biology", vol. 33, N° 2, 1995, p. 245-253 (referencia no patente 3)]. Por lo tanto, según la dureza del agua, se produce un problema en el que la inhibición de la actividad celulasa reduce la actividad de clarificación del color que se desea, o un problema en el que el aumento de la actividad celulasa reduce la resistencia del tejido.

50 Debido a que el adyuvante de detergencia por sí mismo afecta la actividad celulasa, es difícil aliviar el efecto de la dureza del agua sobre la actividad de clarificación de color de la celulasa, añadiendo a esta el adyuvante de detergencia. Por lo tanto, se desea una celulasa a la que no le afecte fácilmente la dureza del agua y presente una actividad estable de clarificación del color.

55 Convencionalmente, un tejido que contiene celulosa se trata con una mezcla de una pluralidad de componentes celulasas, como una preparación de celulasa. Sin embargo, se necesita una gran cantidad de celulasa para obtener un efecto deseado en el tejido que contiene celulosa, y por lo tanto, se ha retrasado el desarrollo de la preparación de celulasa por la dificultad causada por esta necesidad. En muchos casos, una preparación de celulasa se proporciona como una preparación que comprende una gran cantidad de endoglucanasa que tiene una alta actividad. Como un proceso para preparar la preparación de celulasa, se conocen procesos para sobre-expresar una

endoglucanasa que se desee, que tenga una alta actividad en células huésped, utilizando técnicas de recombinación genética [documento WO 91/17243 (referencia patente 6), documento WO 98/03667 (referencia patente 9), y documento WO 98/11239 (referencia patente 10)].

5 Como células preferidas que se utilizan en los procesos, se pueden mencionar, por ejemplo los hongos filamentosos que pertenecen a los Hifomicetos, tales como los hongos filamentosos pertenecientes a *Aspergillus*, *Humicola*, o *Trichoderma*. Como huésped para preparar las celulasas que se utilizan en un detergente, se prefieren los hongos filamentosos que pertenecen a *Aspergillus* o *Humicola*, que producen celulasas neutras con respecto a las que pertenecen a *Trichoderma*, que producen celulasas ácidas, debido a que el pH del detergente es alcalino. Particularmente, desde el punto de vista de la producción industrial de la enzima, los hongos filamentosos que pertenecen a *Humicola* que tienen una alta productividad son los más preferidos [documento WO 01/9037 (referencia patente 7) y documento WO 98/03640 (referencia patente 11)].

15 Sin embargo, cuando se utiliza un hongo filamentosos que pertenece a *Humicola* para expresar un gen derivado de una especie diferente (es decir, un gen exógeno), a menudo se inhibe la expresión debido a que las características de la secuencia de nucleótidos del gen (tales como el uso del codón en el gen) son diferentes. En este caso, es necesario modificar el gen exógeno. Por ejemplo, cuando se sobre-expresa la endoglucanasa RCEI derivada de un microorganismo que pertenece al género *Rhizopus* que pertenece a los Zigomicetos en *Humicola insolens*, el gen que codifica la RCEI debería optimizarse de acuerdo con el uso del codón en la célula huésped [documento WO 00/24879 (referencia patente 8)]. Sin embargo, si se lleva a cabo dicha optimización, será tan difícil expresar un gen exógeno como los genes endógenos. Además, incluso cuando la enzima de interés se expresa y se produce en un huésped, se espera que la enzima sea digerida por proteasas o similares que están contenidas en el líquido de cultivo durante el cultivo obteniendo la enzima como productos digeridos o fragmentos parciales.

[referencia patente 1] Patente Europea N° 307.564  
 [referencia patente 2] Patente Europea N° 220.016  
 [referencia patente 3] Publicación Internacional WO 95/02675  
 25 [referencia patente 4] Publicación Internacional WO 97/30143  
 [referencia patente 5] Publicación Internacional WO 98/08926  
 [referencia patente 6] Publicación Internacional WO 91/17243  
 [referencia patente 7] Publicación Internacional WO 01/90375  
 [referencia patente 8] Publicación Internacional WO 00/24879  
 30 [referencia patente 9] Publicación Internacional WO 98/03667  
 [referencia patente 10] Publicación Internacional WO 98/11239  
 [referencia patente 11] Publicación Internacional WO 98/03640  
 [referencia no patente 1] "Fragrance Journal", 1995, vol. 11, p. 33-55  
 [referencia no patente 2] Mansfield, S.D. y col., "Enzyme Microb.Technol." 23, 1998, p. 133-140  
 35 [referencia no patente 3] Jenkins, C.C. y Suberkropp, K., "Freshwater Biology", vol. 33, N° 2, 1995, p. 245-253

El documento WO 97/40409 describe un procedimiento para proporcionar secuencias nuevas de ADN que codifican polipéptidos con una actividad de interés. El procedimiento comprende las siguientes etapas: i) amplificación por PCR de ADN con cebadores de PCR con homología con un gen conocido que codifica un polipéptido con una actividad de interés, ii) unir el producto de la PCR que se obtiene, al 5' de una secuencia genética estructural y al 3' de una secuencia genética estructural, iii) expresar dicha secuencia de ADN híbrido que resulta, iv) explorar para encontrar las secuencias de ADN híbrido que codifican un polipéptido con dicha actividad de interés o actividad relacionada, v) aislar la secuencia de ADN híbrido identificada en la etapa iv).

El documento WO 98/12307 describe un procedimiento para mejorar las propiedades de una enzima celulolítica por la sustitución, eliminación o inserción de aminoácidos. El procedimiento comprende las siguientes etapas: a) construir un alineamiento múltiple de al menos dos secuencias de aminoácidos de las que se sabe que tienen estructuras tridimensionales similares a la endoglucanasa V (EGV) de *Humicola insolens*; b) construir una estructura tridimensional construida en homología de la enzima celulolítica basada en la estructura de la EGV; c) identificar las posiciones de restos de aminoácidos presentes a una distancia de la hendidura de unión al sustrato de no más de 5 A; d) identificar los restos de aminoácidos expuestos a la superficie de la enzima; e) identificar todas las posiciones de restos de aminoácidos cargados o potencialmente cargados de la enzima; f) elegir una o más posiciones en las que se va a sustituir, eliminar o donde se va a proporcionar una inserción de un resto de aminoácido; g) llevar a cabo la sustitución, eliminación o inserción utilizando técnicas de modificación proteica convencionales; y las variantes de celulasa obtenidas por el procedimiento.

### Divulgación de la invención

#### 55 Problemas a resolver por la invención

Se han aislado distintas celulasas, para su uso en el lavado o en el procesamiento de tejidos, de hongos filamentosos que pertenecen a los géneros, *Trichoderma*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Phycomyces*, o similares, y se aislaron también los genes que codifican las celulasas. Sin embargo, no se ha informado de una celulasa que presente actividad de alta clarificación del color en un detergente de tipo occidental que contenga grandes cantidades de

tensioactivos aniónicos y adyuvantes de detergencia, al que no le afecte fácilmente la dureza del agua de grifo, y que presente una actividad estable de clarificación del color.

Además, si se encontrara un gen de celulasa que se sobre-exprese en un hongo filamentoso excelente que pertenece al género *Humicola* de una especie diferente sin modificación genética, el valor industrial del gen de celulasa sería inestimable. Sin embargo, no se ha informado de dicho gen.

### **Medios para resolver los problemas**

Los presentes inventores descubrieron nuevas proteínas que tienen una alta actividad endoglucanasa y genes que codifican las proteínas, a partir de un microorganismo que pertenece al género *Staphylotrichum*, a partir del cual no se habían aislado enzimas celulasa ni genes de celulasa.

Los presentes inventores descubrieron que la nueva proteína de la presente invención, que tenía una alta actividad endoglucanasa y había sido aislada a partir de un microorganismo que pertenece al género *Staphylotrichum*, presentaba una actividad de clarificación del color extremadamente alta en tejidos teñidos que contenían celulosa en un detergente tipo occidental. Por ejemplo, la actividad de clarificación de color en la endoglucanasa de la presente invención derivada de *Staphylotrichum coccosporum*, particularmente una endoglucanasa STCE1 (a la que se hace referencia a partir de aquí a veces simplemente como "STCE1"), era más de 16 veces la de la endoglucanasas NCE5 (a la que se hace referencia de aquí en adelante a veces simplemente como "NCE5") (documento WO 01/90375) y más de 80 veces la de la endoglucanasa RCEI (documento WO 00/24879), en un típico detergente europeo. En conexión con esto, se sabía que NCE5 y RCEI eran celulasas para detergentes que presentaban una actividad de clarificación del color.

Sorprendentemente, los presentes inventores descubrieron que la endoglucanasa STCE1 presentaba una actividad estable de clarificación del color, independientemente de la dureza del agua de grifo. Por ejemplo, la actividad de clarificación del color de una endoglucanasa NCE4 (documento WO 98/03640) o NCE5 (WO01/90375), que se conocen por presentar una alta actividad de eliminación de pelusa de un tejido que contiene celulosa, aumenta cuando la dureza del agua de grifo aumenta. Por el contrario, la actividad de clarificación en RCEI (documento WO 00/24879) disminuye cuando la dureza del agua de grifo aumenta. Sin embargo, la endoglucanasa STCE1 de la presente invención presentaba una actividad estable de clarificación del color, independientemente de la dureza del agua de grifo. Dicha celulasa, que muestra una alta actividad de clarificación del color en un detergente tipo occidental y presenta una actividad estable de clarificación del color independientemente de la dureza el agua de grifo no se había informado.

Además, sorprendentemente, los presentes inventores descubrieron que cuando la *Humicola insolens*, que es una especie diferente de *Staphylotrichum coccosporum*, se utilizaba como célula huésped, la endoglucanasa STCE 1 derivada de *Staphylotrichum coccosporum* se sobre-expresaba en la célula huésped sin modificar el gen STCE1.

La presente invención proporciona una nueva proteína que presenta una actividad endoglucanasa y se deriva de un organismo que pertenece al género *Staphylotrichum*, un gen que codifica la nueva proteína, y una preparación de celulasa que contiene la proteína y presenta propiedades excelentes. Además, la presente invención proporciona una célula transformada con el gen que codifica la proteína, y un proceso para producir la proteína que comprende las etapas de cultivar la célula huésped y recolectar la proteína, Además la presente invención proporciona un procedimiento para tratar un tejido que contiene celulosa con la proteína de la presente invención o la preparación de celulasa de la presente invención.

La presente invención incluye lo siguiente:

[1] Una proteína que se selecciona de entre el grupo que consiste en:

- (a) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3,
- (b) una proteína modificada que comprende una secuencia de aminoácidos en la que 1 a 30 aminoácidos se han eliminado, sustituido, insertado, o añadido en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, y tiene actividad endoglucanasa, y
- (c) una proteína homóloga que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 % de identidad con la de SEQ ID NO: 3, y tiene una actividad endoglucanasa.

[2] Un polinucleótido que codifica la proteína de [1].

[3] Un polinucleótido que se selecciona de entre el grupo que consiste en:

- (i) un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos 64-948 de SEQ ID NO: 2, y
- (ii) un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos en la que los nucleótidos 1 a 30 se han eliminado, sustituido, insertado, o añadido en la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos 64-948 de SEQ ID NO: 2, y que codifica una proteína que tiene actividad endoglucanasa.

[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].

[6] La célula huésped de [5], en la que el huésped es una levadura o un hongo filamentosos.

[7] La célula huésped de [6], en la que la levadura es un microorganismo que pertenece al género *Saccharomyces*, *Hansenula*, o *Pichia*.

5 [8] La célula huésped de [6], en la que el hongo filamentosos es un microorganismo que pertenece al género *Humicola*, *Trichoderma*, *Staphylotrichum*, *Aspergillus*, *Fusarium*, o *Acremonium*.

[9] La célula huésped de acuerdo con [8], en la que el hongo filamentosos es *Humicola insolens* o *Trichoderma viride*.

[10] Un proceso para producir la proteína de [1], que comprende las etapas de:

10 cultivar las células huésped de uno cualquiera de [5] a [9], y recolectar la proteína de las células huésped o de un cultivo que se obtiene por el cultivo.

[11] Una proteína producida por el proceso de [10].

[12] Una preparación de celulasa que comprende la proteína de [1] u [11].

[13] Una composición detergente que comprende la proteína de [1] u [11] o la preparación de celulasa de [12].

15 [14] Un procedimiento de tratamiento de un tejido que contiene celulosa, que comprende la etapa de poner en contacto el tejido que contiene celulosa con la proteína de [1] u [11], la preparación de celulasa de [12], o la composición detergente de [13].

[15] Un procedimiento para reducir la formación de pelusa en un tejido que contiene celulosa o para reducir la tasa de formación de pelusa, que comprende la etapa de poner en contacto el tejido que contiene celulosa con la proteína de [1] u [11], la preparación de celulasa de [12], o la composición detergente de [13].

20 [16] Un procedimiento para reducir peso para mejorar el tacto y apariencia de un tejido que contiene celulosa, que comprende la etapa de poner en contacto el tejido que contiene celulosa con la proteína de [1] u [11], la preparación de celulasa de [12], o la composición detergente de [13].

25 [17] Un procedimiento de clarificación del color de un tejido que contiene celulosa coloreada que contiene celulosa coloreada, que comprende la etapa de poner en contacto el tejido que contiene celulosa coloreada con la proteína de uno cualquiera de [1] u [11], la preparación de celulasa de [12], o la composición detergente de [13].

[18] Un procedimiento para proporcionar un cambio de color localizado en un tejido que contiene celulosa coloreada, que comprende la etapa de poner en contacto el tejido que contiene celulosa coloreada con la proteína de [1] u [11], la preparación de celulasa de [12], o la composición detergente de [13].

30 [19] Un procedimiento para reducir la rigidez de un tejido que contiene celulosa o para reducir la tasa de formación de rigidez, que comprende la etapa de poner en contacto el tejido que contiene celulosa con la proteína de [1] u [11], la preparación de celulasa de [12], o la composición detergente de [13].

35 [20] El procedimiento de uno cualquiera de [14] a [19], en el que el tratamiento del tejido se lleva a cabo empapando, lavando o aclarando el tejido.

[21] Un procedimiento para eliminar la tinta del papel desechado, que comprende la etapa de tratar el papel desechado con la proteína de uno cualquiera de [1] u [11], la preparación de celulasa de [12] junto con un agente de eliminación de tinta.

40 [22] Un procedimiento para mejorar la liberación de agua de la pasta de papel, que comprende la etapa de tratar la pasta de papel con la proteína de [1] u [11], la preparación de celulasa de [12].

[23] Un procedimiento para mejorar la digestibilidad del pienso para animales, que comprende la etapa de tratar un tejido que contiene celulosa con la proteína de [1] u [11], la preparación de celulasa de [12].

### **Efectos de la invención**

45 La proteína de la presente invención, particularmente la endoglucanasa STCE1, está disponible para el lavado o el procesamiento de tejidos, tal como la clarificación del color de un tejido que contiene celulosa, la reducción de pelusa, mejora del tacto y la apariencia del tejido, proporcionar un cambio localizado de color del tejido, o una reducción de la rigidez.

### **Mejor modo de llevar a cabo la invención**

#### **Proteína que tiene actividad endoglucanasa**

50 El término "endoglucanasa" como se utiliza en el presente documento significa una enzima que presenta actividad endoglucanasa, es decir, una endo-1,4-β-glucanasa (EC 3.2.1.4), que tiene una actividad de hidrólisis del enlace β-1,4-glucopiranosil del β-1,4-glucano.

55 La expresión "actividad endoglucanasa" como se utiliza en el presente documento significa una actividad CMCasa. La expresión "actividad CMCasa" como se utiliza en el presente documento significa una actividad de hidrólisis de la carboximetilcelulosa (CMC; Tokyo Kasei Kogyo Co., Ltd.). Cuando se va a ensayar una solución que contiene una proteína (enzima) y CMC, se incuba durante un periodo determinado y se mide la cantidad de azúcar liberada, se define la cantidad de la enzima que reduce el azúcar que se corresponde con 1 μmol de glucosa por minuto como 1 unidad de la actividad CMCasa.

La actividad endoglucanasa se puede medir, por ejemplo, por el siguiente procedimiento. Se añaden 0,5 ml de una solución que contiene una proteína que se va a ensayar en 0,5 ml de una solución de CMC al 2 % disuelta en un tampón de acetato-acetato sódico a 50 mmol/l (pH 6,0), y la mezcla se incuba a 50 °C durante 30 minutos. Se mide la concentración de azúcar reducido generado en la mezcla de reacción por el procedimiento del ácido 3,5-dinitrosalicílico (procedimiento DNS). Más particularmente, tras la incubación de 30 minutos, se añaden 3,0 ml de un reactivo DNS a 1,0 ml de la mezcla de reacción, se incuba todo en un baño de agua hirviendo durante 5 minutos y se diluye con 8,0 ml de agua destilada, y se mide la absorbancia a 540 nm. Se dibuja una curva de calibración utilizando soluciones de glucosa que se preparan por dilución gradual, y una cantidad de azúcar reducido generado en la reacción enzimática de la mezcla se determina como de glucosa convertida. La actividad se calcula definiendo la cantidad de enzima que produce el azúcar reducido que corresponde con 1  $\mu$ mol de glucosa por minuto, como 1 unidad.

El reactivo DNS se puede preparar de acuerdo con las divulgaciones en la bibliografía tal como Sakuzo Hukui, "Seikagaku Jikken-hou 1, Kangen-Tou no Teiryō-hou (Laboratory Manual for Biological Chemistry, Vol. 1, Assay of Reducing Sugar)", pp. 19-20, Japan Scientific Societies Press, o por el siguiente procedimiento. Se añaden a 300 ml de una solución acuosa de hidrato sódico al 4,5 %, 880 ml de una solución de ácido 3,5-dinitrosalicílico al 1 % y 255 g de sal de Rochelle (Solución A). Se añaden a 22 ml de una solución acuosa de hidrato sódico al 1,0 %, 10 g de fenol cristalino, y luego se añade agua para disolverlo y se ajusta a un volumen de 100 ml (Solución B). Luego, se disuelven 6,9 g de carbonato hidrógeno sódico en 69 ml de Solución B, y se vierte Solución A en esta. Se mezcla todo agitando para disolver la sal de Rochelle, se deja en reposo durante 2 días, y luego se filtra.

La proteína de la presente invención puede obtenerse de hongos filamentosos, tales como un microorganismo que pertenece al género *Staphylotrichum*, preferentemente, *Staphylotrichum coccosporum*, más preferentemente *Staphylotrichum coccosporum* IFO31817, y se puede utilizar una cepa mutante derivada del mismo.

La secuencia de aminoácidos del extremo N de la proteína de la presente invención es típicamente la de SEQ ID NO: 1. La secuencia de aminoácidos del extremo N se puede determinar, por ejemplo, de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 2.

De acuerdo con la presente divulgación, se proporciona una proteína derivada de un microorganismo que pertenece al género *Staphylotrichum*, y que tiene

- (A) la actividad endoglucanasa,
- (B) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 en el extremo N de la misma, y
- (C) un peso molecular medio de 49 kD determinado por SDS-PAGE.

De acuerdo con la presente invención se proporciona una proteína que tiene

- (A) la actividad endoglucanasa,
- (B) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 en el extremo N de la misma, y
- (C) un peso molecular medio de 49 kD determinado por SDS-PAGE.

El peso molecular medio que se determina por SDS-PAGE puede determinarse según el procedimiento descrito en el Ejemplo 1.

De acuerdo con la presente divulgación, se proporciona una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, y una proteína modificada o una proteína homóloga de la misma.

Como "la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3", puede mencionarse, por ejemplo, una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3; una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos en la que se añade una secuencia peptídica de señal a la de SEQ ID NO: 3; o una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos en la que se han añadido una o más secuencias marcadoras adecuadas en el extremo N y/o el extremo C de la de SEQ ID NO: 3.

Como secuencia peptídica de señal, se puede utilizar, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos que consiste en 21 restos de aminoácido (SEQ ID NO: 33), que está codificada por la secuencia de nucleótidos desde el codón ATG en las posiciones 1<sup>a</sup> a 3<sup>a</sup> al codón de las posiciones 61<sup>a</sup> a 63<sup>a</sup> de la de SEQ ID NO: 2.

Como secuencia marcadora, se puede utilizar una secuencia que lleve a cabo fácilmente una confirmación de la expresión del polipéptido, una confirmación de la localización intracelular de la misma, una purificación de la misma, o similares. Como la secuencia, se puede mencionar, por ejemplo, un marcador FLAG, un marcador hexa-histidina, un marcador hemaglutinina, o un epitopo myc.

La expresión "proteína modificada" como se utiliza en el presente documento significa una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos en la que se han eliminado, sustituido, o añadido uno o una pluralidad de aminoácidos (preferentemente uno o varios aminoácidos) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, y que tiene la actividad endoglucanasa. El número de aminoácidos que se va a modificar (tal como eliminar, sustituir, insertar, o añadir) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 es preferentemente de 1 a 30, más

preferentemente de 1 a 10, más preferentemente de 1 a 6. El aminoácido(s) que se va a modificar no se limita particularmente, siempre que se mantenga o se mejore la actividad endoglucanasa por la modificación. Por ejemplo, se pueden modificar uno o más aminoácidos que están contenidos en un dominio catalítico, una región de engarce, o un dominio de unión a celulosa, como se describe posteriormente.

- 5 La proteína modificada de la presente divulgación incluye una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos en la que uno o una pluralidad de aminoácidos se sustituyen de manera conservadora en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, y que tiene la actividad endoglucanasa. La expresión “sustitución conservadora” como se utiliza en el presente documento significa que uno o una pluralidad de restos de aminoácidos que están contenidos en una proteína se sustituyen con diferentes aminoácidos que tienen propiedades químicas similares, de forma que las actividades de la proteína no cambian sustancialmente. Como una sustitución conservadora se puede mencionar, por ejemplo, una sustitución de un resto hidrófobo por otro resto hidrófobo, o una sustitución de un resto polar por otro resto polar que tenga la misma carga.

- 15 Los aminoácidos que tienen propiedades químicas similares y pueden sustituirse de manera conservadora entre ellos son conocidos por los expertos en la técnica. Más particularmente, como aminoácidos no polares (hidrófobos), se pueden mencionar, por ejemplo, alanina, valina, isoleucina, leucina, prolina, triptófano, fenilalanina, o metionina. Como aminoácidos polares (neutros), se pueden mencionar, por ejemplo, glicina, serina, treonina, tirosina, glutamina, asparagina, o cisteína. Como aminoácidos básicos que tienen una carga positiva, se pueden mencionar, por ejemplo, arginina, histidina, o lisina. Como aminoácidos ácidos que tienen una carga negativa, se pueden mencionar, por ejemplo, ácido aspártico o ácido glutámico.

- 20 La expresión “proteína homóloga” como se utiliza en el presente documento significa una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (identidad de secuencia) de al menos un 85 % (preferentemente un 90 % o más, más preferentemente un 95 % o más) con una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, y que tiene la actividad endoglucanasa. La homología como se utiliza en el presente documento se muestra como el valor (de identidad) que se calcula por FASTA3 [Science, 227, 1435-1441 (1985); Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 85, 2444-2448 (1988); <http://www.ddbj.nig.ac.jp/E-mail/homology-j.html>], un programa de búsqueda de homología, según los parámetros por defecto.

Como realizaciones típicas de la proteína de la presente invención, se puede mencionar, por ejemplo, la endoglucanasa STCE1 o endoglucanasa STCE3. De aquí en adelante se hace referencia colectivamente a las endoglucanasas STCE1 y STCE3 como “endoglucanasa STCE”.

- 30 La endoglucanasa STCE de la presente invención es una endoglucanasa que pertenece a la familia 45, como se muestra en el Ejemplo 2. Como endoglucanasas conocidas que pertenecen a la familia 45, se pueden mencionar por ejemplo, la endoglucanasa NCE4 (documento WO 98/03640) o la endoglucanasa NCE5 (documento WO 01/90375) derivadas del género *Humicola*, o endoglucanasa RCE1 (documento WO 00/24879) derivada del género *Rhizopus*.

- 35 En las Figuras 1 y 2, se muestra un alineamiento de las secuencias de aminoácidos de endoglucanasa STCE1 [péptido de señal (SEQ ID NO: 33) y una proteína madura (SEQ ID NO: 3)] de la presente invención, la endoglucanasa NCE4 conocida [péptido de señal (SEQ ID NO: 34) y una proteína madura (SEQ ID NO: 35)], y la endoglucanasa NCE5 conocida [péptido de señal (SEQ ID NO: 36) y una proteína madura (SEQ ID NO: 37)].

- 40 La Figura 1 muestra el alineamiento de la mitad anterior (es decir, el lado del extremo N), y la Figura 2 muestra el de la mitad posterior (es decir, el lado del extremo C). El símbolo “\*” en las Figuras 1 y 2 indica un consenso del aminoácido respecto al de STCE1.

- 45 Como se muestra en las Figuras 1 y 2, las endoglucanasas que pertenecen a la familia 45 contienen el dominio catalítico (del 1° al 207°) como un dominio común, y a veces contienen la región de engarce (del 208° al 258°) y/o el dominio de unión a la celulosa (CBD) (259° a 295°). En conexión con esto, los números entre paréntesis tras los dominios anteriores representan el número de aminoácido de la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 3) de la endoglucanasa STCE1.

- 50 Entre cada región, hay muchos aminoácidos del dominio catalítico y el dominio de unión a la celulosa conservados entre endoglucanasas, pero no se observa ninguna región conservada importante en la región de engarce. Las regiones que contienen muchos aminoácidos conservados (por ejemplo, el dominio catalítico o el dominio de unión a la celulosa, particularmente el dominio catalítico) o aminoácidos comunes contenidos en las regiones, se consideran regiones o aminoácidos importantes para la actividad enzimática de la endoglucanasa (tal como STCE1) de la presente invención. Por lo tanto, cuando se lleva a cabo una modificación de aminoácidos (por ejemplo, una eliminación, sustitución, inserción, y/o adición, particularmente una sustitución conservadora) en una región o aminoácido que no es de dichas regiones o aminoácidos importantes, se puede obtener una proteína modificada u homóloga que mantiene la actividad enzimática con un alto porcentaje, sin más experimentación injustificada.

- 55 Además, incluso si en las regiones que contienen muchos aminoácidos conservados, se hace una modificación de aminoácidos no comunes entre las endoglucanasas con aminoácidos diferentes [preferentemente aminoácidos que son similares y se pueden sustituir conservadoramente] probablemente se puede mantener la actividad enzimática. Por lo tanto, con dicha modificación, se puede obtener una proteína modificada u homóloga que mantiene la

actividad enzimática con un alto porcentaje, sin más experimentación injustificada.

5 En este contexto, incluso si se modifican aminoácidos comunes en la región que contiene muchos aminoácidos conservados con aminoácidos diferentes, la actividad enzimática a veces se mantiene. Particularmente, en una modificación con aminoácidos que son similares y pueden sustituirse de manera conservadora, el porcentaje aumenta. La proteína modificada u homóloga de la presente divulgación incluye una proteína en la que uno o más aminoácidos contenidos en cualquier región, tal como un dominio catalítico, una región de engarce, o un dominio de unión a la celulosa, se modifica, siempre que presente la actividad endoglucanasa (es decir, se mantiene o mejora una actividad endoglucanasa anterior a la modificación).

10 La proteína de la presente invención puede aislarse y purificarse a partir de un microorganismo, por ejemplo, como se describe en el Ejemplo 1. De manera alternativa, se puede expresar un polinucleótido que codifica la proteína de la presente invención en un huésped adecuado por técnicas de recombinación genética como se describe posteriormente, y se puede aislar y purificar la proteína producida para obtener la proteína de la presente invención.

#### Polinucleótido que codifica la proteína que tiene actividad endoglucanasa

15 De acuerdo con la presente divulgación, se proporcionan polinucleótidos que codifican una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, una proteína modificada de la misma, y una proteína homóloga de la misma. Cuando se determina la secuencia de aminoácidos, se puede seleccionar fácilmente una secuencia de nucleótidos que codifique la secuencia de aminoácidos, y así se pueden seleccionar varias secuencias de nucleótidos que codifiquen la proteína de la presente invención. El término "polinucleótido" como se utiliza en el presente documento incluye ADN y ARN, y el ADN es preferible.

20 Típicamente, el polinucleótido de la presente divulgación puede seleccionarse de entre el grupo que consiste en:

- (i) un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos de los nucleótidos 64-948 de SEQ ID NO: 2,
- (ii) un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos en la que se eliminan, sustituyen, insertan, o añaden uno o una pluralidad de nucleótidos en la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos 64-948 de SEQ ID NO: 2, y que codifica una proteína que tienen la actividad endoglucanasa, y
- 25 (iii) un polinucleótido que se hibrida en condiciones rigurosas con un polinucleótido que consiste en la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos 64-948 de SEQ ID NO: 2, y que codifica una proteína que tiene actividad endoglucanasa.

30 En la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos 64-948 de la SEQ ID NO: 2, el número de nucleótidos que se eliminan, sustituyen, insertan, o añaden es preferentemente de 1 a 30, más preferentemente de 1 a 18, más preferentemente de 1 a 9.

La expresión "en condiciones rigurosas" como se utiliza en el presente documento significa las condiciones controladas en las que una sonda que comprende la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos 64-948 de SEQ ID NO: 2 se hibrida con un polinucleótido que codifica una proteína homóloga, pero no se hibrida con el gen de la endoglucanasa NCE5 (documento WO 01/90375).

35 Las "condiciones rigurosas" pueden ser, por ejemplo, las siguientes condiciones. Según un protocolo adjunto al Sistema de detección y marcaje de ADN/ARN directo ECL (Amersham), después de que se pre-hibrida a 42 °C durante una hora un polinucleótido que se va a ensayar, se añade una sonda marcada que tiene la secuencia de nucleótido de longitud completa que codifica la secuencia de aminoácidos de endoglucanasa STCE1, y se lleva a cabo la hibridación a 42 °C durante 15 horas. Tras la hibridación, se repite dos veces un tratamiento de lavado con 0,4 o menos x SSC (1 x SSC; 15 mmol/l de citrato sódico, 150 mmol/l de cloruro sódico) que contiene 0,4 % de SDS y 6 mol/l de urea a 42 °C durante 20 minutos, y se lleva a cabo dos veces un tratamiento de lavado con 5 x SSC a temperatura ambiente durante 10 minutos.

40

45 El polinucleótido de la presente invención incluye un polinucleótido de origen natural. Adicionalmente, puede sintetizarse completamente. Además, la síntesis se puede llevar a cabo utilizando parte del polinucleótido de origen natural. Típicamente, el polinucleótido de la presente invención se puede obtener explorando una biblioteca genómica derivada de *Staphylotrichum coccosporum* de acuerdo con un procedimiento habitual que se utiliza comúnmente en modificación genética, por ejemplo, utilizando una sonda de ADN apropiada diseñada basándose en la información de una secuencia de aminoácidos parcial.

50 En la presente invención, una secuencia de polinucleótido típica que codifica la secuencia de aminoácidos de la endoglucanasa STCE1 tiene una secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos 64-948 de SEQ ID NO: 2. La secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 2 tiene una fase de lectura abierta desde el codón ATG en las posiciones 1ª a 3ª hasta el codón TAA en las posiciones 949ª a 951ª. La secuencia de nucleótidos en las posiciones 64ª a 66ª se corresponde con el aminoácido del extremo N de una proteína madura de endoglucanasa STCE1 que consiste en 295 restos de aminoácido.

55

Vector de expresión y transformante

De acuerdo con la presente divulgación, se proporciona un vector de expresión que tiene un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, o una proteína modificada o proteína homóloga de la misma de forma que el polinucleótido se puede replicar y la proteína se puede expresar en un microorganismo huésped. El vector de expresión de la presente invención se puede construir basándose en un vector auto-replicable (tal como un plásmido), que existe como un elemento extracromosómico y que se puede replicar independientemente de la replicación de los cromosomas. De manera alternativa, el vector de expresión de la presente invención puede ser un vector que está integrado 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 se puede llevar a cabo por procedimientos o métodos que se utilizan habitualmente en modificación genética.

Para expresar una proteína que tiene una actividad deseada transformando 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, o un marcador genético para seleccionar los transformantes, además del polinucleótido de la presente invención. Como polinucleótido capaz de controlar la expresión, se puede utilizar en la presente invención, por ejemplo, un promotor, un terminador, o un polinucleótido que codifica un péptido de señal para la secreción. El promotor que se puede utilizar en la presente invención no está particularmente limitado, siempre que presente actividad de transcripción en un microorganismo huésped. El promotor se puede obtener como un polinucleótido que controla la expresión de un gen que codifica una proteína igual o diferente de la que se deriva del microorganismo huésped. El péptido de señal no está particularmente limitado siempre que contribuya a la secreción de la proteína en un microorganismo huésped. El péptido de señal se puede obtener como un polinucleótido derivado de un gen que codifica una proteína igual o diferente de la que se deriva del microorganismo huésped. El marcador genético se puede seleccionar adecuadamente de acuerdo con el procedimiento de selección de un transformante. Como marcador genético, por ejemplo, se puede utilizar en la presente invención, por ejemplo, un gen de resistencia a un fármaco o un gen complementario de una mutación auxotrófica.

De acuerdo con la presente invención, se proporciona un microorganismo transformado con el vector de expresión. Un sistema huésped-vector que se puede utilizar en la presente invención no está particularmente limitado. Por ejemplo, se puede utilizar un sistema que utiliza *E. coli*, Actinomicetos, levaduras, u hongos filamentosos, o un sistema de expresión de una proteína de fusión utilizando dicho microorganismo. Se puede llevar a cabo la transformación de un microorganismo con el vector de expresión de acuerdo con un procedimiento habitual.

En la presente invención, el transformante de la presente invención se cultiva, y el transformante o cultivo resultante se utiliza para obtener la proteína de la presente invención. De acuerdo con otra realización de la presente invención, se puede proporcionar el proceso para producir la nueva proteína de la presente invención. El cultivo del transformante (incluyendo las condiciones de cultivo) se pueden llevar a cabo de una manera sustancialmente similar a la del huésped original que se utiliza para preparar el transformante. Como procedimiento para recuperar la proteína de interés tras el cultivo del transformante se pueden llevar a cabo los procedimientos que se utilizan comúnmente.

De acuerdo con una realización preferida, se proporciona una célula de levadura capaz de expresar la endoglucanasa codificada por el polinucleótido de la presente invención. Como la célula de levadura, se puede mencionar, por ejemplo, un microorganismo que pertenece al género *Saccharomyces*, *Hansenula* o *Pichia*, tal como *Saccharomyces cerevisiae*.

Como el proceso más preferido para producir la nueva proteína de la presente invención, se proporciona un procedimiento para expresar la proteína en un hongo filamentosos que pertenece a los Hifomicetos. Como hongos filamentosos preferidos que se pueden utilizar como un huésped en la presente invención, se pueden mencionar, por ejemplo, hongos filamentosos que pertenecen a los géneros *Humicola*, *Trichoderma*, *Staphylotrichum*, *Aspergillus*, *Fusarium*, o *Acremonium*, más preferentemente *Humicola* o *Trichoderma*. Más particularmente, se pueden mencionar, por ejemplo, *Humicola insolens*, *Humicola thermoidea*, *Trichoderma viride*, *Trichoderma reesei*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Staphylotrichum coccosporum*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Fusarium oxysporum*, o *Acremonium cellulolyticus*, preferentemente *Humicola insolens* o *Trichoderma viride*.

Uso de la preparación de celulasa/celulasa

La presente divulgación, se refiere a una preparación de celulasa que comprende la proteína de la presente divulgación (por ejemplo, la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, la proteína modificada o la proteína homóloga de la misma, o una proteína que se obtiene cultivando la célula huésped de la presente invención).

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 en polvo, en partículas, gránulos, gránulos sin polvo, o formulación líquida. Además de la proteína de la presente invención, la preparación de celulasa de la presente

invención puede contener otras enzimas celulasas, tales como celobiohidrolasa,  $\beta$ -glucosidasa, y/o una endoglucanasa distinta de la endoglucanasa de la presente invención.

5 El granulo sin polvo (preferentemente un gránulo que no tenga pulverulencia), que es una forma de preparación de celulasa, puede producirse de acuerdo con el procedimiento de granulación en seco común. Es decir, una proteína en polvo de la presente invención se mezcla con una o una pluralidad de sustancias que se seleccionan de entre el grupo que comprende sales inorgánicas (tales como sulfato sódico o cloruro sódico) que son neutras y no tienen efecto sobre la actividad de la endoglucanasa; minerales (tales como la bentonita o montmorillonita) que no tienen efecto sobre la actividad de la endoglucanasa; y sustancias orgánicas neutras (tales como el almidón o la celulosa molida). A continuación, se añaden a la mezcla polvos o la suspensión finamente suspendida de uno o una pluralidad de tensioactivos no iónicos, y luego el producto que se obtiene se mezcla completamente o se amasa. Dependiendo de la situación, se añade opcionalmente un polímero sintético (tal como polietilenglicol) o un polímero natural (tal como el almidón), que se une a los sólidos y se amasa adicionalmente. A continuación se lleva a cabo la granulación por moldeado en extrusión, utilizando por ejemplo, un granulador de disco, y el material moldeado obtenido se convierte entonces en una forma esférica utilizando un Marumerizer seguido por secado, de forma que se pueden producir gránulos sin polvo. La cantidad de uno o una pluralidad de surfactantes no iónicos no está particularmente limitada, y es preferentemente del 0,1 al 50 % por peso, más preferentemente del 0,1 al 30 % por peso, más preferentemente de 1 al 10 % por peso de la cantidad total de preparación de celulasa de la presente invención.

20 Además, la preparación líquida que es una de las preparaciones de celulasa (preferentemente un líquido estabilizado), se puede preparar mezclando un estabilizador de endoglucanasa (tal como un polímero sintético o natural) con una solución que contiene la proteína de la presente invención, y si fuera necesario, añadir sales inorgánicas y/o un conservante sintético. En este caso, se pueden mezclar uno o una pluralidad de tensioactivos no iónicos con la preparación líquida. La cantidad de uno o una pluralidad de tensioactivos no iónicos no está particularmente limitada, y es preferentemente del 0,1 al 50 % por peso, más preferentemente del 0,1 al 30 % por peso, más preferentemente del 1 al 10 % por peso de la cantidad total de la preparación de celulasa de la presente invención.

30 Además, la presente invención proporciona una composición de detergente que comprende la proteína de la presente invención o la preparación de celulasa de la presente invención. La composición detergente puede comprender también 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 adyuvante de detergencia, blanqueador, agente blanqueante, un inhibidor de deslustre, un sequestrante, un polímero liberador de suelo, saborizante, otras enzimas (tales como proteasas, lipasas, o amilasas), un estabilizador para enzimas, un granulador, un abrillantador óptico, y/o un agente espumante. Como tensioactivos aniónicos típicos se pueden mencionar, por ejemplo, sulfonato de alquilbenceno lineal (LAS), alquil sulfato (AS),  $\alpha$ -olefin sulfonato (AOS), alquiléter sulfonato de polioxietileno (AES),  $\alpha$ -sulfoéster de ácidos grasos ( $\alpha$ -SFMe), o sales alcalinometálicas o ácidos grasos de origen natural. Como tensioactivos no iónicos, se pueden mencionar, por ejemplo, alquil éter de polioxietileno (AE), glicol éter de alquilpolietileno, glicol éter de nonilfenol polietileno, etoxilato de metil éster de ácido graso, sacarosa, o éster de ácido graso glucosa, o ésteres de alquilglucósido o alquilglucósido polietoxilado.

40 El procedimiento de la presente invención para tratar un tejido que contiene celulosa se lleva a cabo poniendo en contacto el tejido que contiene celulosa con la proteína de la presente invención, la preparación de celulasa de la presente invención, o la composición detergente de la invención. Las siguientes propiedades del tejido que contiene celulosa pueden mejorarse con el procedimiento de la presente invención:

- 45 (1) Eliminación de pelusa (reducción de la tasa de formación de pelusa, y reducción de pelusa);  
 (2) Mejoría del tacto y apariencia de un tejido reduciendo su peso;  
 (3) Clarificación del color de un tejido que contiene celulosa coloreada;  
 (4) Proporciona un cambio de color localizado a un tejido que contiene celulosa coloreada, es decir, proporciona una apariencia y textura tipo lavado a la piedra a un tejido que contiene celulosa coloreada, típicamente tela vaquera; y  
 50 (5) Suaviza un tejido (reducción de la tasa de rigidez, y una reducción de la rigidez).

Más particularmente, el procedimiento de la presente invención se puede llevar a cabo añadiendo la proteína de la presente invención, la preparación de celulasa de la presente invención, o la composición detergente de la presente invención en el agua en la que el tejido se empapará, por ejemplo durante el remojo, lavado o aclarado de un tejido.

55 Las condiciones tales como la temperatura de contacto o la cantidad de proteína, preparación de celulasa, o composición detergente que se va a añadir puede determinarse apropiadamente de acuerdo con otras distintas condiciones. Por ejemplo, cuando se reduce la tasa de formación de pelusa o se reduce la pelusa del tejido que contiene celulosa, la proteína, la preparación de celulasa, o la composición detergente con una concentración proteica 0,01 a 20 mg/l se utilizan preferentemente a una temperatura de aproximadamente 10 a 60 °C.

Cuando se reduce el peso para mejorar el tacto y apariencia de un tejido que contiene celulosa, la proteína, la

preparación de celulasa, o la composición detergente con una concentración proteica de 0,1 a 50 mg/l se utilizan preferentemente a una temperatura de aproximadamente 10 a 60 °C.

5 Cuando se clarifica el color del tejido que contiene celulosa coloreada, la celulasa, la preparación de celulasa, o la composición detergente con una concentración proteica de 0,01 a 20 mg/l se utilizan a una temperatura de aproximadamente 10 a 60 °C.

Cuando se proporciona un cambio de color localizado en un tejido que contiene celulosa, la celulasa, la preparación de celulasa, o la composición detergente con una concentración proteica de 0,1 a 100 mg/l se utiliza preferentemente a una temperatura de aproximadamente 10 a 60 °C.

10 Cuando se reduce la rigidez de un tejido que contiene celulosa o se reduce la tasa de formación de rigidez, la celulasa, preparación de celulasa, o la composición detergente con una concentración proteica de 0,01 a 20 mg/l se utiliza preferentemente a una temperatura de 10 a 60 °C.

Además, la presente invención se refiere a un procedimiento para eliminar la tinta del papel desechado, que se caracteriza por utilizar la proteína de la presente invención o la preparación de celulasa de la presente invención, en el proceso del tratamiento del papel desechado junto con un agente de eliminación de tinta.

15 La proteína o la preparación de celulasa de la presente invención es útil en el proceso de producción de papel reciclado a partir de papel desechado, el blanqueamiento del papel desechado puede mejorarse extraordinariamente reduciendo los restos de tinta en las fibras.

20 El agente de eliminación de tinta no está particularmente limitado, siempre que sea un agente que se pueda utilizar en la eliminación de tinta del papel desechado en general. Como agente de eliminación de tinta, se puede mencionar, por ejemplo, álcalis (tales como hidróxido sódico o carbonato sódico), silicato sódico, peróxido de hidrógeno, fosfatos, tensioactivos aniónicos o no iónicos, captadores tales como el ácido oleico, y agentes asistentes tales como un estabilizador de pH, un agente quelante, o un agente dispersante.

25 El papel desechado que se puede tratar por el procedimiento de eliminación de tinta no está particularmente limitado, siempre que sea papel de desecho común. Como papel de desecho, se puede mencionar, los periódicos usados, el papel de revistas usadas, y el papel usado impreso en grado medio o bajo que comprende la pasta mecánica y la pasta química; el papel usado libre de madera que comprende la pasta química; o papel desechado impreso tal como el papel de envolver. Un papel distinto del papel común se puede tratar por el procedimiento de eliminación de tinta, siempre que tenga restos de tinta.

30 Además la presente invención se refiere a un procedimiento para mejorar la liberación de agua de la pasta de papel, que comprende el proceso de tratamiento de una pasta de papel con la proteína de la presente invención o la preparación de celulasa de la presente invención.

35 De acuerdo con el procedimiento, se considera que este procedimiento puede mejorar significativamente la liberación de agua de la pasta de papel, sin disminución importante de la resistencia. Una pasta de papel que se puede tratar por el procedimiento no está particularmente limitada, pero se puede mencionar, por ejemplo, la pasta de papel desechado, la pasta de cartón desechado, pasta de papel de envolver, pasta de sulfito, pasta de tratamiento termomecánico, y otra pasta de alto rendimiento.

La presente invención se refiere a un procedimiento para mejorar la digestibilidad de un pienso para animales, que comprende la etapa de tratar el pienso de animales con la proteína de la presente invención o la preparación de celulasa de la presente invención.

40 De acuerdo con este procedimiento, se puede mejorar la digestibilidad del pienso para animales digiriendo el glucano del pienso para animales en moléculas adecuadas que tengan un peso molecular bajo.

45 Además, se puede mejorar la digestibilidad de glucano en los piensos para animales utilizando la celulasa de la presente invención en los piensos para animales. De acuerdo con la presente invención, el procedimiento para mejorar la digestibilidad de un pienso para animales, comprende la etapa de tratar el pienso para animales con la proteína de la presente invención o la preparación de celulasa de la presente invención.

#### Depósito de microorganismos

50 El *Staphylotrichum coccosporum* IFO 31817, a partir del cual se derivó la endoglucanasa STCE de la presente invención, se depositó a nivel nacional en el Instituto de Fermentación, Osaka (IFO) en 1985, y el número de depósito nacional es IFO31817. Además el *Staphylotrichum coccosporum* IFO 31817 se depositó internacionalmente en el Organismo de Patentes Internacionales Depositario del Instituto Nacional de Ciencia Industrial Avanzada y Tecnología (dirección: AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-chome Tukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566 Japón) el 28 de septiembre de 2004, y el número de depósito internacional es FERM BP-10135. Además, el *Staphylotrichum coccosporum* IFO 31817 se depositó en el Departamento de Biotecnología, Instituto Nacional de Tecnología y Evaluación (NITE) (dirección: 2-5-8 Kazusakamatari, Kisarazu-shi, Chiba 292-0818 Japón), y el número de depósito

es el NBRC 31817. Se aclaró por un certificado (fechado el 19 de noviembre de 2003) expedido por el Departamento de Biotecnología, NITE que publicó la cepa depositada y la hizo accesible a terceras partes.

La *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ /pU118-STCEex de la presente invención, es decir, la *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  que se transforma con el plásmido pUc118-STCEex que se obtiene insertando el gen STCE1 en el sitio *Bam*HI del plásmido pUC118, se depositó a nivel nacional en el Organismo de Patentes Internacionales Depositario del Instituto Nacional de Ciencia Industrial Avanzada y Tecnología el 1 de diciembre de 2003, y se transfirió a un depósito internacional el 15 de septiembre de 2004. El número de depósito (el número entre corchetes [ ] a continuación del número de depósito internacional es un número de depósito nacional) es FERM BP-10127 [FERM P-19602].

La *Humicola insolens* MN200-1, que se puede utilizar como huésped del vector de expresión de la presente invención se depositó a nivel nacional en el Organismo de Patentes Internacionales Depositario del Instituto Nacional de Ciencia Industrial Avanzada y Tecnología el 15 de julio de 1996, y se transfirió a un depósito internacional el 13 de junio de 1997. El número de depósito internacional (el número entre corchetes [ ] a continuación del número de depósito internacional es un número de depósito nacional) es FERM BP-5977 [FERM P-15736].

El *Trichoderma viride* MC300-1, que se puede utilizar como huésped para el vector de expresión de la presente invención se depositó a nivel nacional en el Organismo de Patentes Internacional Depositario del Instituto Nacional de Ciencia Industrial Avanzada y Tecnología el 9 de septiembre de 1996, y se transfirió a un depósito internacional el 11 de agosto de 1997. El número de depósito internacional (el número entre corchetes [ ] a continuación del número de depósito internacional es un número de depósito nacional) es FERM BP-6047 [FERM P-15842].

## Ejemplos

La presente invención se ilustrará ahora adicionalmente, pero no significa que la limiten, con los siguientes Ejemplos.

### **Ejemplo 1: Aislamiento y purificación de un componente que tiene actividad de liberación de fibrillas del algodón absorbente a partir de *Staphylotrichum coccosporum***

El *Staphylotrichum coccosporum* IFO 31817 se cultivó en un medio (T) (un 2,0 % de avicel, un 2,0 % de extracto de levadura, un 2,0 % de agua de macerado de maíz, un 1,0 % de glucosa, y un 0,2 % de fosfato potásico) a 28 °C con agitado. Tras el cultivo durante 10 días, se retiraron los micelios del cultivo para obtener un sobrenadante de cultivo como una solución de preparación de celulasa bruta.

Se añadió sulfato amónico a la solución de preparación de celulasa bruta hasta que la concentración final de sulfato amónico en la solución llegaba a 1,5 mol/l. La solución se aplicó en una columna HiTrap™PhenylHP (Amersham Bioscience) que se equilibró con una solución de 1,5 mol/l de sulfato amónico, y se eluyó con un procedimiento de elución paso a paso utilizando 1,5 mol/l, 0,9 mol/l, 0,75 mol/l, 0,6 mol/l, 0,15 mol/l, y 0 mol/l de solución de sulfato amónico (en agua desionizada), para recolectar las fracciones. Las fracciones eluidas a concentraciones de 0,75 mol/l y 0 mol/l presentaban una alta actividad de liberación de fibrillas del algodón absorbente.

La fracción eluida con una concentración de sulfato amónico de 0 mol/l se desaló utilizando Ultrafree/Biomax-5K (Millipore), y se ajustó hasta llegar a 50 mmol/l de tampón de acetato (pH 4,0). La fracción ajustada se aplicó a una columna MonoS5/5HR (Amersham Bioscience) que se equilibró con un tampón de acetato a 50 mmol/l (pH 4,0), y se eluyó con un procedimiento de gradiente lineal desde 50 mmol/l de tampón de acetato (a pH 4,0) a 50 mmol/l de tampón de acetato (a pH 5,0) que contenía 1 mol/l de cloruro sódico, para recolectar las fracciones. Como resultado, la fracción eluida con una concentración de cloruro sódico de aproximadamente 0,05 mol/l presentaba una alta liberación de fibrillas del algodón absorbente. La fracción se aislaba como STCE1.

La fracción eluida a una concentración de sulfato amónico de 0,75 mol/l se desaló utilizando Ultrafree/Biomax-5K (Millipore), y se ajustó hasta llegar a 50 mmol/l de tampón de acetato (pH 4,0). La fracción ajustada se aplicó a una columna MonoS 5/5HR (Amersham Bioscience) equilibrada con un tampón de acetato a 50 mmol/l (pH 4,0), y se eluyó con un procedimiento de gradiente lineal desde un tampón de acetato a 50 mmol/l (pH 4,0) a un tampón de acetato a 50 mmol/l (pH 5,0) que contenía 1 mol/l de cloruro sódico, para recolectar las fracciones. Como resultado, la fracción eluida con una concentración de cloruro sódico de aproximadamente 0,05 mol/l presentaba una alta actividad de liberación de fibrillas de algodón absorbente. La fracción se aisló como STCE3.

Los procedimientos anteriores de fraccionamiento y purificación utilizando las columnas se repitieron muchas veces para obtener muestras purificadas de STCE1 y STCE3 en grandes cantidades.

La fracción STCE1 y la fracción STCE3 se detectaron independientemente como una única banda en SDS-PAGE, y la media de pesos moleculares (MW) de las mismas era aproximadamente de 49 kD y aproximadamente 45 kD, respectivamente. En el SDS-PAGE, se utilizaron Safety Cell Mini STC-808 (Tefco) y Precast Mini Gel 10 %-SDS-PAGEmini, 1.0 mm de espesor de gel (Tefco), y se llevó a cabo la electroforesis y la tinción de acuerdo con los protocolos adjuntos a los mismos. Como marcador molecular se utilizó el Precision Protein Standard (BioRad Laboratories). Tanto la fracción STCE1 como la fracción STCE3 presentaban actividad CMCasa.

La actividad de liberación de fibrillas del algodón absorbente se ensayó de acuerdo con una modificación del procedimiento de Neena Din y col. [Neena Din y col., "Biotechnology", 9(1991), p. 1096-1099]. Es decir, se midió una absorbancia a 600 nm utilizando un Launder Meter en las siguientes condiciones, para determinar la cantidad de pelusa liberada del algodón absorbente.

- 5        Aparato de ensayo: Launder Meter L-12 (Daiei Kagaku Seiki MFG., Japón)  
 Temperatura: 40 °C  
 Tiempo: 120 minutos  
 pH de reacción: pH 7 (50 mmol/l de tampón fosfato)

10       Se añadió a una solución de tratamiento, una cantidad adecuada de algodón absorbente y perlas inoxidables junto con cada fracción de solución.

**Ejemplo 2: Secuenciación de secuencias de aminoácidos parciales de endoglucanasas STCE1 y STCE3 derivadas de *Staphylotrichum coccosporum***

(1) Identificación de secuencias de aminoácidos hacia el extremo N de STCE1 y STCE3

15       La fracción STCE1 y la fracción STCE3 que se obtuvieron en el Ejemplo 1 se sometieron a SDS-PAGE, y se transfirieron eléctricamente a una membrana PVDF Problot™ (Applied Biosystems). La membrana se tiñó con una solución de tinción CBB (0,1 % azul Coomassie G250, 30 % de metanol, y 10 % de ácido acético), y se decoloró y se secó al aire. De la membrana, se escindieron cada una de las porciones, de las cuales se transfirió una proteína (STCE1) que tenía un peso molecular de aproximadamente 49 kD que se correspondía con la fracción STCE1 o una proteína (STCE3) que tenía un peso molecular de aproximadamente 45 kD que se correspondía con la fracción STCE3. Cada pieza escindida se mojó con una cantidad minuto de metanol, se lavó ligeramente con un tampón de reducción (8 mol/l de hidrocloreto de guanidina, 0,5 mol/l Tris, un 0,3 % EDTA-Na<sub>2</sub>, y un 5 % de acetonitrilo), y se sumergieron en un microtubo con aproximadamente 100 µl del tampón de reducción. Tras añadir 1 mg de ditiotreitól al microtubo, se llenó el microtubo con gas nitrógeno y se selló. El microtubo se dejó en reposo durante más de 1 hora, y se añadieron 1,5 µl de vinilpiridina (Aldrich) al mismo, para llevar a cabo la piridiletilación de los restos de cisteína de la proteína durante más de 20 minutos con agitado ocasional, mientras se protegía de la luz. Cada pieza se lavó con agua desionizada y a continuación con un 2 % de acetonitrilo, y se procesó en un secuenciador Procise491 (Applied Biosystems) para determinar las secuencias de aminoácidos del extremo N (25 restos) de STCE1 y STCE3. Las secuencias de aminoácidos del extremo N (25 restos) de STCE1 y STCE3 se concordaron una con otra, y la secuencia era la siguiente: Secuencia de aminoácidos del extremo N de STCE1 y STCE3: Ala-Asp-Gly-Lys-Ser-Thr-Arg-Tyr-Trp-Asp-Cys-Cys-Lys-Pro-Ser-Cys-Ser-Trp-Pro-Gly-Lys-Ala-Ser-Val-Asn (25 restos) (SEQ ID NO: 1).

(2) Identificación de secuencias de aminoácidos internas de STCE1 y STCE3

35       Las STCE1 y STCE3 que se obtuvieron en el Ejemplo 1 se desalaron utilizando un Ultrafree/Biomax-5K (Millipore), y se liofilizaron. Cada una de STCE1 y STCE3 (aproximadamente 40 µg) se transfirieron independientemente a un microtubo de 1,5 ml, y se disolvieron en 500 µl del tampón de reducción. Después se añadieron 1,4 mg de ditiotreitól al microtubo, se llenó el microtubo con gas nitrógeno y se selló. El microtubo se dejó en reposo durante 5 horas. Además, se añadió al mismo 2,7 mg de mono-yodoacetato y se dejó en reposo durante 30 minutos mientras se protegía de la luz, para llevar a cabo la carboximetilación de los restos de cisteína de la proteína. Se desaló todo y se concentró utilizando un Ultrafree/Biomax-5K (Millipore). A cada una de las STCE1 y STCE3 carboximetiladas reducidas (aproximadamente 10 µg), se añadió una cantidad molar de aproximadamente 1/100 de endopeptidasa de lisis (Wako Pure Chemical Industries, Co., Ltd.), y se llevó a cabo la digestión en 50 µl de tampón Tris a 50 mmol/l (pH 9,0) a 37 °C durante 72 horas. Cuando se aplicó cada solución de STCE1 y STCE3 digeridas a un sistema 173A Micro Blotter (Applied Biosystems), se transfirieron siete péptidos por separado a una membrana PVDF [poli (difluoruro de vinilideno)]. Las secuencias de aminoácidos de los fragmentos peptídicos que se obtuvieron se determinaron con un secuenciador de proteínas.

Las secuencias internas de aminoácidos de STCE1 eran las siguientes:

- 50       LE-1: Pro-Ser-Cys-Ser-Trp-Pro-Gly-Lys (8 restos) (SEQ ID NO: 4)  
 LE-2: Ser-Thr-Arg-Tyr-Trp-Asp-Cys-Cys-Lys (9 restos) (SEQ ID NO: 5)  
 LE-3: Asn-Ala-Asp-Asn-Pro-Thr-Phe-Thr-Phe-Arg (10 restos) (SEQ ID NO: 6)  
 LE-4: Ala-Ser-Val-Asn-Gln-Pro-Val-Phe-Ala-Cys (10 restos) (SEQ ID NO: 7)  
 LE-5: Pro-Gly-Cys-Tyr-Trp-Arg-Phe (7 restos) (SEQ ID NO: 8)  
 LE-6: Thr-Met-Val-Val-Gln-Ser-Thr (7 restos) (SEQ ID NO: 9)  
 LE-7: Gln-Asn-Asp-Trp-Tyr-Ser-Gln-Cys-Leu (9 restos) (SEQ ID NO: 10)

55       Cuando la secuencia de aminoácidos del extremo N y las secuencias internas de aminoácidos que se obtuvieron por mapeo peptídico se utilizaron para llevar a cabo una búsqueda de homología, el resultado sugería que STCE1 era una nueva endoglucanasa que pertenecía a la familia 45.

Las secuencias internas de aminoácidos de STCE3 eran las siguientes:

- LE-8: Pro-Ser-Cys-Ser-Trp-Pro-Gly-Lys (8 restos) (SEQ ID NO: 11)  
 LE-9: Ser-Thr-Arg-Tyr-Trp-Asp-Cys-Cys-Lys (9 restos) (SEQ ID NO: 12)  
 LE-10: Asn-Ala-Asp-Asn-Pro-Thr-Phe-Thr-Phe-Arg (10 restos) (SEQ ID NO: 13)  
 LE-11: Ala-Ser-Val-Asn-Gln-Pro-Val-Phe-Ala-Cys-Ser-Ala-Asn-Phe-Gln-Arg (16 restos) (SEQ ID NO: 14)  
 5 LE-12: Ser-Gly-Cys-Asp-Gly-Gly-Ser-Ala-Tyr-Ala-Cys-Ala-Asp-Gln-Thr-Pro-Trp-Ala-Val-Asn-Asp-Asn (22 restos) (SEQ ID NO: 15)  
 LE-13: Pro-Gly-Cys-Tyr-Trp-Arg-Phe-Asp-Trp-Phe-Lys (11 restos) (SEQ ID NO: 16)  
 LE-14: Thr-Met-Val-Val-Gln-Ser-Thr-Ser-Thr-Gly-Gly-Asp-Leu-Gly-Thr-Asn (16 restos) (SEQ ID NO: 17)

10 A partir de la búsqueda de homología utilizando la secuencia de aminoácidos del extremo N y las secuencias internas de aminoácidos que se obtuvieron por el mapeo peptídico, se consideró que STCE3 también era una endoglucanasa que pertenecía a la familia 45. Sin embargo, las secuencias internas de aminoácidos correspondientes a STCE1 y STCE3 concordaban completamente entre ellas, y esto sugería que STCE3 era un producto parcialmente degradado de STCE1.

15 **Ejemplo 3: Evaluación de actividad de la endoglucanasa STCE1 purificada para eliminar pelusa del tejido que contiene celulosa**

La solución de preparación de celulosa bruta y la STCE1 purificada, que se obtuvieron en el Ejemplo 1, se utilizaron para evaluar la actividad de eliminación de pelusa en un tejido de punto de algodón.

20 Los tejidos de punto de algodón teñidos de azul se trataron con un tensioactivo y bolas de goma en una gran lavadora para generar pelusa. Los tejidos de punto de algodón azules con pelusa se trataron en las siguientes condiciones para eliminar la pelusa, hasta calcular la concentración proteica necesaria para eliminar aproximadamente el 50 % de la pelusa formada en base a la evaluación visual, en cada caso de adición de la solución de preparación de celulosa bruta o la endoglucanasa STCE1 purificada.

- 25 Aparato de ensayo: Launder Meter L-12 (Daiei Kagaku Seiki MFG., Japón)  
 Temperatura: 40 °C  
 Tiempo: 60 minutos  
 Cantidad de solución de reacción: 40 ml  
 pH de reacción: pH 6 (5 mmol/l de tampón fosfato)

En cada solución de tratamiento, se añadió un número adecuado de bolas de goma con cada solución de endoglucanasa.

30 La concentración proteica se determinó utilizando un kit Protein Assay (BioRad Laboratories) y albúmina sérica bovina (como referencia). El resultado se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1

Muestra	Concentración proteica necesaria para eliminar el 50 % de pelusa del tejido de algodón (mg/l)
Solución de preparación de celulosa bruta	95,0
STCE1 purificada	0,21

35 **Ejemplo 4: Evaluación de la actividad decolorante de la endoglucanasa STCE1 purificada en un tejido que contiene celulosa teñido con índigo**

Utilizando la solución de preparación de celulosa bruta y la endoglucanasa STCE1 purificada que se obtuvieron en el Ejemplo 1, se llevó a cabo un tratamiento de decoloración de una tela vaquera azul de 340,19 g sin apresto en las siguientes condiciones.

- 40 Aparato de ensayo: Lavadora de 20 kg (Lavadora automática SCW5101, Sanyo Electric)  
 Temperatura: 55 °C  
 Tiempo: 60 minutos  
 pH de reacción: pH 6,2 (6,7 mmol/l de tampón fosfato)  
 Cantidad de solución de reacción: 15 l

45 En cada solución de tratamiento, se añadió un número adecuado de bolas de goma con cada solución de endoglucanasa.

50 Para medir el grado de decoloración, se midió un valor L (claridad) de un sistema Lab utilizando un espectrofotómetro (CM-525i, Minolta). Un aumento en el valor L (aumento de claridad) con respecto a un control (tejido no tratado) (= valor ΔL) se determinó para evaluar el grado de decoloración. Más particularmente, los valores de ΔL se midieron en 10 puntos (n = 10) en cada grupo de ensayo, y se calculó la media de los mismos. Se calculó la concentración proteica necesaria para un valor ΔL de 5, en cada uno de los casos de adición de las soluciones de

preparación de celulasa bruta y endoglucanasa STCE1 purificada.

La concentración proteica se determinó utilizando un kit Protein Assay (BioRad Laboratories) y albúmina sérica bovina (como referencia). El resultado se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2

Muestra	Concentración proteica necesaria para un valor $\Delta L$ (decoloración) de 5 (mg/l)
Solución de preparación de celulasa bruta	108,0
STCE1 purificada	0,37

5

**Ejemplo 5: Evaluación comparativa de la actividad de eliminación de pelusa (actividad de clarificación del color) de endoglucanasas STCE1, NCE4, NCE5, y RCEI purificadas en una composición detergente**

Se utilizaron la endoglucanasa STCE1 purificada que se obtuvo en el Ejemplo 1, la endoglucanasa NCE4 purificada obtenida de un cultivo líquido de *Humicola insolens* (documento WO 98/03640), endoglucanasa NCE5 purificada obtenida de un cultivo líquido de *Humicola insolens* (documento WO 01/90375), y endoglucanasa RCEI purificada como único componente de *Humicola insolens* en la que se sobre-expresaba RCEI [RCEI-H4 (25 kD) en la que se había eliminado el dominio de unión a la celulosa (documento WO 02/42474)], para evaluar la actividad de eliminación de pelusa (actividad de clarificación del color) en un tejido de punto de algodón en un detergente tipo occidental.

10

15

Los tejidos de punto de algodón teñidos de azul se trataron con un tensioactivo y con bolas de goma en una gran lavadora para generar la pelusa. Los tejidos de punto de algodón azules con pelusa se trataron con un detergente en las siguientes condiciones, para calcular una concentración proteica necesaria para eliminar aproximadamente el 50 % de la pelusa formada basándose en una evaluación visual, en cada uno de los casos de adición de las endoglucanasas STCE1, NCE4, NCE5, y RCEI purificadas.

20

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

Temperatura: 40 °C

Tiempo: 60 minutos

Cantidad de solución de reacción: 40 ml

25

Detergente: NEW Persil (Funcionamiento en pastillas biológicas)

(fabricado por LEVER: obtenido en el Reino Unido en marzo de 2002)

Cantidad de detergente: 0,8 %

Solución de tratamiento: agua de dureza controlada [25 FH: preparada diluyendo agua de dureza controlada de 1000 FH que contenía 80 mmol/l de cloruro cálcico y 20 mmol/l de cloruro magnésico en agua desionizada, con agua desionizada]

30

En cada solución de tratamiento, se añadió un número adecuado de bolas de goma con cada solución de endoglucanasa.

La concentración proteica se determinó utilizando un kit Protein Assay (BioRad Laboratories) y albúmina sérica bovina (como referencia). Los resultados se muestran en la Tabla 3.

35

Tabla 3

Muestra	Concentración proteica necesaria para eliminar un 50 % de pelusa del tejido de algodón (mg/l)
STCE1 purificada	2,5
NCE4 purificada	2,5
NCE5 purificada	40,0
RCEI purificada	200,0 o más

**Ejemplo 6: Efecto de la dureza del agua de grifo sobre la actividad de eliminación de pelusa de cada una de las endoglucanasas purificadas**

Se utilizaron la endoglucanasa STCE1 purificada que se obtuvo en el Ejemplo 1, la endoglucanasa NCE4 purificada obtenida de un cultivo líquido de *Humicola insolens* (documento WO 98/03640), endoglucanasa NCE5 purificada obtenida de un cultivo líquido de *Humicola insolens* (documento WO 01/90375), y endoglucanasa RCEI purificada como único componente de *Humicola insolens* en la que se sobre-expresaba RCEI [RCEI-H4 (25 kD) en la que se había eliminado el dominio de unión a la celulosa (documento WO 02/42474)], para evaluar la actividad de eliminación de pelusa en un tejido de punto de algodón en agua de dureza controlada.

40

Los tejidos de punto de algodón teñidos de marrón se trataron con un tensioactivo y con bolas de goma en una gran lavadora para generar pelusa. Los tejidos de punto de algodón marrones con pelusa se trataron con cada una de las soluciones de endoglucanasa purificada en cada agua de dureza controlada (0FH, 5FH, 10FH, 20FH, o 40FH) en las siguientes condiciones para calcular una concentración proteica necesaria para eliminar aproximadamente el 50 % de pelusa formada basándose en una evaluación visual, en cada uno de los casos de la adición de endoglucanasas purificadas STCE1, NCE4, NCE5, y RCE1. La concentración proteica recíproca se considera como la actividad de eliminación de pelusa, y se determinó un valor relativo de la actividad de eliminación de pelusa en cada dureza cuando la actividad de eliminación de pelusa en una dureza de 0FH se consideraba como 100.

Aparato de ensayo: Launder Meter L-12 (Daiei Kagaku Seiki MFG., Japón)  
 Temperatura: 40 °C  
 Tiempo: 60 minutos  
 Cantidad de solución de reacción: 100 ml  
 pH de reacción: pH 6 (5 mmol/l de tampón fosfato)  
 Solución de tratamiento: agua de dureza controlada [0FH, 5FH, 10FH, 20FH, y 40FH: preparado diluyendo agua de dureza controlada de 1000FH que contenía 80 mmol/l de cloruro cálcico y 20 mmol/l de cloruro magnésico en agua desionizada, con agua desionizada]

En cada solución de tratamiento, se añadió un número adecuado de bolas de goma con cada solución de endoglucanasa.

La concentración proteica se determinó utilizando un kit Protein Assay (BioRad Laboratories) y albúmina sérica bovina (como referencia). Los resultados se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4

	Valor relativo de la eliminación de pelusa en cada dureza ( %)				
	0FH	5FH	10FH	20FH	40FH
STCE1 purificada	100	100	90	90	90
NCE4 purificada	100	108	140	160	200
NCE5 purificada	100	125	150	175	250
RCE1 purificada	100	70	60	40	25

**Ejemplo 7: Clonación del gen de endoglucanasa STCE**

Las secuencias internas y del extremo N de STCE1 y STCE3, que se determinaron en el Ejemplo 2, tienen una homología con la de la endoglucanasa NCE5 (documento WO 01/90375), que pertenece a la misma familia 45 y se deriva de *Humicola insolens*. Para buscar un gen de la endoglucanasa STCE en el ADN genómico de *Staphylotrichum coccosporum*, se llevó a cabo un análisis de hibridación de Southern utilizando un gen de NCE5 como sonda para aislar el gen homólogo.

(1) Aislamiento del ADN genómico derivado de *Staphylotrichum coccosporum*

Se cultivó el *Staphylotrichum coccosporum* IFO 31817 en el medio (T) (un 2,0 % de avicel, un 2,0 % de extracto de levadura, un 2,0 % de agua de macerado de maíz, un 1,0 % de glucosa, y un 0,2 % de fosfato potásico) a 28 °C durante 72 horas, y se centrifugó para recolectar los micelios. Los micelios obtenidos se liofilizaron, se destruyeron con un mezclador, y se disolvieron en 8 ml de un tampón TE [10 mmol/l de Tris-HCl (pH 8,0) y 1 mmol/l de EDTA]. A la solución, se añadieron 4 ml de tampón TE que contenía un 10 % de SDS, y la mezcla se incubó a 60 °C durante 30 minutos. Después se añadieron además 12 ml de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) a la misma, todo se agitó vigorosamente, y se centrifugó. Después se transfirió una capa acuosa a un nuevo matraz, se añadieron al mismo 1 ml de acetato potásico a 5 mol/l, y la mezcla se dejó en reposo en hielo durante más de 1 hora, y se centrifugó. Después una capa acuosa se transfirió a un nuevo matraz, se añadieron al mismo 2,5 volúmenes de etanol para precipitar el ADN. Se secó el precipitado, y se disolvió en 5 ml de tampón TE. A la solución, se le añadieron 5 µl de una solución de RNasa A a 10 mg/ml, y se incubó a 37 °C durante 1 hora. Además, se añadieron 50 µl de una solución de proteinasa K a 20 mg/ml a la misma, y se incubaron a 37 °C durante 1 hora. Después, se añadieron 3 ml de una solución de polietilenglicol (un 20 % de PEG6000 y 2,5 mol/l de cloruro sódico) para precipitar el ADN. Después se disolvió el precipitado en 500 µl del tampón TE, la solución se trató dos veces con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico, y se precipitó con etanol. El precipitado se lavó con un 70 % de etanol, se secó, y se disolvió en un volumen adecuado del tampón TE, para preparar una muestra de ADN genómico.

(2) Búsqueda del gen homólogo de NCE5 por hibridación de Southern

Aproximadamente 10 µg del ADN genómico de *Staphylotrichum coccosporum* que se obtuvo en el Ejemplo 7 (1), se digirió con cada enzima de restricción (*EcoRI*, *BamHI*, *HindIII*, *XhoI*, *NcoI*, o similares), y se sometió a una electroforesis en gel de agarosa al 0,8 %. Los ADN digeridos se transfirieron a una membrana de nilón (Membrana

de Transferencia HybondN + Nyron, Amersham). Se trató la membrana con hidróxido sódico 0,4 N para inmovilizar los ADN en la membrana, se lavó con 5 x SSC (75 mmol/l de citrato sódico y 750 mmol/l de cloruro sódico), y se secó.

5 Se preparó una sonda digiriendo un plásmido pJND-c5 (documento WO 01/90375) que contenía un ADNc del gen NCE5 con *Bam*HI y se recolectó un fragmento de ADN de aproximadamente 700 pb por electroforesis en gel de agarosa al 0,8 %. La sonda se marcó utilizando un sistema de detección de marcado de ADN/ARN directo ECL (Amersham). De acuerdo con un protocolo adjunto al kit, después de que la membrana en la que se había inmovilizado se prehibridara a 42 °C durante 1 hora, se añadió la sonda marcada NCE5 para llevar a cabo la hibridación a 42 °C durante 15 horas.

10 Después de la hibridación, la membrana se lavó de acuerdo con el protocolo adjunto al kit de la siguiente manera. La membrana se lavó dos veces con 0,6 x SSC (9 mmol/l de citrato sódico y 90 mmol/l de cloruro sódico) suplementado con un 0,4 % de SDS y 6 mol/l de urea a 42 °C durante 20 minutos, y luego se lavaron dos veces con 5 x SSC a temperatura ambiente durante 5 minutos. Después de lavar la membrana se sumergió en una solución de detección adjunta al kit durante 1 minuto, se expuso a la membrana una película de rayos X Fuji medical (Fuji film).

15 Como resultado, cuando el ADN genómico se digirió con *Eco*RI, *Bam*HI, *Xho*I, o *Nco*I, se hibridaron dos bandas de diferentes longitudes con la sonda. El resultado sugería que había dos genes homólogos al NCE5 en el ADN genómico de *Staphylotrichum coccosporum*. Cuando el ADN genómico se digirió con *Eco*RI, se detectaron dos bandas de aproximadamente 10 kpb y aproximadamente 5 kpb en la hibridación. El gen detectado como la banda de aproximadamente 10 kpb se clonó en el siguiente procedimiento.

20 (3) Preparación de la biblioteca de ADN genómico

Se digirió el ADN genómico de *Staphylotrichum coccosporum* con *Eco*RI, y se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 0,8 % utilizando un SeaKemLE agarosa (FMC). Los fragmentos de ADN entre aproximadamente 8 a 12 kpb que incluían aproximadamente 10 kpb se extrajeron y purificaron de acuerdo con procedimientos convencionales. Un vector fago (vector Lambda DASH II; Stratagene) se utilizó para unir estos fragmentos de ADN entre ellos. Las construcciones se precipitaron con etanol y se disolvieron en tampón TE. Se utilizó la cantidad completa de la solución y el kit Gigapack III Gold Packaging (Stratagene) para empaquetar las construcciones en las cabezas de los fagos lambda, y se infectó una cepa de *Escherichia coli* XL1-Blue MRA con los fagos. La biblioteca de fagos que se obtuvo ( $5 \times 10^4$  fagos) se utilizó para clonar un gen de interés.

(4) Exploración de genes homólogos de NCE5 por hibridación en placa

30 La biblioteca de ADN genómico (biblioteca *Eco*RI) que se obtuvo en el Ejemplo 7 (3) se transfirió a una membrana de nilón (Membrana de Transferencia Hybond N + Nyron, Amersham). Se trató la membrana con hidróxido sódico 0,4 N para inmovilizar los ADN en la membrana, se lavó con 5 x SSC, y se secó. De acuerdo con el protocolo adjunto al kit anterior, después de una prehibridación a 42 °C durante 1 hora, se añadió la sonda marcada NCE5 del Ejemplo 7 (2) para llevar a cabo la hibridación a 42 °C durante 15 horas.

35 Tras la hibridación, la membrana se lavó de acuerdo con el protocolo adjunto al kit de la siguiente manera. La membrana se lavó dos veces con 0,6 x SSC suplementado con 0,4 % y 6 mol/l de urea a 42 °C durante 20 minutos, y luego se lavó dos veces con 5 x SSC a temperatura ambiente durante 5 minutos. Después la membrana lavada se sumergió en una solución de detección adjunta al kit durante 1 minuto, se expuso una película de rayos X Fuji medical (Fuji film) a la membrana. Como resultado, se obtuvieron cuatro clones de fago.

40 Cada uno de los clones de fago que se obtuvieron se utilizó para infectar *Escherichia coli* XL-Blue MRA con los mismos. Después de 18 horas desde la infección, las partículas de fago se recolectaron independientemente. De acuerdo con un procedimiento de Grossberger (Grossberger, D., "Nucleic Acids. Res.", 15, 6737, 1987), las partículas de fago recolectadas se trataron con proteinasa K seguido por fenol, y se precipitaron con etanol, para purificar cada fago ADN.

45 (5) Subclonación del gen homólogo de NCE5

Cada uno de los cuatro clones de los fagos ADN se digirió con una pluralidad de enzimas de restricción, y se sometió a una electroforesis en gel de agarosa al 0,8 %. Los ADN se transfirieron a una membrana de nilón de acuerdo con un procedimiento de Southern (Southern, E.M., "J. Mol. Biol.", 98, p. 503-517, 1975), y se llevó a cabo la hibridación de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 7 (4). Como resultado, se obtuvieron patrones de hibridación en los cuatro clones de fagos ADN, independientemente del tipo de enzima de restricción utilizada. Cuando se digerían los cuatro clones de fagos ADN con *Sal*I, se detectaban comúnmente dos bandas de aproximadamente 4,4 kpb con una fuerte señal y aproximadamente 2,5 kpb con una señal débil en la hibridación como se describe en el Ejemplo 7 (4). Estos resultados indicaban que el gen homólogo de interés se localizaba en ambos ADN de aproximadamente 4,4 kpb y aproximadamente 2,5 kpb, y por lo tanto, se recolectaron ambos ADN y se subclonaron en el plásmido pUC118 en el sitio *Sal*I del mismo, independientemente. El plásmido que se obtuvo subclonando el ADN de aproximadamente 4,4 kpb se llamó pSTCE-Sal4,4, y el plásmido que se obtuvo subclonando el ADN de aproximadamente 2,5 kpb se llamó pSTCE-Sal2,5.

**Ejemplo 8: Secuenciación de la secuencia de nucleótidos del gen homólogo de NCE5**

La secuencia de nucleótidos del gen homólogo de NCE5, que se subclonó en el Ejemplo 7 (5), se analizó de la siguiente manera.

- 5 Se utilizó como secuenciador, el A.L.F DNA sequencer II (Pharmacia Biotech). Como gel de secuenciación, se utilizó un vehículo de acrilamida, disponible como HydroLink LongRanger (FMC). Se utilizaron como reactivos varios (tales como N,N,N',N'-tetrametileno diamina, urea, y persulfato amónico) para la preparación del gel, reactivos de calidad A.L.F (Pharmacia Biotech). Se llevó a cabo la reacción de secuenciación utilizando el kit AutoRead Sequencing (Pharmacia Biotech). Las condiciones para la preparación de gel, reacción, y electroforesis se seleccionaron de acuerdo con los protocolos adjuntos a estos kits.
- 10 Como se ha descrito anteriormente, las secuencias de nucleótidos de los fragmentos de ADN de aproximadamente 4,4 kpb contenidos en el plásmido pSTCE-Sal4,4 y de aproximadamente 2,5 kpb contenido en el plásmido pSTCE-Sal2,5 se determinaron de acuerdo con procedimientos convencionales. Cuando las secuencias de nucleótidos determinadas se tradujeron en secuencias de aminoácidos, una fase de lectura abierta estaba en concordancia totalmente con las secuencias del extremo N e internas de la STCE1 mostrada en el Ejemplo 2. A partir del resultado, se sugirió que el gen homólogo NCE5 era el gen que codificaba la STCE1. De aquí en adelante, se hace referencia al gen homólogo de NCE5 como "gen STCE1". Se descubrió, por la secuencia de aminoácidos de STCE1 traducida a partir de la secuencia de nucleótidos del ADN genómico, que la STCE1 es una endoglucanasa que pertenece a la familia 45 que contiene un dominio catalítico en el lado del extremo N y un dominio de unión a la celulosa en el lado del extremo C. Como se consideraba que la secuencia de ADN contenía una o más regiones de intrón, se aisló un ADNc del gen STCE1 por RT-PCR (transcriptasa inversa) en el siguiente procedimiento.
- 15
- 20

**Ejemplo 9: Aislamiento del ADNc del gen STCE1 por RT-PCR y secuenciación del mismo****(1) Aislamiento de ARNm de *Staphylotrichum coccosporum***

- 25 Se cultivó el *Staphylotrichum coccosporum* IFO31817 en 30 ml de medio (T) (un 2,0 % de avicel, un 2,0 % de extracto de levadura, un 2,0 % de agua de macerado de maíz, un 1,0 % de glucosa, y un 0,2 % de fosfato potásico) a 28 °C durante 72 horas, y se centrifugó para recolectar los micelios. Los micelios obtenidos se liofilizaron y se destruyeron con una espátula. Los ARN totales se aislaron utilizando Isogen (Wako Pure Chemical Industries, Co., Ltd.) como se describe posteriormente.
- 30

- 30 Al polvo de micelios, se le añadieron 5 ml de Isogen. La mezcla se agitó durante 30 segundos utilizando un mezclador con removido, se incubó a 50 °C durante 10 minutos, y se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 5 minutos. Luego se añadió al mismo 0,8 ml de cloroformo, y todo se agitó vigorosamente. Tras la centrifugación, se transfirió una capa acuosa a un nuevo matraz. Después, se añadieron 2 ml de cloruro de litio a 4 mol/l al matraz, se mezcló todo, y se dejó en reposo a -70 °C durante 15 minutos. Después de la centrifugación, la solución sobrenadante se desechó, y el precipitado se disolvió en 1,6 ml de agua. A la solución, se añadieron 1,6 ml de isopropanol y se mezcló, y la mezcla se dejó en reposo a 4 °C durante 30 minutos. Tras la centrifugación, la solución sobrenadante se desechó, y el precipitado se lavó con un 75 % de etanol, y se disolvió en 1,6 ml de agua. La solución se precipitó con etanol, y el precipitado se lavó con un 75 % de etanol, se secó, y se disolvió en 0,4 ml de agua para preparar los ARN totales.
- 35

- 40 Después, se prepararon los ARNm utilizando el kit de aislamiento de ARNm (Stratagene). A 0,2 ml del ARN total preparado en el Ejemplo 9 (1), se añadieron 10 ml de un tampón de elución, y se añadieron 5 ml de una solución de oligo-dT. Después de eliminar la solución sobrenadante, se lavó tres veces el oligo-dT con un tampón alto en sales, se lavó dos veces con un tampón bajo en sales, y se eluyó con un tampón de elución calentado a 68 °C. La solución que se obtuvo se precipitó con etanol, y se lavó el precipitado con un 75 % de etanol, se secó y se disolvió en 15 µl de agua para preparar una fracción de ARNm.

**(2) Aislamiento de ADNc del gen STCE1 por RT-PCR**

- 45 Se preparó un ADNc del gen STCE1 a partir de los ARNm por RT-PCR utilizando el kit Takara RNA PCR (AMV) Ver.2.1. Se determinó una secuencia de cebador para el lado del extremo N en vista de la secuencia de aminoácidos del extremo N de STCE1 y la secuencia de aminoácidos traducida a partir de la secuencia genómica que se determinó en el Ejemplo 8. Se determinó una secuencia de cebador para el lado del extremo C en vista de la información del dominio de unión a la celulosa bien conservado ((Hoffren, Anna-Marja. y col., "Protein Engineering", 8, p. 443-450, 1995) y la secuencia de aminoácidos traducida a partir de la secuencia genómica determinada en el Ejemplo 8. Se prepararon los siguientes oligonucleótidos cebadores, y se amplificó solo el ADNc del gen STCE1 por el procedimiento PCR utilizando, como armazón, 1 µl de los ARNm preparados en el Ejemplo 9 (1).
- 50

STCE1-CN: 5'-GCGGATCCATGCGTTCCTCCCCGTC-3' (26mero) (SEQ ID NO: 18)

STCE1-CC: 5'-GCGGATCCTTAAAGGCACTGCGAGTACC-3' (28mero) (SEQ ID NO: 19)

- 55 La reacción RT-PCR se llevó a cabo en las siguientes condiciones. Se llevó a cabo una reacción RT (transcripción inversa) utilizando una transcriptasa inversa en presencia del cebador para el lado del extremo C, y luego se llevó a

cabo una PCR para la amplificación añadiendo una polimerasa Taq (Taq recombinante, Takara Shuzo) y el cebador para el lado del extremo N y repitiendo un ciclo que consistía en una reacción a 94 °C durante 1 minuto, una reacción a 50 °C durante 2 minutos, y una reacción a 72 °C durante 2 minutos, 30 veces. El fragmento amplificado se sometió a electroforesis en gel de agarosa para confirmar que era un fragmento de 1 kpb. El fragmento se subclonó en un plásmido pUC18, y el plásmido obtenido se llamó plásmido pUC-STCE1.

### (3) Secuenciación del gen STCE1

La secuencia de nucleótido del fragmento obtenido se determinó de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 8. La secuencia de nucleótido determinada se comparó con la del genoma para determinar un intrón. Como resultado, se determinó la longitud completa de la secuencia de nucleótido del ADNc del gen STCE1 derivado de *Staphylotrichum coccosporum* (SEQ ID NO: 2).

Basándose en la secuencia del ADNc del gen STCE1, se aisló un fragmento de ADN que contenía una región codificante del gen STCE1 que incluía el intrón. Se llevó a cabo una PCR utilizando una mezcla de los cuatro clones de fagos ADN descritos en el Ejemplo 7 (5) como armazón y los siguientes cebadores STCE-HNBam y STCE-HCBam. El fragmento amplificado se separó y purificó por una electroforesis en gel de agarosa, y se digirió con *Bam*HI. Los fragmentos digeridos se sometieron a una electroforesis en gel de agarosa para separar y purificar el fragmento de interés.

STCE-HNBam: 5'-GGG GGA TCC TGG GAC AAG ATG CGT TCC TCC CCC GTC CTC-3' (39mero) (SEQ ID NO: 20)

STCE-HCBam: 5'-GGG GGA TCC GCT CAA AGG CAC TGC GAG TAC CAG TC-3' (35mero) (SEQ ID NO: 21)

El fragmento purificado de aproximadamente 1,1 kpb se insertó en el sitio *Bam*HI del plásmido pUC118 para obtener el plásmido pUC118-STCEex (FERM P-19602). Se determinó la secuencia de nucleótidos del fragmento insertado de acuerdo con el procedimiento que se ha descrito anteriormente, para confirmar la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 22) del intrón y la región codificante del gen STCE1. En este contexto, el codón de parada TAA se cambió por TGA utilizando el cebador STCE-HCBam en la PCR, pero la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada de esta manera se mantenía.

### Ejemplo 10: Expresión del gen STCE1 en *Humicola insolens*

Se construyó un vector de expresión pJND-STCE1 para *Humicola insolens* MN200-1 (FERM BP-5977), de forma que se fusionaron 16 restos de aminoácidos del extremo N de NCE4 con los restos de aminoácidos remanentes de STCE1 en una proteína que se va a expresar, utilizando el plásmido pJND-NCE4 que se obtiene insertando el gen NCE4 (documento WO 98/03640) en el sitio *Bam*HI del plásmido pJD01 (documento WO 00/24879).

Esto es debido a que los 16 restos de aminoácido del extremo N de NCE4 concuerdan con los de STCE1, y por lo tanto, la proteína expresada en la que se fusionaron los 16 restos de aminoácido del extremo N de NCE4 con los restos de aminoácido remanentes de STCE1 era la misma STCE1.

El plásmido pJND-NCE4 se construyó de la siguiente manera. Para insertar el gen NCE4 (documento WO98/03640) en el sitio *Bam*HI del plásmido pJD01, se diseñaron los siguientes cebadores que contenían sitios *Bam*HI en la región corriente arriba adyacente al codón de inicio y en la región corriente abajo adyacente al codón de parada. De acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 4 (1) 1) del documento WO 01/90375, el plásmido pCNCE4 (documento WO 98/03640) se utilizó como armazón para amplificar un fragmento de ADN con una mutación por una PCR.

NCE4-N-BamHI: 5'-GGGGATCCTGGGACAAGATGCGTTCCCTCCCCTCTCCTCC-3' (39mero) (SEQ ID NO: 23)

NCE4-C-BamHI: 5'-GGGGATCCTGCGTTTACAGGCACTGATGGTACCAGTC-3' (37mero) (SEQ ID NO: 24)

El ADN amplificado se digirió con *Bam*HI, y se subclonó en el sitio *Bam*HI del plásmido pJD01 [Ejemplo D1(2)(b) del documento WO 00/24879] para obtener el plásmido pJND-NCE4.

#### (1) Construcción del plásmido de expresión de STCE1

Se llevó a cabo una PCR utilizando el plásmido pUC-STCE1 que se preparó en el Ejemplo 9 (2) como armazón y los siguientes cebadores STCE1-N-S9A4 y STCE1-C-FokF. El fragmento amplificado se separó y purificó por electroforesis en gel de agarosa, y se digirió con *Bam*HI y *Fok*I. Los fragmentos digeridos se sometieron a una electroforesis en gel de agarosa para separar y purificar el fragmento de interés.

STCE1-N-S9A4: 5'-GGGATCCTGCGTTTAAAGGCACTGCGAGTACCAG-3'(34mero)(SEQ ID NO: 25)

STCE1-C-FokF: 5'-GGGATGCAAGCCGTCGTGCTCGTG-3'(24mero)(SEQ ID NO: 26)

Se llevó a cabo una PCR utilizando el plásmido pJND-NCE4 como armazón y los siguientes cebadores STCE1-N-FokR4 y STCE1-C-BamF. El fragmento amplificado se separó y purificó por una electroforesis en gel de agarosa y se digirió con *Bam*HI y *Fok*I. Los fragmentos digeridos se sometieron a una electroforesis en gel de agarosa para separar y purificar el fragmento de interés.

STCE1-N-FokR4:5'-GGGATGGGCCAGCCGCACGAAG-3' (23mero) (SEQ ID NO: 27)  
 STCE1-C-BamF:5'-GGGATCCTGGGACAAGATGC-3' (20mero) (SEQ ID NO: 28)

5 Los dos fragmentos que se obtuvieron se insertaron en el sitio *Bam*HI del plásmido pDJ01 para obtener el plásmido pJND-STCE1. La secuencia de nucleótidos del fragmento insertado se determinó de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente, para confirmar que la secuencia concordaba con la del gen STCE1 (SEQ ID NO: 2).

(2) Preparación del transformante de *Humicola insolens* con el plásmido pJND-STCE1

10 Se cultivó *Humicola insolens* MN200-1 en un medio NS (un 3,0 % de glucosa, un 2,0 % de extracto de levadura, un 0,1 % de peptona, un 0,03 % de cloruro cálcico, un 0,03 % de cloruro magnésico, pH 6,8) a 37 °C durante 24 horas. El cultivo se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos para recolectar los micelios. Los micelios obtenidos se lavaron con 0,5 mol/l de sacarosa, y se suspendió en 10 ml de una solución enzimática para generar protoplastos (3 mg/ml de β-glucuronidasa, 1 mg/ml de quitinasa, 1 mg/ml de zimoliasa, y 0,5 mol/l de sacarosa) previamente filtrados con un filtro (0,45 μm). La suspensión se agitó a 30 °C durante 60 y 90 minutos para generar protoplastos. La suspensión se filtró, y se centrifugó a 2500 rpm durante 10 minutos para recolectar los protoplastos. Los protoplastos se lavaron con un tampón SUTC [0,5 mol/l de sacarosa, 10 mmol/l de cloruro cálcico, y 10 mmol/l de Tris-HCl (pH 7,5)].

20 Los protoplastos se suspendieron en 1 ml de tampón SUTC. A 100 μl de la suspensión se añadieron 10 μl de una solución que contenía 10 μg de plásmido pJND-STCE1, y se dejó en reposo en hielo durante 5 minutos. Además, se añadieron 400 μl de una solución PEG [un 60 % de PEG4000, 10 mmol/l de cloruro cálcico, y 10 mmol/l de Tris-HCl (pH 7,5)], y se dejó en reposo en hielo durante 20 minutos. Después se añadieron 10 ml de tampón SUTC, se centrifugó todo a 2500 rpm durante 10 minutos. Los protoplastos recolectados se suspendieron en 1 ml de tampón SUTC, se centrifugó a 4000 rpm durante 5 minutos, y finalmente se suspendió en 100 μl de tampón SUTC.

25 Los protoplastos tratados anteriormente se cubrieron con agar blando YMG, en un medio YMG [un 1 % de glucosa, un 0,4 % de extracto de levadura, un 0,2 % de extracto de malta, y un 1 % de agar (pH 6,8)] que contenía higromicina (200 μg/ml), y se incubó a 37 °C durante 5 días para obtener las colonias de transformantes.

(3) Cultivo e identificación de transformantes con pJND-STCE1

(i) Evaluación por SDS-PAGE

30 A partir de los transformantes que se obtuvieron transformando *Humicola insolens* MN200-1 con el plásmido pJND-STCE1 según anteriormente, se seleccionaron 40 cepas resistentes a higromicina. Cada cepa se cultivó en un medio (N) (un 5,0 % de avicel, un 2,0 % de extracto de levadura, un 0,1 % de polipeptona, un 0,03 % de sulfato magnésico, pH 6,8) a 37 °C durante 4 días. Cada sobrenadante del cultivo se analizó por SDS-PAGE [Precast Mini Gel 14 %-SDS-PAGEmini, 1,0 mm de espesor de gel (Tefco)]. Como resultado, se confirmó que la proteína que tenía un peso de aproximadamente 45 a 49 kD, que se consideraba como STCE1, estaba extraordinariamente sobre-expresada en 13 clones.

(ii) Identificación del resto de aminoácido del extremo N de la STCE1 recombinante

35 Para confirmar que la proteína sobre-expresada descrita en el ejemplo 10 (3) (i) se derivaba del gen STCE1 se determinó la secuencia de aminoácidos del extremo N. El sobrenadante del cultivo se sometió a SDS-PAGE, y las proteínas se transfirieron eléctricamente por separado a una membrana PVDF de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 2. La proteína que tenía un peso molecular de aproximadamente 45 a 49 kD se sometió a un secuenciador de proteínas. Como resultado, la secuencia determinada concordaba con la secuencia de aminoácidos del extremo N (SEQ ID NO: 1) de endoglucanasa STCE1.

**Ejemplo 11: Evaluación de la actividad de STCE1 que se expresa en *Humicola insolens* para eliminar la pelusa del tejido que contiene celulosa**

45 Entre las 13 cepas en las que la expresión de la proteína que tenía un peso molecular de aproximadamente 45 a 49 kD se confirmó por SDS-PAGE en el ejemplo 10 (3), se seleccionó una cepa (4A-9) que mostraba una expresión extraordinaria. Se utilizó el sobrenadante del cultivo de la cepa 4A-9 para medir la actividad de eliminación de pelusa en un tejido de punto de algodón. Como control, se utilizó un sobrenadante del cultivo de la cepa parental (es decir, no transformante). Se llevó a cabo la evaluación de acuerdo con el procedimiento que se describe en el Ejemplo 3. Los tejidos de punto de algodón azules con pelusa se trataron en las condiciones anteriores (pH 6, 40 °C, 1 hora) con cada sobrenadante del cultivo, para calcular una concentración proteica necesaria para eliminar aproximadamente el 100 % de la pelusa formada basándose en la evaluación visual.

50 La concentración proteica se determinó utilizando el Kit Protein Assay (BioRad Laboratories) y albúmina sérica bovina (como referencia). Los resultados se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5

	Concentración proteica necesaria para eliminar el 100 % de pelusa del tejido de algodón (mg/l)
<i>Humicola insolens</i> MN200-1 (cepa parental)	96,3
<i>Humicola insolens</i> 4A-9	3,5

**Ejemplo 12: Evaluación de actividad de decoloración de la endoglucanasa STCE1 que se expresa en *Humicola insolens* en tejido que contiene celulosa teñido con índigo**

- 5 Utilizando los sobrenadantes del cultivo de la cepa (4A-9) que sobre-expresaba STCE1 que se obtuvo en el Ejemplo 10 y la cepa parental (MN200-1) como no transformante, se llevó a cabo un tratamiento de decoloración de una tela vaquera azul de 12 oz en las siguientes condiciones.

Aparato de ensayo: Lavadora de 20 kg (Lavadora automática SCW5101, Sanyo Electric)

Temperatura: 55 °C

- 10 Tiempo: 60 minutos

pH de reacción: pH 6,2 (6,7 mmol/l de tampón fosfato)

Cantidad de solución de reacción: 15 l

En cada solución de tratamiento, se añadió un número adecuado de bolas de goma con cada solución de endoglucanasa.

- 15 Con respecto al grado de decoloración, se midió un valor L (claridad) en un sistema Lab utilizando un espectrocolorímetro (CM-525i, Minolta). Un aumento en el valor L (aumento de claridad) con respecto a un control (tejido sin tratar) (= valor  $\Delta L$ ) se determinó para evaluar el grado de decoloración. Más particularmente, se midieron los valores de  $\Delta L$  en diez puntos (n = 10) en cada grupo de ensayo, y se calculó la media de los mismos. Se calculó una concentración proteica necesaria para un valor de  $\Delta L$  de 7.
- 20 La concentración proteica se determinó utilizando el kit Protein Assay (BioRad Laboratories) y albúmina sérica bovina (como referencia). El resultado se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6

	Concentración proteica necesaria para un valor de $\Delta L$ (decoloración) de 7 (mg/l)
<i>Humicola insolens</i> MN200-1 (cepa parental)	58,9
<i>Humicola insolens</i> 4A-9	3,3

- 25 **Ejemplo 13: Evaluación de la actividad de eliminación de pelusa (actividad de clarificación del color) de STCE1 que se expresa en *Humicola insolens* en la composición detergente**

Se utilizaron los sobrenadantes del cultivo de la cepa (4A-9) que sobre-expresaba STCE1 que se obtuvo en el Ejemplo 10 y la cepa parental (MN200-1) como no transformante para evaluar una actividad de eliminación de pelusa (actividad de clarificación del color) en un detergente tipo occidental con respecto a un tejido de punto de algodón.

- 30 Los tejidos de punto de algodón teñidos de marrón se trataron con un tensioactivo y con bolas de goma en una gran lavadora para generar pelusa. Los tejidos de punto de algodón marrones con pelusa se trataron en un detergente en las siguientes condiciones, para calcular la concentración proteica necesaria para eliminar aproximadamente el 50 % de pelusa formada basándose en una evaluación visual.

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

- 35 Temperatura: 40 °C

Tiempo: 60 minutos

Cantidad de solución de reacción: 40 ml

Detergente: NEW Persil (Funcionamiento en pastillas biológicas)

(fabricado por LEVER: obtenido en el Reino Unido en marzo de 2002)

- 40 Cantidad de detergente: 0,4 %

Solución de tratamiento: agua de dureza controlada [25 FH: preparada diluyendo agua de dureza controlada de 1000 FH que contenía 80 mmol/l de cloruro cálcico y 20 mmol/l de cloruro magnésico en agua desionizada, con agua desionizada]

En cada solución de tratamiento, se añadió un número adecuado de bolas de goma con cada sobrenadante del cultivo.

La concentración proteica se determinó utilizando el Kit Protein Assay (BioRad Laboratories) y albúmina sérica bovina (como referencia). Los resultados se muestran en la Tabla 7.

5

Tabla 7

Concentración proteica necesaria para eliminar el 50 % de pelusa del tejido de algodón (mg/l)	
<i>Humicola insolens</i> MN200-1 (cepa parental)	833
<i>Humicola insolens</i> 4A-9	22

**Ejemplo 14: Efecto de la dureza del agua de grifo sobre la actividad de eliminación de pelusa de cada endoglucanasa que se expresa en *Humicola insolens***

10 Se utilizaron los sobrenadantes de los cultivos de cuatro cepas, es decir, la cepa que sobre-expresaba STCE1 (4A-9) que se obtuvo en el Ejemplo 10, un transformante de *Humicola insolens* que sobre-expresaba NCE5 (documento WO 01/90375), un transformante de *Humicola insolens* que sobre-expresaba NCE4 (documento WO 98/03640), y un transformante de *Humicola insolens* que sobre-expresaba RCEI [RCEI-H4 (25 kD) en la que se eliminó el dominio de unión a la celulosa] (documento WO 02/42474), para evaluar la actividad de eliminación de pelusa en un detergente con respecto a un tejido de punto de algodón, en agua que tenía diferentes durezas.

15 Se trataron tejidos de punto de algodón teñidos de marrón con un tensioactivo y con bolas de goma en una gran lavadora para generar pelusa. Los tejidos de punto de algodón marrones con pelusa se trataron con cada uno de los cuatro sobrenadantes de cultivo en cada una de las aguas de dureza controlada (0FH, 5FH, 10 FH, 20 FH, o 40FH) en las siguientes condiciones.

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

Temperatura: 40 °C

Tiempo: 60 minutos

Cantidad de solución de reacción: 100 ml

Detergente: NEW Persil (Funcionamiento en pastillas biológicas)

(fabricado por LEVER: obtenido en el Reino Unido en marzo de 2002)

25 Cantidad de detergente: 0,4 %

Solución de tratamiento: agua de dureza controlada [0FH, 5FH, 10FH, 20FH, y 40FH: preparado diluyendo agua de dureza controlada de 1000FH que contenía 80 mmol/l de cloruro cálcico y 20 mmol/l de cloruro magnésico en agua desionizada, con agua desionizada]

30 En cada solución de tratamiento, se añadió un número adecuado de bolas de goma con cada sobrenadante de cultivo.

35 Después del tratamiento, se calculó la concentración proteica necesaria para eliminar aproximadamente el 50 % de pelusa formada basándose en una evaluación visual, y la recíproca de la concentración proteica se consideró como la actividad de eliminación de pelusa. Además, se determinó un valor relativo de actividad de eliminación de pelusa en cada dureza cuando la actividad de eliminación de pelusa con una dureza de 0FH se consideró como 100. El resultado se muestra en la Tabla 8.

Tabla 8

	Valor relativo de actividad de eliminación de pelusa en cada dureza ( %)				
	0FH	5FH	10FH	20FH	40FH
a	100	100	100	100	93
b	100	107	127	140	160
c	100	129	143	171	257
d	100	70	55	40	30

[a: STCE1-sobre-expresada por *H. insolens*,

b: NCE4-sobre-expresada por *H. insolens*,

c: NCE5-sobre-expresada por *H. insolens*, y

d: RCE1-sobre-expresada por *H. insolens*]

**Ejemplo 15: Expresión del gen STCE1 en *Trichoderma viride*****(1) Construcción del plásmido de expresión de STCE1 STCE1N-pCB1**

Se diseñaron los siguientes cebadores para la mutagénesis, que contenían el sitio de reconocimiento de *Sma*I corriente arriba del codón de inicio y el sitio de reconocimiento *Xho*I corriente abajo del codón de parada, y se amplificó el gen STCE1 por un procedimiento PCR de la siguiente manera.

STCE1-N-*Sma*I: 5'-CAGCCCGGGGCGCATCATGCGTTCTCCCCTCTCC-3' (35mero) (SEQ ID NO: 29)  
 STCE1-C-*Xho*I: 5'-GCCTCGAGTACCTTAAAGGCACTGCGAGTACCA-3' (33mero) (SEQ ID NO: 30)

Se llevó a cabo la PCR utilizando el plásmido pJND-STCE1 como armazón, dos ADN sintéticos STCE1-N-*Sma*I y STCE1-C-*Xho*I como cebadores y una Taq TaKaRa LA con tampón GC (Takara Shuzo), en condiciones como las que se describen en el protocolo adjunto a la polimerasa Taq. Después de la reacción, la muestra se sometió a una electroforesis en gel de agarosa, y el fragmento de ADN separado se digirió con *Sma*I y *Xho*I para obtener el fragmento genético STCE1-N de aproximadamente 0,9 kpb.

El plásmido pCB1-M2 (documento WO 98/11239) se digirió con *Stu*I y *Xho*I para recolectar un fragmento de 7,3 kpb. Este fragmento de 7,3 kpb se unió con el fragmento genético STCE1-N de aproximadamente 0,9 kpb, utilizando el kit de unión de ADN TaKaRa Ver. 1 (Takara Shozo), para obtener el plásmido STCE1N-M2.

En el sitio *Xba*I del plásmido STCE1N-M2, se insertó un casete genético de resistencia a la higromicina B derivado de PDH25 (Cullen, D., Leong, S.A., Wilson, L.J. y Henner, D.J., "Gene", 57, p. 21-26, 1987) para obtener el plásmido STCE1N-pCB1. Las condiciones de reacción, tales como las reacciones enzimáticas, se seleccionaron de acuerdo con los protocolos adjuntos a los kits. El plásmido STCE1N-pCB1 se construyó para que expresara la proteína STCE1 en *Trichoderma* como huésped utilizando el codón de inicio de STCE1.

**(2) Construcción de la fusión STCE1-plásmido de expresión STCE1M-pCB1**

Se diseñaron los siguientes cebadores para mutagénesis, que contenían el sitio de reconocimiento de *Sph*I corriente arriba de la región adyacente al codón que codifica el aminoácido del extremo N (Ala) y el sitio de reconocimiento de *Xho*I corriente abajo del codón de parada, y se amplificó el gen STCE1 por un procedimiento PCR de la siguiente manera.

STCE1-M-*Sph*I: 5'-CCGCATGCGCTGATGGCAAGTCCACC-3' (26mero) (SEQ ID NO: 31)  
 STCE1-C-*Xho*I: 5'-GCCTCGAGTACCTTAAAGGCACTGCGAGTACCA-3' (33mero) (SEQ ID NO: 32)

Se llevó a cabo la PCR utilizando el plásmido pJND-STCE1 como armazón, dos ADN sintéticos STCE1-M-*Sph*I y STCE1-C-*Xho*I como cebadores y una Taq TaKaRa LA con tampón GC (Takara Shuzo), en condiciones como las que se describen en el protocolo adjunto a la polimerasa Taq. Después de la reacción, la muestra se sometió a una electroforesis en gel de agarosa, y el fragmento de ADN separado se digirió con *Sph*I y *Xho*I para obtener el fragmento genético STCE1-M de aproximadamente 0,9 kpb.

El plásmido pCB1-M2 (documento WO 98/11239) se digirió con *Sph*I y *Xho*I para recolectar un fragmento de 7,3 kpb. Este fragmento de 7,3 kpb se unió con el fragmento genético STCE1-M de aproximadamente 0,9 kpb, utilizando el kit de unión de ADN TaKaRa Ver. 1 (Takara Shozo), para obtener el plásmido STCE1M-M2.

En el sitio *Xba*I del plásmido STCE1-M2, se insertó un casete genético de resistencia a la higromicina B derivado de PDH25 (Cullen, D., Leong, S.A., Wilson, L.J. y Henner, D.J., "Gene", 57, p. 21-26, 1987) para obtener el plásmido STCE1M-pCB1. Las condiciones de reacción, tales como las reacciones enzimáticas, se seleccionaron de acuerdo con los protocolos adjuntos a los kits. El plásmido STCE1M-pCB1 se construyó para que expresara una proteína de fusión de la proteína STCE1 y una pre-pro secuencia derivada de la proteína CBHI en *Trichoderma* como huésped utilizando el codón de inicio del vector.

**(3) Preparación de transformantes de *Trichoderma viride* con plásmidos STCE1N-pCB1 y STCE1M-pCB1**

Se cultivó *Trichoderma viride* MC300-1 (FERM BP-6047) en un medio S (un 3,0 % de glucosa, un 1,0 % de extracto de levadura, un 0,1 % de polipeptona, un 0,14 % de sulfato amónico, un 0,2 % de fosfato potásico, un 0,03 % de sulfato magnésico, pH 6,8) a 28 °C durante 24 horas, y se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos para recolectar los micelios. Los micelios obtenidos se lavaron con 0,5 mol/l de sacarosa, y se suspendieron en una solución enzimática para generar protoplastos (5 mg/ml de novozyme 234, 5 mg/ml de celulasa Onozuka R-10, y 0,5 mol/l de sacarosa) previamente filtrados (0,45 µm). La suspensión se agitó a 30 °C durante 60 a 90 minutos para generar protoplastos. La suspensión se filtró, y se centrifugó a 2500 rpm durante 10 minutos para recolectar los protoplastos. Los protoplastos se lavaron con el tampón SUTC como se ha descrito anteriormente.

Los protoplastos se suspendieron en 1 ml de tampón SUTC. A 100 µl de la suspensión se añadieron 10 µl de una solución de ADN que contenía 10 µg de plásmido STCE1N-pCB1 o STCE1M-pCB1, y se dejó en reposo en hielo durante 5 minutos. Además, se añadieron 400 µl de una solución PEG [un 60 % de PEG4000, 10 mmol/l de cloruro cálcico, y 10 mmol/l de Tris-HCl (pH 7,5)], y se dejó en reposo en hielo durante 20 minutos. Después se añadieron

10 ml de tampón SUTC, se centrifugó todo a 2500 rpm durante 10 minutos, Los protoplastos recolectados se suspendieron en 1 ml de tampón SUTC, se centrifugaron a 4000 rpm durante 5 minutos, y finalmente se suspendió en 100 µl de tampón SUTC.

- 5 Los protoplastos tratados anteriormente se depositaron, con agar blando dextrosa de patata (PD) (1,3 % de agar dextrosa de patata y un 17,1 % de sacarosa), en un medio agar PD (un 3,9 % de agar dextrosa de patata y un 17,1 % de sacarosa) que contenía higromicina B (20 µg/ml), y se incubó a 28 °C durante 5 días para obtener las colonias de transformantes.

**Ejemplo 16: Identificación de STCE1 en un cultivo de transformantes de *Trichoderma viride* con el gen STCE1 y evaluación de la actividad de eliminación de pelusa**

10 (1) Evaluación por HPLC

De los transformantes que se obtuvieron por transformación de *Trichoderma viride* MC300-1 con el plásmido STCE1N-pCB1 o STCE1M-pCB1 como anteriormente, se seleccionaron 50 cepas resistentes a la higromicina B. Cada cepa se cultivó en el medio S a 37 °C durante 5 días. Cada sobrenadante del cultivo se analizó con un análisis HPLC utilizando una columna TSKgel TMS-250 (4,6 mm I.D. x 7,5 cm) (TOSOH Corporation). En el análisis HPLC, se llevó a cabo la elución con un caudal de 1,0 ml/min utilizando un gradiente lineal del 0 % al 80 % de acetonitrilo en un 0,05 % de TFA (ácido trifluoroacético), y se detectaron picos a UV de 280 nm. Como resultado, un pico, que no se detectaba en el sobrenadante del cultivo de *Trichoderma viride* MC300-1 (tipo silvestre), se detectó en los 3 clones de los transformantes con STCE1N-pCB1 y en los 3 clones de los transformantes con STCE1M-pCB1. El pico se recolectó y se determinó la secuencia de aminoácidos del extremo N de los mismos con el procedimiento descrito en el Ejemplo 2. Como resultado, la secuencia de aminoácidos estaba de acuerdo con la secuencia de aminoácidos del extremo N (SEQ ID NO: 1) de STCE1.

(2) Evaluación de actividad de eliminación de pelusa en el cultivo de transformantes STCE1

Se utilizaron los sobrenadantes del cultivo de dos cepas de *Trichoderma viride* transformantes que expresan STCE1, que se obtuvieron en el Ejemplo 16 (1), y la cepa parental (MC300-1) como no transformante. De acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 3, se trataron tejidos de punto de algodón azules con pelusa a pH 10 (5 mmol/l de tampón de carbonato sódico) y 40 °C durante 1 hora en cada sobrenadante de cultivo, para calcular una concentración proteica necesaria para eliminar aproximadamente el 50 % de la pelusa formada basándose en la evaluación visual.

La concentración proteica se determinó utilizando el kit Protein Assay (BioRad Laboratories) y albúmina sérica bovina (como referencia). El resultado se muestra en la Tabla 9.

Tabla 9

	Concentración proteica necesaria para eliminar el 50 % de pelusa del tejido de algodón (mg/l)
<i>Trichoderma viride</i> MC300-1 (tipo silvestre)	Incluso cuando se añadían 330 mg/l, no se eliminaba el 50 % de pelusa.
<i>Trichoderma viride</i> (STCE1N-pCB1 transformante)	27
<i>Trichoderma viride</i> (STCE1M-pCB1 transformante)	28

**Aplicabilidad industrial**

35 Las nuevas endoglucanasas STCE de la presente invención son útiles, por ejemplo, en el tratamiento de un tejido que contiene celulosa, eliminación de tinta del papel desechado, mejora de la liberación de agua de la pasta de papel, o mejora de la digestibilidad del pienso para animales.

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

**Breve descripción de los dibujos**

40 La Figura 1 es una parte (el lado del extremo N) de un alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la endoglucanasa STCE1 [péptido de señal (SEQ ID NO: 33) y proteína madura (SEQ ID NO: 3)] de la presente invención, la endoglucanasa NCE4 [péptido de señal (SEQ ID NO: 34) y proteína madura (SEQ ID NO: 35)] que se sabe que pertenece a la familia 45, y la endoglucanasa NCE5 [péptido de señal (SEQ ID NO: 36) y proteína madura (SEQ ID NO: 37)] que se sabe que pertenece a la familia 45.

45 La figura 2 es la parte restante (el lado del extremo C) del alineamiento que se muestra en la Figura 1.

**Texto libre del Listado de Secuencias**

Las características de "Secuencia artificial" se describen en el identificador numérico <223> del Listado de Secuencias. Cada secuencia de nucleótidos de las SEQ ID NO: 18-21 son el cebador STCE1-CN, cebador STCE1-CC, cebador STCE-HNBam, y cebador STCE-HCBam. Cada una de las secuencias de nucleótidos de las SEQ ID NO: 23-32 son el cebador NCE4-N-BamHI, cebador NCE4-C-BamHI, cebador STCE1-N-S9A4, cebador STCE1-C-FokF, cebador STCE1-N-FokR4, cebador STCE1-C-BamF, cebador STCE1-N-SmaI, cebador STCE1-C-XhoI, cebador STCE1-M-SphI, y cebador STCE1-C-XhoI.

LISTADO DE SECUENCIAS

10 <110> MEIJI SEIKA KAISHA, LTD.  
 <120> Endoglucanasa STCE y preparación de celulasa que contiene la misma  
 <130> MEJ-718  
 15 <150> JP 2003-404020  
 <151> 03-12-2003  
 <160> 37  
 20 <170> PatentIn versión 3.1  
 <210> 1  
 <211> 25  
 25 <212> PRT  
 <213> *Staphylotrichum coccosporum* IF0 31817  
 <400> 1

**Ala Asp Gly Lys Ser Thr Arg Tyr Trp Asp Cys Cys Lys Pro Ser Cys**

**1 5 10 15**

**Ser Trp Pro Gly Lys Ala Ser Val Asn**

**20 25**

30 <210> 2  
 <211> 951  
 <212> ADN  
 35 <213> *Staphylotrichum coccosporum* IF0 31817  
 <220>  
 <221> sig\_peptide  
 <222>(1)..(63)  
 40 <223>  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222>(64)..(951)  
 45 <223>  
 <400> 2

ES 2 575 526 T3

atgcgttctt cccccgtctt ccgcacggcc ctggccgctg ccctccccct ggccgcctc	60
gct gcc gat ggc aag tcg acc cgc tac tgg gac tgt tgc aag ccg tcg	108
Ala Asp Gly Lys Ser Thr Arg Tyr Trp Asp Cys Cys Lys Pro Ser	
1 5 10 15	
tgc tcg tgg ccc ggc aag gcc tog gtg aac cag ccc gtc ttc gcc tgc	156
Cys Ser Trp Pro Gly Lys Ala Ser Val Asn Gln Pro Val Phe Ala Cys	
20 25 30	
agc gcc aac ttc cag cgc atc agc gac ccc aac gtc aag tcg ggc tgc	204
Ser Ala Asn Phe Gln Arg Ile Ser Asp Pro Asn Val Lys Ser Gly Cys	
35 40 45	
gac ggc ggc tcc gcc tac gcc tgc gcc gac cag acc ccg tgg gcc gtc	252
Asp Gly Gly Ser Ala Tyr Ala Cys Ala Asp Gln Thr Pro Trp Ala Val	
50 55 60	
aac gac aac ttc tcg tac ggc ttc gcc gcc acg tcc atc tcg ggc ggc	300
Asn Asp Asn Phe Ser Tyr Gly Phe Ala Ala Thr Ser Ile Ser Gly Gly	
65 70 75	
aac gag gcc tcg tgg tgc tgt ggc tgc tac gag ctg acc ttc acc tcg	348
Asn Glu Ala Ser Trp Cys Cys Gly Cys Tyr Glu Leu Thr Phe Thr Ser	

ES 2 575 526 T3

80		85		90		95	
ggc ccc gtc gct ggc aag acc atg gtt gtc cag tcc acc tcg acc ggc							396
Gly Pro Val Ala Gly Lys Thr Met Val Val Gln Ser Thr Ser Thr Gly							
		100		105		110	
ggc gac ctc ggc acc aac cac ttc gac ctg gcc atg ccc ggt ggt ggt							444
Gly Asp Leu Gly Thr Asn His Phe Asp Leu Ala Met Pro Gly Gly Gly							
		115		120		125	
gtc ggc atc ttc gac ggc tgc tcg ccc cag ttc ggc ggc ctc gcc ggc							492
Val Gly Ile Phe Asp Gly Cys Ser Pro Gln Phe Gly Gly Leu Ala Gly							
		130		135		140	
gac cgc tac ggc ggc gtc tcg tcg cgc agc cag tgc gac tcg ttc ccc							540
Asp Arg Tyr Gly Gly Val Ser Ser Arg Ser Gln Cys Asp Ser Phe Pro							
		145		150		155	
gcc gcc ctc aag ccc ggc tgc tac tgg cgc ttc gac tgg ttc aag aac							588
Ala Ala Leu Lys Pro Gly Cys Tyr Trp Arg Phe Asp Trp Phe Lys Asn							
		160		165		170	175
gcc gac aac ccg acc ttc acc ttc cgc cag gtc cag tgc ccg tog gag							636
Ala Asp Asn Pro Thr Phe Thr Phe Arg Gln Val Gln Cys Pro Ser Glu							
		180		185		190	
ctc gtc gcc cgc acc ggc tgc cgc cgc aac gac gac ggc aac ttc ccc							684
Leu Val Ala Arg Thr Gly Cys Arg Arg Asn Asp Asp Gly Asn Phe Pro							
		195		200		205	
gtc ttc acc cct ccc tcg ggc ggt cag tcc tcc tcg tct tcc tcc tcc							732
Val Phe Thr Pro Pro Ser Gly Gly Gln Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser							
		210		215		220	
agc agc gcc aag ccc acc tcc acc tcc acc tcg acc acc tcc acc aag							780
Ser Ser Ala Lys Pro Thr Ser Thr Ser Thr Ser Thr Thr Ser Thr Lys							



Gly Gly Ser Ala Tyr Ala Cys Ala Asp Gln Thr Pro Trp Ala Val Asn  
 50 55 60

Asp Asn Phe Ser Tyr Gly Phe Ala Ala Thr Ser Ile Ser Gly Gly Asn  
 65 70 75 80

Glu Ala Ser Trp Cys Cys Gly Cys Tyr Glu Leu Thr Phe Thr Ser Gly  
 85 90 95

Pro Val Ala Gly Lys Thr Met Val Val Gln Ser Thr Ser Thr Gly Gly  
 100 105 110

Asp Leu Gly Thr Asn His Phe Asp Leu Ala Met Pro Gly Gly Gly Val  
 115 120 125

Gly Ile Phe Asp Gly Cys Ser Pro Gln Phe Gly Gly Leu Ala Gly Asp  
 130 135 140

Arg Tyr Gly Gly Val Ser Ser Arg Ser Gln Cys Asp Ser Phe Pro Ala  
 145 150 155 160

Ala Leu Lys Pro Gly Cys Tyr Trp Arg Phe Asp Trp Phe Lys Asn Ala  
 165 170 175

Asp Asn Pro Thr Phe Thr Phe Arg Gln Val Gln Cys Pro Ser Glu Leu  
 180 185 190

Val Ala Arg Thr Gly Cys Arg Arg Asn Asp Asp Gly Asn Phe Pro Val  
195 200 205

Phe Thr Pro Pro Ser Gly Gly Gln Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser  
210 215 220

Ser Ala Lys Pro Thr Ser Thr Ser Thr Ser Thr Thr Ser Thr Lys Ala  
225 230 235 240

Thr Ser Thr Thr Ser Thr Ala Ser Ser Gln Thr Ser Ser Ser Thr Gly  
245 250 255

Gly Gly Cys Ala Ala Gln Arg Trp Ala Gln Cys Gly Gly Ile Gly Phe  
260 265 270

Ser Gly Cys Thr Thr Cys Val Ser Gly Thr Thr Cys Asn Lys Gln Asn  
275 280 285

Asp Trp Tyr Ser Gln Cys Leu  
290 295

<210> 4  
<211> 8  
5 <212> PRT  
<213> *Staphylotrichum coccosporum* IF0 31817  
<400> 4

Pro Ser Cys Ser Trp Pro Gly Lys  
1 5

10  
15 <210> 5  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> *Staphylotrichum coccosporum* IF0 31817  
<400> 5

Ser Thr Arg Tyr Trp Asp Cys Cys Lys  
 1 5

5  
 <210> 6  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> *Staphylotrichum coccosporum* IF0 31817  
 <400> 6

Asn Ala Asp Asn Pro Thr Phe Thr Phe Arg  
 1 5 10

10  
 <210> 7  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> *Staphylotrichum coccosporum* IF0 31817  
 <400> 7

Ala Ser Val Asn Gln Pro Val Phe Ala Cys  
 1 5 10

20  
 <210> 8  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> *Staphylotrichum coccosporum* IF0 31817  
 <400> 8

Pro Gly Cys Tyr Trp Arg Phe  
 1 5

30  
 <210> 9  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> *Staphylotrichum coccosporum* IF0 31817  
 <400> 9

Thr Met Val Val Gln Ser Thr  
 1 5

40  
 <210> 10  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> *Staphylotrichum coccosporum* IF0 31817  
 <400> 10

Gln Asn Asp Trp Tyr Ser Gln Cys Leu  
 1 5

50  
 <210> 11  
 <211> 8  
 <212> PRT

ES 2 575 526 T3

<213> *Staphylotrichum coccosporum* IF0 31817

<400> 11

**Pro Ser Cys Ser Trp Pro Gly Lys**  
**1 5**

5

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

10 <213> *Staphylotrichum coccosporum* IF0 31817

<400> 12

**Ser Thr Arg Tyr Trp Asp Cys Cys Lys**  
**1 5**

15

<210> 13

<211> 10

<212> PRT

20 <213> *Staphylotrichum coccosporum* IF0 31817

<400> 13

**Asn Ala Asp Asn Pro Thr Phe Thr Phe Arg**  
**1 5 10**

25

<210> 14

<211> 16

<212> PRT

<213> *Staphylotrichum coccosporum* IF0 31817

30

<400> 14

**Ala Ser Val Asn Gln Pro Val Phe Ala Cys Ser Ala Asn Phe Gln Arg**  
**1 5 10 15**

35

<210> 15

<211> 22

<212> PRT

<213> *Staphylotrichum coccosporum* IF0 31817

40

<400> 15

**Ser Gly Cys Asp Gly Gly Ser Ala Tyr Ala Cys Ala Asp Gln Thr Pro**  
**1 5 10 15**

Trp Ala Val Asn Asp Asn 20

45

<210> 16

<211> 11

<212> PRT

<213> *Staphylotrichum coccosporum* IF0 31817

<400> 16

Pro Gly Cys Tyr Trp Arg Phe Asp Trp Phe Lys  
 1 5 10

5 <210> 17  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> *Staphylotrichum coccosporum* IF0 31817  
 <400> 17

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

10 <210> 18  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 15 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador STCE1-CN

20 <400> 18  
 gcggatccat gcgttctcc cccgtc 26

25 <210> 19  
 <211> 28  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador STCE1-CC

<400> 19  
 gcggatcctt aaaggcactg cgagtacc 28

35 <210> 20  
 <211> 39  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador STCE-HNBam

<400> 20  
 ggggatcctt gggacaagat gcgttctcc cccgtcctc 39

45 <210> 21  
 <211> 35  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

50 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador STCE-HCBam

<400> 21  
 ggggatccg ctcaaaggca ctgcgagtac cagtc 35

55 <210> 22  
 <211> 1037  
 <212> ADN  
 <213> *Staphylotrichum coccosporum* IF0 31817  
 60

ES 2 575 526 T3

<220>  
 <221> sig\_peptide  
 <222>(1)..(63)  
 <223>  
 5  
 <220>  
 <221> exón  
 <222>(64)..(333)  
 <223>  
 10  
 <220>  
 <221> exón  
 <222>(420)..(1037)  
 <223>  
 15  
 <220>  
 <221> Intrón  
 <222>(334)..(419)  
 <223>  
 20  
 <400> 22

```

atgogttcct cccccgtcct ccgcacggcc ctggccgctg ccctccccct gcccgocctc      60

gct gcc gat ggc aag tcg acc cgc tac tgg gac tgt tgc aag ccg tcg      108
  Ala Asp Gly Lys Ser Thr Arg Tyr Trp Asp Cys Cys Lys Pro Ser
      1           5           10           15

tgc tcg tgg ccc ggc aag gcc tcg gtg aac cag ccc gtc ttc gcc tgc      156
  Cys Ser Trp Pro Gly Lys Ala Ser Val Asn Gln Pro Val Phe Ala Cys
           20           25           30

agc gcc aac ttc cag cgc atc agc gac ccc aac gtc aag tcg ggc tgc      204
  Ser Ala Asn Phe Gln Arg Ile Ser Asp Pro Asn Val Lys Ser Gly Cys
           35           40           45

gac ggc ggc tcc gcc tac gcc tgc gcc gac cag acc ccg tgg gcc gtc      252
  Asp Gly Gly Ser Ala Tyr Ala Cys Ala Asp Gln Thr Pro Trp Ala Val
           50           55           60

aac gac aac ttc tcg tac ggc ttc gcc gcc acg tcc atc tcg ggc ggc      300
  Asn Asp Asn Phe Ser Tyr Gly Phe Ala Ala Thr Ser Ile Ser Gly Gly
           65           70           75

aac gag gcc tcg tgg tgc tgt ggc tgc tac gag tgagtgttc ccccccccc      353
  Asn Glu Ala Ser Trp Cys Cys Gly Cys Tyr Glu
      80           85           90

cccccccaac ccccggttcg gtcccttgcc gtgccttctt cataactaacc gcctaccccc      413
  
```

ES 2 575 526 T3

tccagg ctg acc ttc acc tcg ggc ccc gtc gct ggc aag acc atg gtt	461
Leu Thr Phe Thr Ser Gly Pro Val Ala Gly Lys Thr Met Val	
95 100	
gtc cag tcc acc tcg acc ggc ggc gac ctc ggc acc aac cac ttc gac	509
Val Gln Ser Thr Ser Thr Gly Gly Asp Leu Gly Thr Asn His Phe Asp	
105 110 115 120	
ctg gcc atg ccc ggt ggt ggt gtc ggc atc ttc gac ggc tgc tcg ccc	557
Leu Ala Met Pro Gly Gly Gly Val Gly Ile Phe Asp Gly Cys Ser Pro	
125 130 135	
cag ttc ggc ggc ctc gcc ggc gac cgc tac ggc ggc gtc tcg tog cgc	605
Gln Phe Gly Gly Leu Ala Gly Asp Arg Tyr Gly Gly Val Ser Ser Arg	
140 145 150	
agc cag tgc gac tog ttc ccc gcc gcc ctc aag ccc ggc tgc tac tgg	653
Ser Gln Cys Asp Ser Phe Pro Ala Ala Leu Lys Pro Gly Cys Tyr Trp	
155 160 165	
cgc ttc gac tgg ttc aag aac gcc gac aac ccg acc ttc acc ttc cgc	701
Arg Phe Asp Trp Phe Lys Asn Ala Asp Asn Pro Thr Phe Thr Phe Arg	
170 175 180	
cag gtc cag tgc ccg tcg gag ctc gtc gcc cgc acc ggc tgc cgc cgc	749
Gln Val Gln Cys Pro Ser Glu Leu Val Ala Arg Thr Gly Cys Arg Arg	
185 190 195 200	
aac gac gac ggc aac ttc ccc gtc ttc acc cct ccc tcg ggc ggt cag	797
Asn Asp Asp Gly Asn Phe Pro Val Phe Thr Pro Pro Ser Gly Gly Gln	
205 210 215	
tcc tcc tcg tet tcc tcc tcc agc agc gcc aag ccc acc tcc acc tcc	845
Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ala Lys Pro Thr Ser Thr Ser	
220 225 230	

ES 2 575 526 T3

acc tgc acc acc tcc acc aag gct acc tcc acc acc tgc acc gcc tcc 893  
 Thr Ser Thr Thr Ser Thr Lys Ala Thr Ser Thr Thr Ser Thr Ala Ser  
                   235                                  240                                  245

agc cag acc tgc tgc tcc acc ggc ggc ggc tgc gcc gcc cag cgc tgg 941  
 Ser Gln Thr Ser Ser Ser Thr Gly Gly Gly Cys Ala Ala Gln Arg Trp  
                   250                                  255                                  260

gcg cag tgc ggc ggc atc ggg ttc tgc ggc tgc acc acg tgc gtc agc 989  
 Ala Gln Cys Gly Gly Ile Gly Phe Ser Gly Cys Thr Thr Cys Val Ser  
 265                                  270                                  275                                  280

ggc acc acc tgc aac aag cag aac gac tgg tac tgc cag tgc ctt tga 1037  
 Gly Thr Thr Cys Asn Lys Gln Asn Asp Trp Tyr Ser Gln Cys Leu  
                                   285                                  290                                  295

- 5     <210> 23  
       <211> 39  
       <212> ADN  
       <213> Secuencia artificial
  
- 10    <220>  
       <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador NCE4-N-BamHI
  
- <400> 23  
       ggggatcctg ggacaagatg cggtcctccc ctctcctcc                   39
  
- 15    <210> 24  
       <211> 37  
       <212> ADN  
       <213> Secuencia artificial
  
- 20    <220>  
       <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador NCE4-C-BamHI
  
- <400> 24  
       ggggatcctg cgtttacagg cactgatggt accagtc                   37
  
- 25    <210> 25  
       <211> 34  
       <212> ADN  
       <213> Secuencia artificial
  
- 30    <220>  
       <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador STCE1-N-S9A4
  
- <400> 25  
       gggatcctgc gtttaaaggc actgcgagta ccag                   34
  
- 35    <210> 26  
       <211> 24  
       <212> ADN  
       <213> Secuencia artificial
  
- 40    <220>  
       <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador STCE1-C-FokF
  
- <400> 26

# ES 2 575 526 T3

5            gggatgcaag ccgtcgtgct cgtg            24  
              <210> 27  
              <211> 23  
              <212> ADN  
              <213> Secuencia artificial  
  
 10           <220>  
              <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador STCE1-N-FokR4  
  
              <400> 27  
              gggatgggcc cagccgcacg aag            23  
  
 15           <210> 28  
              <211> 20  
              <212> ADN  
              <213> Secuencia artificial  
  
 20           <220>  
              <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador STCE1-C-BamF  
  
              <400> 28  
              gggatcctgg gacaagatgc            20  
  
 25           <210> 29  
              <211> 35  
              <212> ADN  
              <213> Secuencia artificial  
  
 30           <220>  
              <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador STCE1-N-SmaI  
  
              <400> 29  
              cagcccgggg cgcacatgc gttctcccc tctcc            35  
  
 35           <210> 30  
              <211> 33  
              <212> ADN  
              <213> Secuencia artificial  
  
 40           <220>  
              <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador STCE1-C-XhoI  
  
              <400> 30  
              gcctcgagta ccttaaaggc actgagagta cca            33  
  
 45           <210> 31  
              <211> 26  
              <212> ADN  
              <213> Secuencia artificial  
  
 50           <220>  
              <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador STCE1-M-SphI  
  
              <400> 31  
              ccgcatgctg tgatggcaag tccacc            26  
  
 55           <210> 32  
              <211> 33  
              <212> ADN  
              <213> Secuencia artificial  
  
 60           <220>  
              <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador STCE1-C-XhoI  
  
              <400> 32

ES 2 575 526 T3

gcctcgagta ccttaaaggc actgcgagta cca 33

<210> 33  
<211> 21  
<212> PRT  
<213> *Staphylotrichum coccosporum* IF0 31817

<400> 33

Met Arg Ser Ser Pro Val Leu Arg Thr Ala Leu Ala Ala Ala Leu Pro  
1 5 10 15

Leu Ala Ala Leu Ala  
20

<210> 34  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> *Humicola insolens*

<400> 34

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

Val Leu Ala Leu  
20

<210> 35  
<211> 286  
<212> PRT  
<213> *Humicola insolens*

<400> 35

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

Cys Gly Trp Ala Lys Lys Ala Pro Val Asn Gln Pro Val Phe Ser Cys  
20 25 30

Asn Ala Asn Phe Gln Arg Leu Thr Asp Phe Asp Ala Lys Ser Gly Cys  
 35 40 45

Glu Pro Gly Gly Val Ala Tyr Ser Cys Ala Asp Gln Thr Pro Trp Ala  
 50 55 60

Val Asn Asp Asp Phe Ala Phe Gly Phe Ala Ala Thr Ser Ile Ala Gly  
 65 70 75 80

Ser Asn Glu Ala Gly Trp Cys Cys Ala Cys Tyr Glu Leu Thr Phe Thr  
 85 90 95

Ser Gly Pro Val Ala Gly Lys Lys Met Val Val Gln Ser Thr Ser Thr  
 100 105 110

Gly Gly Asp Leu Gly Ser Asn His Phe Asp Leu Asn Ile Pro Gly Gly  
 115 120 125

Gly Val Gly Ile Phe Asp Gly Cys Thr Pro Gln Phe Gly Gly Leu Pro  
 130 135 140

Gly Gln Arg Tyr Gly Gly Ile Ser Ser Arg Asn Glu Cys Asp Arg Phe  
 145 150 155 160

Pro Asp Ala Leu Lys Pro Gly Cys Tyr Trp Arg Phe Asp Trp Phe Lys  
 165 170 175

Asn Ala Asp Asn Pro Ser Phe Ser Phe Arg Gln Val Gln Cys Pro Ala  
 180 185 190

Glu Leu Val Ala Arg Thr Gly Cys Arg Arg Asn Asp Asp Gly Asn Phe  
 195 200 205

Pro Ala Val Gln Ile Pro Ser Ser Ser Thr Ser Ser Pro Val Gly Gln  
 210 215 220

Pro Thr Ser Thr Ser Thr Thr Ser Thr Ser Thr Thr Ser Ser Pro Pro  
 225 230 235 240

Val Gln Pro Thr Thr Pro Ser Gly Cys Thr Ala Glu Arg Trp Ala Cys  
 245 250 255

Gln Cys Gly Gly Asn Gly Trp Ser Gly Cys Thr Thr Cys Val Ala Gly  
 260 265 270

Ser Thr Cys Thr Lys Ile Asn Asp Trp Tyr His Gln Cys Leu  
 275 280 285

<210> 36  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> *Humicola insolens*

<400> 36

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

Ala

<210> 37  
 <211> 206  
 <212> PRT  
 <213> *Humicola insolens*



ES 2 575 526 T3

Gly Ser Asn Glu Arg Gln Trp Cys Cys Ala Cys Tyr Glu Leu Thr Phe  
85 90 95

Thr Ser Gly Pro Val Ala Gly Lys Arg Met Ile Val Gln Ala Ser Asn  
100 105 110

Thr Gly Gly Asp Leu Gly Asn Asn His Phe Asp Ile Ala Met Pro Gly  
115 120 125

Gly Gly Val Gly Ile Phe Asn Ala Cys Thr Asp Gln Tyr Gly Ala Pro  
130 135 140

Pro Asn Gly Trp Gly Gln Arg Tyr Gly Gly Ile Ser Gln Arg His Glu  
145 150 155 160

Cys Asp Ala Phe Pro Glu Lys Leu Lys Pro Gly Cys Tyr Trp Arg Phe  
165 170 175

Asp Trp Phe Leu Asn Ala Asp Asn Pro Ser Val Asn Trp Arg Gln Val  
180 185 190

Ser Cys Pro Ala Glu Ile Val Ala Lys Ser Gly Cys Ser Arg  
195 200 205

## REIVINDICACIONES

1. Una proteína que se selecciona de entre el grupo que consiste en:
  - (a) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3,
  - (b) una proteína modificada que comprende una secuencia de aminoácidos en la que de 1 a 30 aminoácidos se han eliminado, sustituido, insertado, o añadido en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, y que tiene una actividad endoglucanasa, y
  - (c) una proteína homóloga que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 % de identidad con la de SEQ ID NO: 3, y que tiene una actividad endoglucanasa.
2. Un polinucleótido que codifica la proteína de acuerdo con la reivindicación 1.
3. Un polinucleótido que se selecciona de entre el grupo que consiste en:
  - (i) un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos 64-948 de SEQ ID NO: 2, y
  - (ii) un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos en la que de 1 a 30 nucleótidos se han eliminado, sustituido, insertado, o añadido en la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos 64-948 de SEQ ID NO: 2, y que codifica una proteína que tiene una actividad endoglucanasa.
4. Un vector de expresión que comprende el polinucleótido de 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.
7. La célula huésped de acuerdo con la reivindicación 6, en la que la levadura es un organismo que pertenece al género *Saccharomyces*, *Hansenula*, o *Pichia*.
8. La célula huésped de acuerdo con la reivindicación 6, en la que el hongo filamentoso es un microorganismo que pertenece al género *Humicola*, *Trichoderma*, *Staphylotrichum*, *Aspergillus*, *Fusarium*, o *Acremonium*.
9. La célula huésped de acuerdo con la reivindicación 8, en la que el hongo filamentoso es *Humicola insolens* o *Trichoderma viride*.
10. Un procedimiento de producción de la proteína de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende las etapas de:
  - cultivar las células huésped de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9, y
  - recolectar la proteína a partir de las células huésped o un cultivo que se obtiene por el cultivo.
11. Una proteína producida por el procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10.
12. Una preparación de celulasa que comprende la proteína de acuerdo con la reivindicación 1 u 11.
13. Una composición detergente que comprende la proteína de acuerdo con la reivindicación 1 u 11 o la preparación de celulasa de acuerdo con la reivindicación 12.
14. Un procedimiento para tratar un tejido que contiene celulosa, que comprende la etapa de poner en contacto el tejido que contiene celulosa con la proteína de acuerdo con la reivindicación 1 u 11, la preparación de celulasa de acuerdo con la reivindicación 12, o la composición detergente de acuerdo con la reivindicación 13.
15. Un procedimiento para reducir la pelusa de un tejido que contiene celulosa o reducir la tasa de formación de pelusa, que comprende la etapa de poner en contacto el tejido que contiene celulosa con la proteína de acuerdo con la reivindicación 1 u 11, la preparación de celulasa de acuerdo con la reivindicación 12, o la composición detergente de acuerdo con la reivindicación 13.
16. Un procedimiento de reducción del peso para mejorar el tacto y la apariencia de un tejido que contiene celulosa, que comprende la etapa de poner en contacto el tejido que contiene celulosa con la proteína de acuerdo con la reivindicación 1 u 11, la preparación de celulasa de acuerdo con la reivindicación 12, o la composición detergente de acuerdo con la reivindicación 13.
17. Un procedimiento de clarificación de un tejido que contiene celulosa coloreada coloreada, que comprende la etapa de poner en contacto el tejido que contiene celulosa coloreada coloreada con la proteína de acuerdo con la reivindicación 1 u 11, la preparación de celulasa de acuerdo con la reivindicación 12, o la composición detergente de acuerdo con la reivindicación 13.
18. Un procedimiento para proporcionar un cambio de color localizado en un tejido que contiene celulosa coloreada coloreada, que comprende la etapa de poner en contacto el tejido que contiene celulosa coloreada coloreada con la

proteína de acuerdo con la reivindicación 1 u 11, la preparación de celulasa de acuerdo con la reivindicación 12, o la composición detergente de acuerdo con la reivindicación 13.

5 19. 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 en contacto el tejido que contiene celulosa con la proteína de acuerdo con la reivindicación 1 u 11, la preparación de celulasa de acuerdo con la reivindicación 12, o la composición detergente de acuerdo con la reivindicación 13.

20. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 19, en el que el tratamiento del tejido se lleva a cabo remojando, lavando, o aclarando el tejido.

10 21. Un procedimiento para eliminar la tinta del papel desechado, que comprende la etapa de tratar el papel desechado con la proteína de acuerdo con la reivindicación 1 u 11 o la preparación de celulasa de la reivindicación 12 junto con un agente de eliminación de la tinta.

22. Un procedimiento para mejorar la liberación de agua de la pasta de papel, que comprende la etapa de tratar la pasta de papel con la proteína de acuerdo con la reivindicación 1 u 11 o la preparación de celulasa de acuerdo con la reivindicación 12.

15 23. Un procedimiento para mejorar la digestibilidad de un pienso para animales, que comprende la etapa de tratar un tejido que contiene celulosa con la proteína de acuerdo con la reivindicación 1 u 11 o la preparación de celulasa de acuerdo con la reivindicación 12.

[Figura 1]

NCE4	MRSSPLLRSAVVAALPVLAL-----AADGKSTRYWDCKPSCGWAK	21
	***** * *	
STCE1	MRSSPVLRTALAAALPLAALA-----ADGKSTRYWDCKPSCSWPG	20
	* ***** **	
NCE5	MQLPLTLLTLLPALAA-----AQSGSGRTRYWDCKPSCAWPG	23
	<u>Péptido de señal</u> → <u>Dominio catalítico</u> →	
NCE4	KAPVNPVFSCNANFORL TDF-DAKSGCEPGGVAYSCADQTPWAVNDDFA	70
	** ***** * ***** *        **** ** ** ***** *	
STCE1	KASVNPVFACSANFOR I SDP-NVKS GCD-GGSAYACADQTPWAVNDNFS	68
	*    ** *            * *        **** ** ** * ** ***** *	
NCE5	KGPA-PVRTCDRWDNPLFDGGNTRSGCDAGGGAYMCSQSPWAVSDDLA-	71
NCE4	FGFAATS I AGSNEAGWCCACYELTFTSGPVAGKMMVVQSTSTGGDLGSNH	120
	***** * *** *** ***** ***** *	
STCE1	YGFAATS I SGGNEASWCCGCYELTFTSGPVAGKTMVVQSTSTGGDLGTNH	118
	** ** * * ** *** ***** * ** ***** **	
NCE5	YGAAVNI AGSNERQWCCACYELTFTSGPVAGKRM I VQASNTGGDLGNNH	121
NCE4	FDLNIPGGGVGIFDGCTPQFGGLP---GQRYGG I SSRNECDRFPDALKPG	167
	*** ***** ***** * **** ** ** ** *****	
STCE1	FDLAMPGGGVGIFDGCSPQFGGLA---GDRYGGVSSRSQCDSFPAALKPG	165
	** ***** * * *        * **** * * ** ** *****	
NCE5	FDIAMPGGGVGIFNACTDQYGAPPNGWGQRYGG I SQRHECDFPEKPKPG	171

[Figura 2]

NCE4	CYWRFDWFKNADNPSFSFRQVQCPAELVARTGCRRNDDGNFPAVQIPSSS	217
	***** * ***** ***** **	
STCE1	CYWRFDWFKNADNPTFTFRQVQCPSELVARTGCRRNDDGNFPVFTPPSGG	215
	***** ***** *** ** * ** * * *	
NCE5	CYWRFDWFLNADNPSVNWVRQVSCP AE I VAKSGCSR-----	206
	Engarce→	
NCE4	TSSPVGQPTSTSTTSTSTSSPPVQPTPS-----GCTAERWA	255
	** * ***** * * ** * **	
STCE1	QSSSSSSSSSAKPTSTSTTSTKATSTTSTASSQTSSSTGGGCAAQRWA	265
NCE5	-----	
	C B D→	
NCE4	CQCGNGWWSGCTTCVAGSTCTKINDWYHQCL	286
	***** * ***** * ** * *****	
STCE1	CQCGGIGFSGCTTCVSGTTCNKQNDWYSQCL	295
NCE5	-----	