

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 608 402**

51 Int. Cl.:

C12N 9/14 (2006.01)
C12N 9/42 (2006.01)
C12P 19/02 (2006.01)
C12P 19/14 (2006.01)
D21C 5/00 (2006.01)
D21C 5/02 (2006.01)
D06M 16/00 (2006.01)
D21H 21/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.03.2010 PCT/JP2010/055897**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **06.10.2011 WO11121768**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.03.2010 E 10848946 (9)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.10.2016 EP 2554667**

54 Título: **Nuevo gen de celulasa**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.04.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

YOKOYAMA, FUMIKAZU

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 608 402 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

Nuevo gen de celulasa

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a celulasas, más particularmente, celulasas derivadas de Acremonium cellulolyticus, polinucleótidos que codifican las celulasas, un procedimiento de producción de celulasas usando los polinucleótidos, y un uso de las celulasas. El término "polinucleótido", tal como se usa en la presente memoria, incluye ADN y ARN, y modificaciones y quimeras de los mismos, preferentemente ADN.

Antecedentes de la técnica

10 Celulasa es un término genérico para las enzimas que descomponen celulosa. La celulasa producida por microorganismos está compuesta generalmente por muchos tipos de componentes de celulasa. Los componentes de celulasa se clasifican por su especificidad por el sustrato en tres tipos: celobiohidrolasa, endoglucanasa y β -glucosidasa. Se considera que Aspergillus niger, un hongo filamentoso que produce celulasa, produce cuatro tipos de celobiohidrolasa, quince tipos de endoglucanasas y quince tipos de β -glucosidasas como máximo. Por lo tanto, cuando la celulasa producida por un microorganismo se utiliza industrialmente, se usa como una mezcla de varios componentes de celulasa producidos por el microorganismo.

15 Un hongo filamentoso Acremonium cellulolyticus se caracteriza por la producción de celulasa que tiene una alta capacidad de sacarificación (literatura no de patentes 1), y se informó de que tiene alta utilidad para uso en piensos o uso en ensilaje (literaturas de patentes 1-3). Los componentes de celulasa contenidos (literaturas de patentes 4-10) han sido estudiados en detalle, y se aclara que muchos tipos de componentes de celulasa son secretados de manera similar a otros hongos filamentosos.

20 Se considera que varios tipos de componentes enzimáticos específicos en muchos tipos de componentes de celulasa son importantes para un uso limitado determinado. Por lo tanto, si la composición de componentes de celulasa de la celulasa producida por un microorganismo puede ser optimizada según el uso, se espera que pueda obtenerse una celulasa que tenga una actividad más alta. La mejor manera de conseguir esto es sobreexpresando una enzima específica mediante la introducción de su gen de enzima específica, o alterando un gen de la enzima específica, usando técnicas de recombinación de genes.

30 Sin embargo, sólo se aislaron dos tipos de celobiohidrolasas (literaturas de patente 4 y 5) y un tipo de β -glucosidasa (literatura de patentes 10) en Acremonium cellulolyticus y, de esta manera, no pudo llevarse a cabo una expresión mejorada mediante introducción de genes o expresión suprimida mediante alteración génica con respecto a las otras celulasas.

Bajo estas circunstancias, se ha deseado el aislamiento de genes para enzimas degradantes de polisacáridos, tales como endoglucanasa y β -glucosidasa, para optimizar la composición de los componentes de celulasa producidos por Acremonium cellulolyticus, usando técnicas de recombinación de genes.

Lista de citas**35 Literatura no de patente**

[Literatura no de patente 1] Agricultural and Biological Chemistry, Japón, 1987, vol. 51, p. 65

Literatura de patentes

[Literatura de patente 1] Publicación de patente japonesa (Kokai) no examinada N° 7-264994

[Literatura de patentes 2] Patente japonesa N° 2531595

40 [Literatura de patente 3] Publicación de patente japonesa (Kokai) no examinada N° 7-236431

[Literatura de patente 4] Publicación de patente japonesa (Kokai) no examinada N° 2001-17180

[Literatura de patente 5] WO97/33982

[Literatura de patentes 6] WO99/011767

[Literatura de patente 7] Publicación de patente japonesa (Kokai) no examinada N° 2000-69978

45 [Literatura de patente 8] Publicación de patente japonesa (Kokai) no examinada N° 10-066569

[Literatura de patente 9] Publicación de patente japonesa (Kokai) no examinada N° 2002-101876

[Literatura de patente 10] Publicación de patente japonesa (Kokai) no examinada N° 2000-298262

Sumario de la invención

Problema técnico

- 5 Un objeto de la presente invención es identificar genes de endoglucanasa y β -glucosidasa mediante el aislamiento de ADN genómico que contiene genes de celulasa, que se clasifican en endoglucanasas o β -glucosidasas, a partir de Acremonium cellulolyticus, y la secuenciación de las secuencias de nucleótidos del mismo.

Solución al problema

- 10 Para resolver el problema, los inventores compararon intensamente entre sí las secuencias de aminoácidos de las endoglucanasas y las β -glucosidasas conocidas con el fin de encontrar una región de secuencias de aminoácidos conservada en Acremonium cellulolyticus, y se diseñaron diversos cebadores en base a la información. Se llevó a cabo una PCR usando los diferentes cebadores diseñados de esta manera y ADN genómico o ADNc como plantilla. Como resultado, se obtuvieron fragmentos genéticos de endoglucanasas y β -glucosidasas. Los cebadores se diseñaron en base a los fragmentos genéticos, y la PCR se llevó a cabo para amplificar nueve genes de endoglucanasas y β -glucosidasas.
- 15 Se secuenciaron secuencias de nucleótidos de los mismos, y se completó la presente invención.

La presente invención se refiere a:

[1] una proteína seleccionada de entre:

una proteína que comprende los aminoácidos 1-301 de la SEC ID N°: 14;

[2] la proteína de [1], en la que la proteína se deriva a partir de un hongo filamentoso,

20 [3] la proteína de [2], en la que el hongo filamentoso es Acremonium cellulolyticus,

[4] un nucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína según cualquiera de [1] a [3],

[5] un polinucleótido que es un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos de SEC ID N°: 13,

[6] un polinucleótido que es un ADN seleccionado de entre:

(i) un ADN que codifica la proteína de [1]

25 (ii) un ADN que comprende los nucleótidos 124-1143 de la SEC ID N°: 13;

[7] el ADN en el que una secuencia de intrón es retirada del ADN de [6],

[8] el ADN de [7], en el que la secuencia de intrón son los nucleótidos 225-275 de la SEC ID N°: 13,

[9] el ADN en la que una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia señal es eliminada del ADN de uno cualquiera de [5] a [8],

30 [10] el ADN de [9], en el que la secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia señal son los nucleótidos 124-186 de la SEC ID N°: 13,

[11] un vector de expresión, que comprende el ADN de uno cualquiera de [4] a [10],

[12] una célula huésped transformada con el vector de expresión de [11],

[13] la célula huésped de [12], en la que la célula huésped es una levadura o un hongo filamentoso,

35 [14] la célula huésped de [13], en la que la levadura es un microorganismo que pertenece al género Saccharomyces, Hansenula, o Pichia,

[15] la célula huésped de [14], en la que la levadura es Saccharomyces cerevisiae,

[16] la célula huésped de [13], en la que el hongo filamentoso es un microorganismo que pertenece al género Humicola, Aspergillus, Trichoderma, Fusarium o Acremonium,

40 [17] la célula huésped de [16], en la que el hongo filamentoso es Acremonium cellulolyticus, Humicola insolens, Aspergillus niger, Aspergillus oryzae, Trichoderma viride o Fusarium oxysporum,

[18] un hongo filamentososo que pertenece al género Acremonium, que es deficiente en un gen que corresponde al ADN de uno cualquiera de [4] a [10] por recombinación homóloga,

[19] el hongo filamentososo de [18], en el que el hongo filamentososo es Acremonium cellulolyticus,

[20] un procedimiento de producción de la proteína de una cualquiera de [1] a [3], que comprende:

5 cultivar las células huésped de uno cualquiera de [12] a [17]; y

recoger la proteína de las células huésped y/o su cultivo,

[21] una proteína producida mediante el procedimiento de [20],

[22] una preparación de celulasa que comprende la proteína de una cualquiera de [1] a [3] y [21],

[23] un procedimiento de sacarificación de biomasa, que comprende:

10 poner en contacto biomasa que contiene celulosa con la proteína de una cualquiera de [1] a [3] y [21] o la preparación de celulasa de [22],

[24] un procedimiento de tratamiento de un tejido que contiene celulosa, que comprende:

poner en contacto el tejido que contiene celulosa con la proteína de una cualquiera de [1] a [3] y [21] o la preparación de celulasa de [22],

15 [25] un procedimiento de destintado de papelote, caracterizado por el uso de la proteína de una cualquiera de [1] a [3] y [21] o la preparación de celulasa de [22], en el procedimiento de tratamiento del papelote junto con un agente de destintado,

[26] un procedimiento para mejorar un drenaje de agua de la pasta de papel, que comprende:

20 el tratamiento de la pasta de papel con la proteína de una cualquiera de [1] a [3] y [21] o la preparación de celulasa de [22], y

[27] un procedimiento para mejorar una digestibilidad de un pienso, que comprende:

el tratamiento del pienso con la proteína de una cualquiera de [1] a [3] y [21] o la preparación de celulasa de [22].

Efectos ventajosos de la invención

25 Según la presente invención, es posible obtener ADNs que son necesarios para producir de manera eficiente endoglucanasas y β -glucosidasas específicas derivadas de Acremonium cellulolyticus como proteínas recombinantes, y para obtener microorganismos recombinantes que pueden expresar de manera eficiente estos componentes de celulasa. Además, las endoglucanasas y las β -glucosidasas específicas pueden producirse de manera eficiente a bajo costo.

30 Según la presente invención, los genes específicos de endoglucanasa y β -glucosidasa pueden ser interrumpidos del genoma de Acremonium cellulolyticus, y como resultado, es posible obtener Acremonium cellulolyticus recombinante que produce celulasa no contiene la endoglucanasa ni la β -glucosidasa, y producir la celulasa que no contiene ni la endoglucanasa ni la β -glucosidasa específicas.

35 Un sustrato a base de celulosa puede ser degradado de manera eficiente a bajo costo seleccionando un grupo de celulasas óptimo de varias celulasas obtenidas en la presente invención, y tratando el sustrato a base de celulosa con el grupo de celulasas.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 es un mapa de restricción del plásmido pACC3.

La Fig. 2 es un mapa de restricción del plásmido pACC5.

La Fig. 3 es un mapa de restricción del plásmido pACC6.

40 La Fig. 4 es un mapa de restricción del plásmido pACC7.

La Fig. 5 es un mapa de restricción del plásmido pACC8.

La Fig. 6 es un mapa de restricción del plásmido pACC9.

La Fig. 7 es un mapa de restricción del plásmido pACC10.

La Fig. 8 es un mapa de restricción del plásmido pBGLC.

La Fig. 9 es un mapa de restricción del plásmido pBGLD.

Descripción de realizaciones

5 Endoglucanasa y β -glucosidasa

La proteína de la presente invención, endoglucanasas y β -glucosidasas, puede comprender una secuencia que corresponde a la parte de proteína madura de una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre las SEC ID N°: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 y 18, o una secuencia de aminoácidos sustancialmente equivalente a la secuencia de aminoácidos.

10 La expresión "secuencia de aminoácidos sustancialmente equivalente", tal como se usa en la presente memoria, significa, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos en la que hay una modificación por la sustitución, delección y/o adición de un aminoácido o una pluralidad (preferentemente varios) de aminoácidos, pero la actividad del polipéptido no se ve afectada, o una secuencia de aminoácidos en la que tiene una identidad del 70% o superior, pero la actividad del polipéptido no se ve afectada.

15 El número de residuos de aminoácidos modificados es preferentemente de 1 a 40, más preferentemente de 1 a varios, todavía más preferentemente de 1 a 8, y más preferentemente de 1 a 4. Los ejemplos de "modificación que no afecta a la actividad", tal como se usa en la presente memoria, incluyen la sustitución conservativa. La expresión "sustitución conservativa" significa que un residuo de aminoácidos o varios residuos de aminoácidos se sustituyen con diferentes aminoácidos que tienen propiedades químicas similares sin un cambio sustancial en la actividad de un polipéptido. Los ejemplos de la sustitución conservativa incluyen una sustitución de un residuo hidrófobo por otro residuo hidrófobo, y una sustitución de un residuo polar por otro residuo polar que tiene la misma carga. Los aminoácidos que tienen propiedades químicas similares y pueden ser sustituidos entre sí de manera conservativa son conocidos por las personas con conocimientos en la materia. Más particularmente, los ejemplos de aminoácidos no polares (hidrófobos) incluyen alanina, valina, isoleucina, leucina, prolina, triptófano, fenilalanina y metionina. Los ejemplos de aminoácidos polares (neutros) incluyen glicina, serina, treonina, tirosina, glutamina, asparagina y cisteína. Los ejemplos de aminoácidos básicos que tienen una carga positiva incluyen arginina, histidina y lisina. Los ejemplos de aminoácidos ácidos que tienen una carga negativa incluyen ácido aspártico y ácido glutámico.

25 El término "identidad", tal como se usa en la presente memoria, significa un valor calculado 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 conocido por las personas con conocimientos en la materia, usando parámetros por defecto. Puede ser una identidad de preferentemente el 80% o superior, más preferentemente del 90% o superior, todavía más preferentemente del 95% o superior, todavía más preferentemente del 98% o superior, y más preferentemente del 99% o superior.

30 En la proteína de la presente invención, una secuencia de polipéptido que no afecta a la actividad enzimática de la proteína puede ser añadido al terminal N y/o al terminal C del aminoácido correspondiente a su parte madura o un aminoácido sustancialmente equivalente al mismo. Los ejemplos de la secuencia de polipéptidos incluyen una secuencia señal, un marcador de detección (por ejemplo, un marcador FLAG), y un polipéptido para la purificación [por ejemplo, glutatión S-transferasa (GST)].

35 Genes de endoglucanasa y β -glucosidasa

40 El polinucleótido de la presente invención, los genes endoglucanasa y β -glucosidasa, puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de la presente invención; una secuencia de nucleótidos seleccionada de entre las secuencias de nucleótidos 136-1437 de la SEC ID N°: 1, nucleótidos 128-1615 de la SEC ID N°: 3, nucleótidos 169-1598 de la SEC ID N°: 5, nucleótidos 70-1376 de la SEC ID N°: 7, nucleótidos 141-974 de la SEC ID N°: 9, nucleótidos 114-1230 de la SEC ID N°: 11, nucleótidos 124-1143 de la SEC ID N°: 13, nucleótidos 238-1887 de la SEC ID N°: 15, y nucleótidos 66-1765 de la SEC ID N°: 17; o una secuencia de nucleótidos que puede hibridarse a estos nucleótidos bajo condiciones rigurosas.

45 La expresión "bajo condiciones rigurosas", tal como se usa en la presente memoria, significa que una membrana después de la hibridación se lava a alta temperatura en una solución de baja concentración de sal, por ejemplo, a 60°C durante 20 minutos en una solución de 2 x SSC (1 x SSC: 15 mmol/l de citrato trisódico y 150 mmol/l de cloruro de sodio) que contiene el 0,5% de SDS.

50 Clonación de genes de endoglucanasa y β -glucosidasa

Los genes de endoglucanasa y β -glucosidasa de la presente invención pueden aislarse a partir de Acremonium

cellulolyticus o su cepa mutante, por ejemplo, mediante el procedimiento siguiente. Debido a que las secuencias de nucleótidos se divulgan en la presente memoria, pueden ser sintetizados químicamente de manera artificial.

El ADN genómico se extrae a partir de micelios Acremonium cellulolyticus mediante un procedimiento convencional. El ADN genómico se digiere con una enzima de restricción apropiada, y se liga con un vector apropiado para preparar una biblioteca de ADN genómico de Acremonium cellulolyticus. Pueden usarse varios vectores, por ejemplo, un vector plásmido, un vector fago, un vector cósmido o un vector BAC, como el vector.

A continuación, pueden prepararse sondas adecuadas en base a las secuencias de nucleótidos de los genes de endoglucanasa y β -glucosidasa descritas en la presente memoria descriptiva, y los fragmentos de ADN que contienen genes de endoglucanasa y β -glucosidasa deseados pueden aislarse de la biblioteca de ADN genómico mediante hibridación. De manera alternativa, un gen deseado puede aislarse mediante la preparación de cebadores capaces de amplificar el gen deseado, en base a las secuencias de nucleótidos de los genes de endoglucanasa y β -glucosidasa descritos en la presente memoria descriptiva, realizando una PCR usando el ADN genómico de Acremonium cellulolyticus como una plantilla, y ligando el fragmento de ADN amplificado con un vector apropiado. Debido a que los genes de endoglucanasa y β -glucosidasa de la presente invención están contenidos en los plásmidos pACC3, pACC5, pACC6, pACC7, pACC8, pACC9, pACC10, pBGLC y pBGLD, estos plásmidos pueden usarse como un ADN plantilla para PCR. Además, los fragmentos de ADN deseados pueden prepararse mediante digestión de los plásmidos con enzimas de restricción apropiadas.

Depósito de microorganismos

Escherichia coli transformada con pACC3 (Escherichia coli TOP10/pACC3) se depositó internacionalmente en el International Patent Organism Depository National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (Address: AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-chome Tukuba-shi, Ibarakiken 305-8566 Japón) el 9 de octubre 2008. El número de depósito internacional es FERM BP-11029.

Escherichia coli transformada con pACC5 (Escherichia coli TOP10/pACC5) se depositó internacionalmente en el International Patent Organism Depository National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (Address: AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-chome Tukuba-shi, Ibarakiken 305-8566 Japón) el 9 de octubre 2008. El número de depósito internacional es FERM BP-11030.

Escherichia coli transformada con pACC6 (Escherichia coli TOP10/pACC6) se depositó internacionalmente en el International Patent Organism Depository National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (Address: AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-chome Tukuba-shi, Ibarakiken 305-8566 Japón) el 9 de octubre 2008. El número de depósito internacional es FERM BP-11031.

Escherichia coli transformada con pACC7 (Escherichia coli TOP10/pACC7) se depositó internacionalmente en el International Patent Organism Depository National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (Address: AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-chome Tukuba-shi, Ibarakiken 305-8566 Japón) el 9 de octubre 2008. El número de depósito internacional es FERM BP-11032.

Escherichia coli transformada con pACC8 (Escherichia coli TOP10/pACC8) se depositó internacionalmente en el International Patent Organism Depository National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (Address: AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-chome Tukuba-shi, Ibarakiken 305-8566 Japón) el 9 de octubre 2008. El número de depósito internacional es FERM BP-11033.

Escherichia coli transformada con pACC9 (Escherichia coli TOP10/pACC9) se depositó internacionalmente en el International Patent Organism Depository National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (Address: AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-chome Tukuba-shi, Ibarakiken 305-8566 Japón) el 9 de octubre 2008. El número de depósito internacional es FERM BP-11034.

Escherichia coli transformada con pACC10 (Escherichia coli TOP10/pACC10) se depositó internacionalmente en el International Patent Organism Depository National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (Address: AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-chome Tukuba-shi, Ibarakiken 305-8566 Japón) el 9 de octubre 2008. El número de depósito internacional es FERM BP-11035.

Escherichia coli transformada con pBGLC (Escherichia coli TOP10/pBGLC) se depositó internacionalmente en el International Patent Organism Depository National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (Address: AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-chome Tukuba-shi, Ibarakiken 305-8566 Japón) el 9 de octubre 2008. El número de depósito internacional es FERM BP-11036.

Escherichia coli transformada con pBGLD (Escherichia coli TOP10/pBGLD) se depositó internacionalmente en el International Patent Organism Depository National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (Address:

AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-chome Tukuba-shi, Ibarakiken 305-8566 Japón) el 9 de octubre 2008. El número de depósito internacional es FERM BP-11037.

Vector de expresión y microorganismo transformado

5 Según la presente invención, se proporciona un vector de expresión que comprende un ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de entre SEC ID N°: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 o 18, o su secuencia de aminoácidos modificada (en adelante, denominada simplemente secuencia de ADN de la presente invención), en la que el ADN puede replicarse en un microorganismo huésped y puede expresarse una proteína codificada por el ADN. El vector de expresión puede ser construido en base a un vector autorreplicante tal como un plásmido, que existe como un cuerpo extra-cromosómico independiente y no depende de la replicación del cromosoma. El vector de expresión puede ser uno que puede ser incorporado en el genoma de un microorganismo huésped, cuando se transforma con el vector de expresión, y que puede replicarse junto con la replicación del cromosoma. El vector de expresión de la presente invención puede ser construido según los procedimientos y los métodos ampliamente usados en el campo de la ingeniería genética.

15 El vector de expresión de la presente invención incluye preferentemente no sólo el ADN de la presente invención, sino también una secuencia de ADN capaz de regular la expresión del ADN, un marcador genético para seleccionar un transformante, o similares, para expresar una proteína que tiene una actividad deseada mediante la incorporación del vector de expresión en un microorganismo huésped. Los ejemplos de la secuencia de ADN capaz de regular la expresión incluyen un promotor, un terminador y una secuencia de ADN que codifica un péptido señal. El promotor no está limitado, siempre que muestre una actividad transcripcional en un microorganismo huésped, y puede ser obtenido como una secuencia de ADN que regula la expresión de un gen que codifica una proteína de una especie igual o diferente del microorganismo. El péptido señal no está limitado, siempre que contribuya a la secreción de una proteína en un microorganismo huésped, y puede ser obtenido como una secuencia de ADN que se deriva de un gen que codifica una proteína de una especie igual o diferente del microorganismo. El marcador genético en la presente invención puede seleccionarse apropiadamente según un procedimiento de selección de transformantes, y sus ejemplos incluyen un gen que codifica una resistencia a los medicamentos, y un gen que complementa la auxotrofia.

20 Según la presente invención, se proporciona un microorganismo transformado con el vector de expresión. El sistema huésped-vector no está limitado, y por ejemplo, puede usarse un sistema que usa *Escherichia coli*, actinomicetos, levaduras, hongos filamentosos o similares, o un sistema que usa los mismos para expresar una proteína fusionada con otra proteína.

30 La transformación de un microorganismo con el vector de expresión puede llevarse a cabo según técnicas usadas ampliamente en este campo.

Además, la proteína de la presente invención puede obtenerse cultivando el transformante resultante en un medio apropiado, y aislándolo del cultivo. Por lo tanto, según otra realización de la presente invención, se proporciona un procedimiento de producción de la nueva proteína de la presente invención. El cultivo del transformante y sus condiciones pueden ser esencialmente los mismos que los del microorganismo usado. Después del cultivo del transformante, la proteína de interés puede recuperarse mediante un procedimiento usado ampliamente en este campo.

40 Según una realización preferente de la presente invención, se proporciona una célula de levadura capaz de expresar la enzima endoglucanasa o β -glucosidasa codificada por la secuencia de ADN de la presente invención. Los ejemplos de la célula de levadura en la presente invención incluyen un microorganismo que pertenece al género Saccharomyces, Hansenula o Pichia, como Saccharomyces cerevisiae.

El hongo filamentosamente huésped en la presente invención puede ser un microorganismo que pertenece al género Humicola, Aspergillus, Trichoderma, Fusarium o Acremonium. Los ejemplos preferentes de los mismos incluyen Humicola insolens, Aspergillus niger, Aspergillus oryzae, Trichoderma viride, Fusarium oxysporum o Acremonium cellulolyticus.

45 Expresión de la endoglucanasa o β -glucosidasa específica puede ser suprimida mediante la incorporación del gen de la presente invención, que se liga con un vector apropiado, en Acremonium cellulolyticus para suprimir la expresión, o mediante la interrupción del gen usando recombinación homóloga para interrumpir su función. La interrupción del gen utilizando recombinación homóloga puede llevarse a cabo según un procedimiento usado ampliamente, y la construcción de vector para la interrupción del gen y la incorporación del mismo en un huésped son evidentes para las personas con conocimientos en la materia.

50 Preparación de celulasa

La proteína de la presente invención puede obtenerse cultivando el transformante resultante en un medio apropiado, y aislándolo del cultivo. El cultivo del transformante y sus condiciones pueden seleccionarse apropiadamente según el microorganismo usado. La recogida y purificación de la proteína de interés a partir del cultivo pueden llevarse a cabo

según un procedimiento convencional.

Preparación de celulasa

5 Según otra realización de la presente invención, se proporciona una preparación de celulasa que contiene la proteína (celulasa) de la presente invención. La preparación de celulasa de la presente invención puede producirse mezclando la celulasa de la presente invención con un componente generalmente contenido, por ejemplo, un excipiente (por ejemplo, lactosa, cloruro de sodio o sorbitol), un tensioactivo o un conservante. La preparación de celulasa de la presente invención puede prepararse en una forma apropiada, tal como polvo o líquido.

Uso de celulasa

10 Según la presente invención, se considera que la sacarificación de biomasa puede mejorarse de manera eficiente tratando la biomasa con la enzima celulasa (grupo) o la preparación de celulasa de la presente invención. Según la presente invención, se proporciona un procedimiento para mejorar la sacarificación de biomasa, que comprende la etapa de tratar la biomasa con la enzima celulasa (grupo) o la preparación de celulasa de la presente invención. Los ejemplos de la biomasa que puede ser tratada con la presente invención incluyen la paja de arroz, bagazo, rastrojo de maíz, pulpa de frutas tales como coco, y residuos de madera, y materiales obtenidos tratando previamente, de manera adecuada, los mismos.

15 Según la presente invención, se proporcionan un procedimiento de aclaramiento del color de un tejido que contiene celulosa coloreada, que comprende la etapa de tratar el tejido que contiene celulosa coloreada con la enzima celulasa (grupo) o preparación de celulasa, y un procedimiento de provisión de una variación localizada en color de un tejido que contiene celulosa coloreada, es decir, un procedimiento de provisión de un aspecto lavado a la piedra al tejido que contiene celulosa coloreada. Este procedimiento comprende la etapa de tratar el tejido que contiene celulosa coloreada con la enzima celulasa (grupo) o la preparación de celulasa de la presente invención.

20 Según la presente invención, se considera que un grado de drenaje de agua de la pasta de papel puede mejorarse de manera eficiente tratando la pasta de papel con la enzima de endoglucanasa de la presente invención sin una reducción notable de la resistencia. Por lo tanto, según la presente invención, se proporciona un procedimiento para mejorar un refinado de agua de la pasta de papel, que comprende la etapa de tratar la pasta de papel con la enzima endoglucanasa o la preparación de celulasa de la presente invención. Los ejemplos de pulpa que puede ser tratada con la presente invención incluyen pasta de papel de desperdicio, pasta de cartón reciclado, pasta kraft, pasta de sulfito y de tratamiento termomecánico y otra pasta de alto rendimiento.

25 Además, la digestibilidad de glucano en el pienso puede mejorarse usando la endoglucanasa de la presente invención en el pienso. Por lo tanto, según la presente invención, se proporciona un procedimiento para mejorar una digestibilidad del pienso, que comprende la etapa de tratar el pienso con la enzima endoglucanasa o la preparación de celulasa de la presente invención.

Ejemplos

35 La presente invención se ilustrará ahora adicionalmente mediante el siguiente ejemplo, pero la misma no se limita en modo alguno a dicho ejemplo.

«Ejemplo 1: Clonación del gen ACC3»

(1-1) Aislamiento del ADN genómico

40 Acremonium cellulolyticus ACCP-5-1 se cultivó en un medio o unos medios (2% de caldo, 0,5% de extracto de levadura y 2% de glucosa) a 32°C durante 2 días, y se centrifugó para recoger el micelio. El ADN genómico se aisló de los micelios obtenidos según el procedimiento de Horiuchi et al. (H. Horiuchi et al., J. Bacteriol., 170, 272-278, (1988)).

(1-2) Clonación del fragmento del gen ACC3

Se prepararon los siguientes cebadores en base a las secuencias de endoglucanasas conocidas clasificadas en la familia Glucósido Hidrolasa 5.

ACC3-F: GGCGTCTGTRTTYGARTGT (SEC ID N°: 19)

45 ACC3-R: AAAATGTAGTCTCCCCACCA (SEC ID N°: 20)

Se llevó a cabo una PCR usando ACC3-F y ACC3-R como cebadores y el ADN genómico como plantilla, y usando LA Taq polimerasa (Takara Bio). La PCR se llevó a cabo repitiendo 40 veces un ciclo que consiste en una reacción a 94°C durante 30 segundos, hibridación durante 30 segundos, y una reacción a 72°C durante 1 minuto. La temperatura de

hibridación se redujo escalonadamente desde 63°C a 53°C en los primeros 20 ciclos, y se mantuvo a 53°C en los siguientes 20 ciclos. El fragmento de ADN amplificado de 1 kpb se insertó en un vector plasmídico pCR2.1-TOPO usando un kit de clonación TOPO TA (Invitrogen) según un protocolo asociado al kit para obtener el plásmido TOPO-pACC3-parcial.

- 5 El fragmento de ADN insertado clonado en el plásmido TOPO-pACC3-parcial fue secuenciado usando un Kit de secuenciación BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) y un analizador genético ABI PRISM (Applied Biosystems) según los protocolos asociados a los mismos. La secuencia de nucleótidos obtenida se tradujo a la secuencia de aminoácidos, y se realizó una búsqueda de homología usando la secuencia de aminoácidos. La secuencia mostró una identidad del 74% con la de la endoglucanasa EG1 (Q8WZD7) derivada de Talaromyces emersonii y, de esta manera, se consideró que el fragmento de ADN era parte de un gen de endoglucanasa (familia Glucósido Hidrolasa 5).

(1-3) Clonación de longitud completa del gen ACC3 mediante PCR inversa

- 15 Se llevó a cabo una PCR inversa según el procedimiento de Triglia et al. (Triglia et al., Nucleic Acids Research, 16, 8186, (1988)). El ADN genómico de Acremonium cellulolyticus se digirió con Sal I durante la noche, y el ADN circular se preparó usando Mighty Mix (Takara Bio). Se llevó a cabo una PCR usando el ADN circular como plantilla y las siguientes secuencias contenidas en el fragmento del gen ACC3 como cebadores para obtener la región aguas arriba de 5' y la 5 región aguas debajo de 3' del gen ACC3.

ACC3-inv-F: ACTTCCAGACTTTCTGGTCC (SEC ID N°: 21)

ACC3-inv-R: AGGCCGAGAGTAAGTATCTC (SEC ID N°: 22)

- 20 La región aguas arriba de 5' y la región aguas debajo de 3' se secuenciaron según el procedimiento descrito en el Ejemplo 1-2 para determinar la secuencia de nucleótidos completa del gen ACC3.

Se prepararon los siguientes cebadores en base a la secuencia de nucleótidos obtenida mediante la PCR inversa y se llevó a cabo una PCR usando el ADN genómico como plantilla para amplificar el gen ACC3.

pACC3-F: GAAGGATGGTAGATTGTCCG (SEC ID N°: 23)

pACC3-R: ACCGAGAAGGATTTCTCGCA (SEC ID N°: 24)

- 25 El ADN amplificado se insertó en un vector plasmídico pCR2.1-TOPO usando un kit de clonación TOPO TA (Invitrogen) para obtener el plásmido pACC3. Escherichia coli TOP10 (Invitrogen) se transformó con el plásmido pACC3 obtenido para obtener Escherichia coli TOP10/pACC3.

(1-4) Preparación de ADNc y análisis de intrón del gen ACC3

- 30 Se cultivó Acremonium cellulolyticus ACCP-5-1 en un medio de inducción de celulasa a 32°C durante 2 días, y se centrifugó para recoger el micelio. Los micelios obtenidos se congelaron en nitrógeno líquido, y se molieron con un mortero. El ARN total se aisló de los micelios molidos usando ISOGEN (Nippon Gene) según un protocolo asociado al mismo. Además, el ARNm se purificó a partir del ARN total usando un kit de purificación de ARNm (Pharmacia) según un protocolo asociado al mismo.

- 35 Se sintetizó ADNc a partir del ARNm obtenido usando un kit de síntesis de ADNc "Timesaver cDNA Synthesis kit" (Pharmacia) según un protocolo asociado al mismo. Los siguientes cebadores que contenían el codón de iniciación y el codón de parada se prepararon en base a la secuencia del gen ACC3, y la PCR se llevó a cabo usando el ADNc como plantilla para amplificar el gen ACC3 ADNc.

ACC3-N: ATGAAGACCAGCATCATTTCTATC (SEC ID N°: 25)

ACC3-C: TCATGGGAAATAACTCTCCAGAAT (SEC ID N°: 26)

- 40 El gen ACC3 ADNc se secuenció según el procedimiento descrito en el Ejemplo 1-2, y se comparó con el gen pACC3 para determinar la ubicación de los intrones.

(1-5) Deducción de la secuencia de aminoácidos de ACC3

- 45 El gen ACC3 de endoglucanasa aislado a partir de Acremonium cellulolyticus mediante el procedimiento descrito anteriormente consistía en 1302 pb con nucleótidos correspondientes a los nucleótidos 136-1437 de la SEC ID N°: 1. Se encontró que el gen ACC3 contenía cinco intrones en las posiciones 233-291, 351-425, 579-631, 697-754 y 853-907 de la SEC ID N°: 1. La secuencia de aminoácidos de ACC3 deducida a partir del marco abierto de lectura (ORF) era la de SEC ID N°: 2. Se supuso, usando un software de predicción de secuencia de señal SignalP 3.0, que la secuencia de aminoácidos en la posición -27 a -1 de ACC3 era una secuencia de señal.

«Ejemplo 2: Clonación del gen ACC5»

(2-1) Aislamiento de ADN genómico y de ARNm y preparación de ADNc

El ADN genómico de *Acromonium cellulolyticus* ACCP-5-1 se aisló según el procedimiento descrito en el Ejemplo 1-1. El ADNc de *Acromonium cellulolyticus* ACCP-5-1 se preparó según el procedimiento descrito en el Ejemplo 1-4.

5 (2-2) Clonación del fragmento del gen ACC5

Se prepararon los siguientes cebadores en base a las secuencias de aminoácidos N-terminales de endoglucanasas conocidas clasificadas en la familia Glucósido Hidrolasa 7 y la secuencia de nucleótidos poli A.

ACC5-F: CAGCAGGCCCCACCCNGAYAAYTNGC (SEC ID N°: 27)

ACC5-R: AATTCGCGCCGCTAAAAA (SEC ID N°: 28)

10 Se llevó a cabo una PCR usando ACC5-F y ACC5-R como cebadores y ADNc como plantilla, y usando LA Taq polimerasa (Takara Bio). La PCR se llevó a cabo repitiendo 40 veces un ciclo que consiste en una reacción a 94°C durante 30 segundos, hibridación durante 30 segundos, y una reacción a 72°C durante 1 minuto. La temperatura de hibridación se redujo escalonadamente desde 63°C a 53°C en los primeros 20 ciclos, y se mantuvo a 53°C en los siguientes 20 ciclos. El fragmento de ADN amplificado de 1,5 kpb se insertó en un vector plasmídico pCR2.1-TOPO usando un kit de clonación TOPO TA (Invitrogen) según un protocolo asociado al kit para obtener el plásmido TOPO-pACC5-parcial.

15 El fragmento de ADN insertado clonado en el plásmido TOPO-pACC5-parcial se secuenció, y la secuencia de nucleótidos obtenida se tradujo en la secuencia de aminoácidos, y se llevó a cabo una búsqueda de homología usando la secuencia de aminoácidos. La secuencia mostró una identidad del 60% con la secuencia de endoglucanasa (Q4WCM9) derivada a partir de *Aspergillus fumigatus* y, de esta manera, se consideró que el fragmento de ADN era parte de un gen de endoglucanasa (familia Glucósido Hidrolasa 7).

20 (2-3) Clonación de longitud completa del gen ACC5 mediante PCR inversa

Según el procedimiento descrito en el Ejemplo 1-3, la PCR se llevó a cabo usando ADN circular (obtenido mediante digestión con HindIII) como plantilla y las siguientes secuencias contenidas en el fragmento del gen ACC5 como cebadores para obtener la región aguas arriba de 5' y la región aguas abajo de 3' del gen ACC5.

ACC5-inv-F: ATCTCACCTGCAACCTACGA (SEC ID N°: 29)

ACC5-inv-R: CCTCTTCCGTTCCACATAAA (SEC ID N°: 30)

La región aguas arriba de 5' y la región aguas abajo de 3' se secuenciaron para determinar la secuencia de nucleótidos completa del gen ACC5.

30 Se prepararon los siguientes cebadores en base a la secuencia de nucleótidos obtenida mediante la PCR inversa y se llevó a cabo una PCR usando ADN genómico como plantilla para amplificar el gen ACC5.

pACC5-F: ATTGCTCCGCATAGGTTCAA (SEC ID N°: 31)

pACC5-R: TTCAGAGTTAGTGCCTCCAG (SEC ID N°: 32)

35 El ADN amplificado se insertó en un vector plasmídico pCR2.1-TOPO usando un kit de clonación TOPO TA (Invitrogen) para obtener el plásmido pACC5. *Escherichia coli* TOP10 (Invitrogen) se transformó con el plásmido pACC5 obtenido para obtener *Escherichia coli* TOP10/pACC5.

(2-4) Análisis de intrones del gen ACC5

Los siguientes cebadores que contenían el codón de iniciación y el codón de parada se prepararon en base a la secuencia del gen ACC5, y la PCR se llevó a cabo usando el ADNc como plantilla para amplificar el gen ACC5 ADNc.

40 ACC5-N: ATGGCGACTAGACCATTGGCTTTTG (SEC ID N°: 33)

ACC5-C: CTAAGGCACTGTGAATAGTACGGA (SEC ID N°: 34)

La secuencia de nucleótidos del gen ACC5 ADNc se secuenció, y se comparó con el gen pACC5 para determinar la ubicación de los intrones.

(2-5) Deducción de la secuencia de aminoácidos de ACC5

El gen de endoglucanasa ACC5 aislado a partir de Acremonium cellulolyticus mediante el procedimiento descrito anteriormente consistía en 1488 pb con nucleótidos correspondientes a los nucleótidos 128-1615 de la SEC ID N°: 3. La secuencia de aminoácidos de ACC5 deducida a partir del marco abierto de lectura (ORF) era la de la SEC ID N°: 4. Se supuso, usando un software de predicción de secuencia de señal SignalP 3.0, que la secuencia de aminoácidos en la posición -20 a -1 de ACC5 era una secuencia de señal.

<< Ejemplo 3: Clonación del gen ACC6 >>

(3-1) Aislamiento de ADN genómico y preparación de la biblioteca genómica

El ADN genómico de Acremonium cellulolyticus ACCP-5-1 se aisló según el procedimiento descrito en el Ejemplo 1-1. El ADN genómico aislado se digirió parcialmente con Sau3AI. El producto resultante se ligó con los brazos BamHI de un kit de clonación dMBL3 de vector fágico (Stratagene) usando un kit de ligadura, véase. 2 (Takara Shuzo). La mezcla de ligadura se sometió a precipitación con etanol, y el precipitado resultante se disolvió en un tampón TE. Las partículas de fago se formaron usando la solución de mezcla de ligadura y un kit de empaquetado MaxPlax A (Epicenter Technologies), y Escherichia coli XL1-Blue MRA (P2) se infectó con las partículas de fago. Se obtuvo una biblioteca de ADN genómico de $1,1 \times 10^4$ fagos mediante este procedimiento.

(3-2) Clonación del fragmento del gen ACC6

Se prepararon los siguientes cebadores en base a las secuencias de endoglucanasas conocidas clasificadas en la familia Glucósido Hidrolasa 5.

ACC6-F: GTGAACATCGCCGGCTTYGAYTTYGG (SEC ID N°: 35)

ACC6-R: CCGTTCCACCGGGCARTTRTG (SEC ID N°: 36)

Se llevó a cabo una PCR usando ACC6-F y ACC6-R como cebadores y el ADN genómico como plantilla, y usando LA Taq polimerasa (Takara Bio). La PCR se llevó a cabo repitiendo 40 veces un ciclo que consiste en una reacción a 94°C durante 30 segundos, hibridación durante 30 segundos, y una reacción a 72°C durante 1 minuto. La temperatura de hibridación se redujo escalonadamente desde 63°C a 53°C en los primeros 20 ciclos, y se mantuvo a 53°C en los siguientes 20 ciclos. El fragmento de ADN amplificado de 300 pb se insertó en un vector plasmídico pCR2.1-TOPO usando un kit de clonación TOPO TA (Invitrogen) según un protocolo asociado al kit para obtener el plásmido TOPO-pACC6-parcial.

El fragmento de ADN insertado clonado en el plásmido TOPO-pACC6-parcial se secuenció, y la secuencia de nucleótidos obtenida se tradujo a la secuencia de aminoácidos, y se realizó una búsqueda de homología usando la secuencia de aminoácidos. La secuencia mostró una identidad del 61% con la secuencia de endoglucanasa EG3 (Q7Z7X2) derivada de Trichoderma viride y, de esta manera, se consideró que el fragmento de ADN era parte de un gen de endoglucanasa (familia Glucósido Hidrolasa 5). Este fragmento de ADN se amplificó mediante PCR usando el plásmido TOPO-pACC6-parcial como una plantilla en una manera similar, y el producto de PCR obtenido se marcó usando un sistema directo ECL (Amersham Pharmacia Biotech) para obtener una sonda.

(3-3) Cribado mediante hibridación de placas

Las placas de fagos preparadas en el Ejemplo 3-1 se transfirieron a una membrana de transferencia de nylon Hybond N+ (Amersham). La membrana se sometió a desnaturalización alcalina, se lavó con 5 x SSC (SSC: 15 mmol/l de citrato trisódico y 150 mmol/l de cloruro de sodio), y se secó para inmovilizar el ADN en la membrana. Después de la prehibridación (42°C) durante 1 hora, se añadió la sonda marcada con HRP, y la hibridación (42°C) se llevó a cabo durante 4 horas. La sonda se retiró mediante lavado con 0,5 x SSC suplementado con urea 6 M y 0,4% de SDS dos veces, y con 2 x SSC dos veces.

La membrana de nylon después de lavar la sonda se sumergió en una solución de detección durante 1 minuto, y se expuso a Hyperfilm ECL (el mismo fabricante) para obtener un clon positivo. El ADN se preparó a partir del clon positivo según el procedimiento de Maniatis et al. (J. Sambrook, E. F. Fritsch y T. Maniatis, "Molecular Cloning", Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989) usando LE392 como Escherichia coli anfitrión. LE392 se cultivó en un medio LB-MM (1% de peptona, 0,5% de extracto de levadura, 0,5% cloruro de sodio, 10 mmol/l de sulfato de magnesio y 0,2% de maltosa) durante la noche. LE392 se infectó con una solución de fago derivada de la placa individual, y se cultivó durante la noche en el medio LB-MM. Se añadieron cloruro de sodio y cloroformo al cultivo a concentraciones finales de 1 M y 0,8%, respectivamente, para promover la lisis de Escherichia coli. El cultivo se centrifugó para eliminar el residuo bacteriano, y las partículas de fago se recogieron de un precipitado generado por 10% de PEG 6000. Las partículas de fago se digirieron con proteinasa K en presencia de SDS, y se sometieron a tratamiento con fenol, seguido de precipitación con etanol para recoger el ADN del fago.

El ADN obtenido se analizó mediante transferencia Southern usando un sistema directo ECL. Como resultado de la hibridación usando el fragmento amplificado mediante PCR del Ejemplo 3-2 como sonda, un fragmento XbaI de 2,9 kpb mostró patrones de hibridación comunes al ADN cromosómico. Este fragmento XbaI se clonó en pUC118 para obtener el plásmido pUC-ACC6, y se secuenció la secuencia de nucleótidos del plásmido.

5 (3-4) Clonación de longitud completa del gen ACC6

Se prepararon los siguientes cebadores en base a la secuencia de nucleótidos obtenida a partir de pUC-ACC6, y la PCR se llevó a cabo usando ADN genómico como plantilla para amplificar el gen ACC6.

pACC6-F: CTCTGCATTGAATCCCGAGA (SEC ID N°: 37)

pACC6-R: GCAACGCTAAAGTGCTCATC (SEC ID N°: 38)

10 El ADN amplificado se insertó en un vector plasmídico pCR2.1-TOPO usando un kit de clonación TOPO TA (Invitrogen) para obtener el plásmido pACC6. Escherichia coli TOP10 (Invitrogen) se transformó con el plásmido pACC6 obtenido para obtener Escherichia coli TOP10/pACC6.

(3-5) Preparación de ADNc y análisis de intrón del gen ACC6

15 El ADNc de Acremonium cellulolyticus ACCP-5-1 se preparó según el procedimiento descrito en el Ejemplo 1-4. Los siguientes cebadores que contenían el codón de iniciación y el codón de parada se prepararon en base a la secuencia del gen ACC6, y la PCR se llevó a cabo usando el ADNc como plantilla para amplificar el gen ACC6 ADNc.

ACC6-N: ATGACAATCATCTCAAAATTCGGT (SEC ID N°: 39)

ACC6-C: TCAGGATTTCCACTTTGGAACGAA (SEC ID N°: 40)

20 La secuencia de nucleótidos del gen ACC6 ADNc se secuenció y se comparó con el gen pACC6 para determinar la ubicación de los intrones.

(3-6) Deducción de la secuencia de aminoácidos de ACC6

25 El gen de endoglucanasa ACC6 aislado a partir de Acremonium cellulolyticus mediante el procedimiento descrito anteriormente consistía en 1430 pb con nucleótidos correspondiente a los nucleótidos 169-1598 de la SEC ID N°: 5. Se encontró que el gen ACC6 contenía tres intrones en las posiciones 254-309, 406-461 y 1372-1450 de la SEC ID N°: 5. La secuencia de aminoácidos de ACC6 deducida a partir del marco abierto de lectura (ORF) era la de SEC ID N°: 6. Se supuso, usando un software de predicción de secuencia de señal SignalP 3.0, que la secuencia de aminoácidos en la posición -21 a -1 de ACC6 era una secuencia de señal.

«Ejemplo 4: Clonación del gen ACC7»

(4-1) Aislamiento de ADN genómico y preparación de la biblioteca genómica

30 Se preparó una biblioteca de ADN genómico de Acremonium cellulolyticus ACCP-5-1 según el procedimiento descrito en el Ejemplo 3-1.

(4-2) Clonación del fragmento del gen ACC7

Se prepararon los siguientes cebadores en base a las secuencias de endoglucanasas conocidas clasificadas en la familia Glucósido Hidrolasa 5.

35 ACC7-F: CACGCCATGATCGACCCNCAYAAAYTAYG (SEC ID N°: 41)

ACC7-R: ACCAGGGGCCGCGCNGYCCACCA (SEC ID N°: 42)

40 Se llevó a cabo una PCR usando ACC7-F y ACC7-R como cebadores y el ADN genómico como plantilla, y usando LA Taq polimerasa (Takara Bio). La PCR se llevó a cabo repitiendo 40 veces un ciclo que consiste en una reacción a 94°C durante 30 segundos, hibridación durante 30 segundos, y una reacción a 72°C durante 1 minuto. La temperatura de hibridación se redujo escalonadamente desde 63°C a 53°C en los primeros 20 ciclos, y se mantuvo a 53°C en los siguientes 20 ciclos. El fragmento de ADN amplificado de 670 pb se insertó en un vector plasmídico pCR2.1-TOPO usando un kit de clonación TOPO TA (Invitrogen) según un protocolo asociado al kit para obtener el plásmido TOPO-pACC7-parcial.

45 El fragmento de ADN insertado clonado en el plásmido TOPO-pACC7-parcial se secuenció, y la secuencia de nucleótidos obtenida se tradujo en la secuencia de aminoácidos, y se realizó una búsqueda de homología usando la secuencia de

5 aminoácidos. La secuencia mostró una identidad del 63% con la secuencia de endoglucanasa (Q4WM09) derivada de Aspergillus fumigatus y, de esta manera, se consideró que el fragmento de ADN era parte de un gen de endoglucanasa (familia Glucósido Hidrolasa 5). Este fragmento de ADN se amplificó mediante PCR usando el plásmido TOPO-pACC7-parcial como una plantilla en una manera similar, y el producto de PCR obtenido se marcó usando un sistema directo ECL (Amersham Pharmacia Biotech) para obtener una sonda.

(4-3) Cribado mediante hibridación de placas

10 La biblioteca de ADN genómico se cribó según el procedimiento descrito en el Ejemplo 3-3 para obtener un clon positivo. El clon positivo obtenido se analizó mediante transferencia Southern, y un fragmento XbaI de 3,7 kpb mostró patrones de hibridación comunes al ADN cromosómico. Este fragmento XbaI se clonó en pUC118 para obtener el plásmido pUC-ACC7, y se secuenció la secuencia de nucleótidos del plásmido.

(4-4) Clonación de longitud completa del gen ACC7

Se prepararon los siguientes cebadores en base a la secuencia de nucleótidos obtenida a partir de pUC-ACC7, y la PCR se llevó a cabo usando ADN genómico como plantilla para amplificar el gen ACC7.

pACC7-F: CAGTCAGTTGTGTAGACACG (SEC ID N°: 43)

15 pACC7-R: ACTCAGCTGGGTCTTCATAG (SEC ID N°: 44)

El ADN amplificado se insertó en un vector plasmídico pCR2.1-TOPO usando un kit de clonación TOPO TA (Invitrogen) para obtener el plásmido pACC7. Escherichia coli TOP10 (Invitrogen) se transformó con el plásmido pACC7 obtenido para obtener Escherichia coli TOP10/pACC7.

(4-5) Preparación de ADNc y análisis de intrón del gen ACC7

20 El ADNc de Acremonium cellulolyticus ACCP-5-1 se preparó según el procedimiento descrito en el Ejemplo 1-4. Los siguientes cebadores que contenían el codón de iniciación y el codón de parada se prepararon en base a la secuencia del gen ACC7, y la PCR se llevó a cabo usando el ADNc como plantilla para amplificar el gen ACC7 ADNc.

ACC7-N: ATGAGGTCTACATCAACATTTGTA (SEC ID N°: 45)

ACC7-C: CTAAGGGGTGTAGGCCTGCAGGAT (SEC ID N°: 46)

25 La secuencia de nucleótidos del gen ACC7 ADNc se secuenció, y se comparó con el gen pACC7 para determinar la ubicación de los intrones.

(4-6) Deducción de la secuencia de aminoácidos de ACC7

30 El gen de endoglucanasa ACC7 aislado a partir de Acremonium cellulolyticus mediante el procedimiento descrito anteriormente consistía en 1307 pb con nucleótidos correspondientes a los nucleótidos 70-1376 de la SEC ID N°: 7. Se encontró que el gen ACC7 contenía dos intrones en las posiciones 451-500 y 765-830 de la SEC ID N°: 7. La secuencia de aminoácidos de ACC7 deducida a partir del marco abierto de lectura (ORF) era la de SEC ID N°: 8. Se supuso, usando un software de predicción de secuencia de señal SignalP 3.0, que la secuencia de aminoácidos en la posición -20 a -1 de ACC7 era una secuencia de señal.

«Ejemplo 5: Clonación del gen ACC8»

35 (5-1) Aislamiento de ADN genómico y preparación de la biblioteca genómica

Se preparó una biblioteca de ADN genómico de Acremonium cellulolyticus ACCP-5-1 según el procedimiento descrito en el Ejemplo 3-1.

(5-2) Clonación del fragmento del gen ACC8

40 Se prepararon los siguientes cebadores en base a las secuencias de ADN correspondientes a las secuencias de aminoácidos N-terminal y C-terminal de endoglucanasa III derivadas a partir de Penicillium verrucosum.

MSW-N: CAACAGAGTCTATGCGCTCAATACTCGAGCTACACCACT (SEC ID N°: 47)

MSW-C: CTAATTGACAGCTGCAGACCAA (SEC ID N°: 48)

45 Se llevó a cabo una PCR usando MSW-N y MSW-C como cebadores y el ADN genómico como plantilla, y usando LA Taq polimerasa (Takara Bio). La PCR se llevó a cabo repitiendo 40 veces un ciclo que consiste en una reacción a 94°C durante 30 segundos, hibridación durante 30 segundos, y una reacción a 72°C durante 1 minuto. La temperatura de

hibridación se redujo escalonadamente desde 63°C a 53°C en los primeros 20 ciclos, y se mantuvo a 53°C en los siguientes 20 ciclos. El fragmento de ADN amplificado de 800 pb se insertó en un vector plasmídico pCR2.1-TOPO usando un kit de clonación TOPO TA (Invitrogen) según un protocolo asociado al kit para obtener el plásmido TOPO-pACC8-parcial.

- 5 El fragmento de ADN insertado clonado en el plásmido TOPO-pACC8-parcial se secuenció, y la secuencia de nucleótidos obtenida se tradujo en la secuencia de aminoácidos, y se realizó una búsqueda de homología usando la secuencia de aminoácidos. La secuencia mostró un 60% de identidad con la de endoglucanasa Cell2A (Q8NJV4) derivada de Trichoderma viride y, de esta manera, se consideró que el fragmento de ADN era parte de un gen de endoglucanasa (familia Glucósido Hidrolasa 12). Este fragmento de ADN se amplificó mediante PCR usando el plásmido TOPO-pACC8-parcial como una plantilla de una manera similar, y el producto de PCR obtenido se marcó usando un sistema directo ECL (Amersham Pharmacia Biotech) para obtener una sonda.

(5-3) Cribado mediante hibridación de placas

- 15 La biblioteca de ADN genómico se cribó según el procedimiento descrito en el Ejemplo 3-3 para obtener un clon positivo. El clon positivo obtenido se analizó mediante transferencia Southern, y un fragmento Sall de aproximadamente 5 kpb mostró patrones de hibridación comunes al ADN cromosómico. Este fragmento Sall se clonó en pUC118 para obtener el plásmido pUC-ACC8, y se secuenció la secuencia de nucleótidos del plásmido.

(5-4) Clonación de longitud completa del gen ACC8

Se prepararon los siguientes cebadores en base a la secuencia de nucleótidos obtenida a partir de pUC-ACC8, y la PCR se llevó a cabo usando ADN genómico como plantilla para amplificar el gen ACC8.

- 20 pACC8-F: AAAGACCGCGTGTTAGGATC (SEC ID N°: 49)

pACC8-R: CGCGTAGGAAATAAGACACC (SEC ID N°: 50)

El ADN amplificado se insertó en un vector plasmídico pCR2.1-TOPO usando un kit de clonación TOPO TA (Invitrogen) para obtener el plásmido pACC8. Escherichia coli TOP10 (Invitrogen) se transformó con el plásmido pACC8 obtenido para obtener Escherichia coli TOP10/pACC8.

- 25 (5-5) Preparación de ADNc y análisis de intrón del gen ACC8

El ADNc de Acremonium cellulolyticus ACCP-5-1 se preparó según el procedimiento descrito en el Ejemplo 1-4. Los siguientes cebadores que contenían el codón de iniciación y el codón de parada se prepararon en base a la secuencia del gen ACC8, y la PCR se llevó a cabo usando el ADNc como plantilla para amplificar el gen ACC8 ADNc.

ACC8-N: ATGAAGCTAACTTTTCTCCTGAAC (SEC ID N°: 51)

- 30 ACC8-C: CTAATTGACAGATGCAGACCAATG (SEC ID N°: 52)

La secuencia de nucleótidos del gen ACC8 ADNc se secuenció, y se comparó con el gen pACC8 para determinar la ubicación de los intrones.

(5-6) Deducción de la secuencia de aminoácidos de ACC8

- 35 El gen de endoglucanasa ACC8 aislado a partir de Acremonium cellulolyticus mediante el procedimiento descrito anteriormente consistía de 834 pb con nucleótidos correspondientes a los nucleótidos 141-974 de la SEC ID N°: 9. Se encontró que el gen ACC8 contenía dos intrones en las posiciones 551-609 y 831-894 de la SEC ID N°: 9. La secuencia de aminoácidos de ACC8 deducida a partir del marco abierto de lectura (ORF) era la de la SEC ID N°: 10. Se supuso, usando un software de predicción de secuencia de señal SignalP 3.0, que la secuencia de aminoácidos en la posición -15 a -1 de ACC8 era una secuencia de señal.

- 40 << **Ejemplo 6: Clonación del gen ACC9** >>

(6-1) Aislamiento del ADN genómico y del ARNm y preparación del ADNc

El ADN genómico de Acremonium cellulolyticus ACCP-5-1 se aisló según el procedimiento descrito en el Ejemplo 1-1. El ADNc de Acremonium cellulolyticus ACCP-5-1 se preparó según el procedimiento descrito en el Ejemplo 1-4.

(6-2) Clonación del fragmento de gen ACC9

- 45 Se prepararon los siguientes cebadores en base a las secuencias de endoglucanasas conocidas clasificadas en la familia Glucósido Hidrolasa 45.

ACC9-F: CCGGCTGCGGCAARTGYTAYMA (SEC ID N°: 53)

ACC9-R: AGTACCACTGGTTCTGCACCTTRCANGTNSC (SEC ID N°: 54)

5 Se llevó a cabo una PCR usando ACC9-F y ACC9-R como cebadores y genómico como plantilla, y usando LA Taq polimerasa (Takara Bio). La PCR se llevó a cabo repitiendo 40 veces un ciclo que consiste en una reacción a 94°C durante 30 segundos, hibridación durante 30 segundos, y una reacción a 72°C durante 1 minuto. La temperatura de hibridación se redujo escalonadamente desde 63°C a 53°C en los primeros 20 ciclos, y se mantuvo a 53°C en los siguientes 20 ciclos. El fragmento de ADN amplificado de 800 pb se insertó en un vector plasmídico pCR2.1-TOPO usando un kit de clonación TOPO TA (Invitrogen) según un protocolo asociado al kit para obtener el plásmido TOPO-pACC9-parcial.

10 El fragmento de ADN insertado clonado en el plásmido TOPO-pACC9-parcial se secuenció, y la secuencia de nucleótidos obtenida se tradujo en la secuencia de aminoácidos, y se realizó una búsqueda de homología usando la secuencia de aminoácidos. La secuencia mostró una identidad del 79% con la de secuencia de endoglucanasa EGV (Q7Z7X0) derivada de Trichoderma viride y, de esta manera, se consideró que el fragmento de ADN era parte de un gen de endoglucanasa (familia Glucósido Hidrolasa 45).

15 (6-3) Clonación de longitud completa del gen ACC9 mediante PCR inversa

Según el procedimiento descrito en el Ejemplo 1-3, se realizó la PCR usando ADN circular (obtenido mediante digestión con Sall o Xbal) como plantilla y las siguientes secuencias contenidas en el fragmento del gen ACC9 como cebadores para obtener la región aguas arriba de 5' y la región aguas abajo de 3' del gen ACC9.

ACC9-inv-F: CGAAGTGTTTTGGTGACAACG (SEC ID N°: 55)

20 ACC9-inv-R: GTGGTAGCTGTATCCGTAGT (SEC ID N°: 56)

La región aguas arriba de 5' y la región aguas abajo de 3' se secuenciaron para determinar la secuencia de nucleótidos completa del gen ACC9.

Se prepararon los siguientes cebadores en base a la secuencia de nucleótidos obtenida mediante PCR inversa y se llevó a cabo una PCR usando ADN genómico como plantilla para amplificar el gen ACC9.

25 pACC9-F: TACATTCCGAAGGCACAGTT (SEC ID N°: 57)

pACC9-R: CTGAGCTGATTATCCTGACC (SEC ID N°: 58)

El ADN amplificado se insertó en un vector plasmídico pCR2.1-TOPO usando un kit de clonación TOPO TA (Invitrogen) para obtener el plásmido pACC9. Escherichia coli TOP10 (Invitrogen) se transformó con el plásmido obtenido pACC9 para obtener Escherichia coli TOP10/pACC9.

30 (6-4) Análisis de intrones del gen ACC9

Los siguientes cebadores que contenían el codón de iniciación y el codón de parada se prepararon en base a la secuencia del gen ACC9, y se llevó a cabo una PCR usando ADNc como plantilla para amplificar el gen ACC9 ADNc.

ACC9-N: ATGAAGGCTTTCTATCTTTCTCTC (SEC ID N°: 59)

ACC9-C: TTAGGACGAGCTGACGCACTGGTA (SEC ID N°: 60)

35 La secuencia de nucleótidos del gen ACC9 ADNc se secuenció, y se comparó con el gen pACC9 para determinar la ubicación de los intrones.

(6-5) Deducción de la secuencia de aminoácidos de ACC9

40 El gen de endoglucanasa ACC9 aislado a partir de Acremonium cellulolyticus mediante el procedimiento descrito anteriormente consistía en 1117 pb con nucleótidos correspondientes a los nucleótidos 114-1230 de la SEC ID N°: 11. Se encontró que el gen ACC9 contenía dos intrones en las posiciones 183-232 y 299-357 de la SEC ID N°: 11. La secuencia de aminoácidos de ACC9 deducida a partir del marco abierto de lectura (ORF) era la de SEC ID N°: 12. Se supuso, usando un software de predicción de secuencia de señal SignalP 3.0, que la secuencia de aminoácidos en la posición -16 a -1 de ACC5 era una secuencia de señal.

«Ejemplo 7: Clonación del gen ACC10»

45 (7-1) Aislamiento del ADN genómico y del ARNm y preparación del ADNc

El ADN genómico de *Acremonium cellulolyticus* ACCP-5-1 se aisló según el procedimiento descrito en el Ejemplo 1-1. El ADNc del *Acremonium cellulolyticus* ACCP-5-1 se preparó según el procedimiento descrito en el Ejemplo 1-4.

(7-2) Clonación del fragmento del gen ACC10

5 Se prepararon los siguientes cebadores en base a las secuencias de endoglucanasas conocidas clasificadas en la familia Glucósido Hidrolasa 61 y la secuencia de nucleótidos poli A.

ACC10-F: GGTGTACGTGGGCACCAAYGGNMGNGG (SEC ID N°: 61)

ACC10-R: AATTCGCGGCCGCTAAAAA (SEC ID N°: 62)

10 Se llevó a cabo una PCR usando ACC10-F y ACC10-R como cebadores y ADNc como plantilla, y usando LA Taq polimerasa (Takara Bio). La PCR se llevó a cabo repitiendo 40 veces un ciclo que consiste en una reacción a 94°C durante 30 segundos, hibridación durante 30 segundos, y una reacción a 72°C durante 1 minuto. La temperatura de hibridación se redujo escalonadamente desde 63°C a 53°C en los primeros 20 ciclos, y se mantuvo a 53°C en los siguientes 20 ciclos. El fragmento de ADN amplificado de 300 pb se insertó en un vector plasmídico pCR2.1-TOPO usando un kit de clonación TOPO TA (Invitrogen) según un protocolo asociado al kit para obtener el plásmido TOPO-pACC10-parcial.

15 El fragmento de ADN insertado clonado en el plásmido TOPO-pACC10-parcial se secuenció, y la secuencia de nucleótidos obtenida se tradujo en la secuencia de aminoácidos, y se realizó una búsqueda de homología usando la secuencia de aminoácidos. La secuencia mostró una identidad del 65% con la de la secuencia de endoglucanasa EGIV (Q0D0T6) derivada de *Aspergillus terreus* y, de esta manera, se consideró que el fragmento de ADN era parte de un gen de endoglucanasa (familia Glucósido Hidrolasa 61).

20 (7-3) Clonación de longitud completa del gen ACC10 mediante PCR inversa

Según el procedimiento descrito en el Ejemplo 1-3, la PCR se realizó usando ADN circular (obtenido mediante digestión con HindIII) como plantilla y las siguientes secuencias contenidas en el fragmento del gen ACC10 como cebadores para obtener la región aguas arriba de 5' y la región aguas abajo de 3' del gen ACC5.

ACC10-inv-F: TTCTGCTACTGCGGTTGCTA (SEC ID N°: 63)

25 ACC10-inv-R: GAATAACGTAGGTCGACAAG (SEC ID N°: 64)

La región aguas arriba de 5' y la región aguas abajo de 3' se secuenciaron para determinar la secuencia de nucleótidos completa del gen ACC10.

Se prepararon los siguientes cebadores en base a la secuencia de nucleótidos obtenida mediante PCR inversa y se llevó a cabo una PCR usando ADN genómico como plantilla para amplificar el gen ACC10.

30 pACC10-F: CGTTGACCGAAAGCCACTT (SEC ID N°: 65)

pACC10-R: TGGCCTAAAGCTAAATGATG (SEC ID N°: 66)

El ADN amplificado se insertó en un vector plasmídico pCR2.1-TOPO usando un kit de clonación TOPO TA (Invitrogen) para obtener el plásmido pACC10. *Escherichia coli* TOP10 (Invitrogen) se transformó con el plásmido pACC9 obtenido para obtener *Escherichia coli* TOP10/pACC10.

35 (7-4) Análisis de intrones del gen ACC10

Los siguientes cebadores que contenían el codón de iniciación y el codón de parada se prepararon en base a la secuencia del gen ACC10, y se llevó a cabo una PCR usando ADNc como plantilla para amplificar el gen ACC10 ADNc.

ACC10-N: ATGCCTTCTACTAAAGTGCCTGCCC (SEC ID N°: 67)

ACC10-C: TTAAAGGACAGTAGTGGTGATGACG (SEC ID N°: 68)

40 La secuencia de nucleótidos del gen ACC10 ADNc se secuenció, y se comparó con el gen pACC10 para determinar la ubicación de los intrones.

(7-5) Deducción de la secuencia de aminoácidos de ACC10

45 El gen de endoglucanasa ACC10 aislado a partir de *Acremonium cellulolyticus* mediante el procedimiento descrito anteriormente consistía en 1020 pb con nucleótidos correspondientes a los nucleótidos 124-1143 de la SEC ID N°: 13. Se encontró que el gen ACC10 contenía un intrón en la posición 225-275 de la SEC ID N°: 13. La secuencia de aminoácidos

de ACC10 deducida a partir del marco abierto de lectura (ORF) era la de SEC ID N°: 14. Se supuso, usando un software de predicción de secuencia de señal SignalP 3.0, que la secuencia de aminoácidos en la posición -21 a -1 de ACC10 era una secuencia de señal.

«Ejemplo 8: Clonación del gen BGLC»

5 (8-1) Preparación de ADN genómico y el ADNc

El ADN genómico de Acremonium cellulolyticus ACCP-5-1 se aisló según el procedimiento descrito en el Ejemplo 1-1. El ADNc del Acremonium cellulolyticus ACCP-5-1 se preparó según el procedimiento descrito en el Ejemplo 1-4.

(8-2) Clonación del fragmento del gen BGLC

10 Se prepararon los siguientes cebadores en base a las secuencias de β-glucosidasas conocidas clasificadas en la familia Glucósido Hidrolasa 1.

BGLC-F: CCTGGGTGACCCTGTACCAAYTGGGAYYT (SEC ID N°: 69)

BGLC-R: TGGGCAGGAGCAGCCRWWYTCNGT (SEC ID N°: 70)

15 Se llevó a cabo una PCR usando BGLC-F y BGLC-R como cebadores y el ADN genómico como plantilla, y usando LA Taq polimerasa (Takara Bio). La PCR se llevó a cabo repitiendo 40 veces un ciclo que consiste en una reacción a 94°C durante 30 segundos, hibridación durante 30 segundos, y una reacción a 72°C durante 1 minuto. La temperatura de hibridación se redujo escalonadamente desde 63°C a 53°C en los primeros 20 ciclos, y se mantuvo a 53°C en los siguientes 20 ciclos. El fragmento de ADN amplificado de 1,2 kpb se insertó en un vector plasmídico pCR2.1-TOPO usando un kit de clonación TOPO TA (Invitrogen) según un protocolo asociado al kit para obtener el plásmido TOPO-pBGLC-parcial.

20 El fragmento de ADN insertado clonado en el plásmido TOPO-pBGLC-parcial se secuenció, y la secuencia de nucleótidos obtenida se tradujo en la secuencia de aminoácidos, y se realizó una búsqueda de homología usando la secuencia de aminoácidos. La secuencia mostró una identidad del 69% con la de β-glucosidasa 1 (Q4WRG4) derivada de Aspergillus fumigatus y, de esta manera, se consideró que el fragmento de ADN era parte de un gen de β-glucosidasa (familia Glucósido Hidrolasa 1).

25 (8-3) Clonación de longitud completa del gen BGLC mediante PCR inversa

Según el procedimiento descrito en el Ejemplo 1-3, la PCR se llevó a cabo usando ADN circular (obtenido mediante digestión con XbaI) como plantilla y las siguientes secuencias contenidas en el fragmento del gen BGLC como cebadores para obtener la región aguas arriba de 5' y la región aguas abajo de 3' del gen BGLC.

BGLC-inv-F: GGAGTTCTTCTACATTTCCC (SEC ID N°: 71)

30 BGLC-inv-R: AACAAAGGACGGCGTGTCAGT (SEC ID N°: 72)

La región aguas arriba de 5' y la región aguas abajo de 3' se secuenciaron para determinar la secuencia de nucleótidos completa del gen de BGLC.

Se prepararon los siguientes cebadores en base a la secuencia de nucleótidos obtenida mediante PCR inversa y se llevó a cabo una PCR usando ADN genómico como plantilla para amplificar el gen BGLC.

35 pBGLC-F: CTCCGTCAAGTGCGAAGTAT (SEC ID N°: 73)

pBGLC-R: GGCTCGCTAATACTAACTGC (SEC ID N°: 74)

El ADN amplificado se insertó en un vector plasmídico pCR2.1-TOPO usando un kit de clonación TOPO TA (Invitrogen) para obtener el plásmido pBGLC. Escherichia coli TOP10 (Invitrogen) se transformó con el plásmido pBGLC obtenido para obtener Escherichia coli TOP10/pBGLC.

40 (8-4) Análisis de intrones del gen BGLC

Los siguientes cebadores que contenían el codón de iniciación y el codón de parada se prepararon en base a la secuencia del gen BGLC, y se llevó a cabo una PCR usando ADNc como plantilla para amplificar el gen BGLC ADNc.

BGLC-N: ATGGGCTCTACATCTCCTGCCCAA (SEC ID N°: 75)

BGLC-C: CTAGTTCCTCGGCTCTATGTATTT (SEC ID N°: 76)

La secuencia de nucleótidos del gen BGLC ADNc se secuenció, y se comparó con el gen pBGLC para determinar la ubicación de los intrones.

(8-5) Deducción de la secuencia de aminoácidos de BGLC

5 El gen de β -glucosidasa BGLC aislado a partir de *Acremonium cellulolyticus* mediante el procedimiento descrito anteriormente consistía en 1650 pb con nucleótidos correspondientes a los nucleótidos 238-1887 de la SEC ID N°: 15. Se encontró que el gen BGLC contenía tres intrones en las posiciones 784-850, 1138-1205, y 1703-1756 de la SEC ID N°: 15. La secuencia de aminoácidos de BGLC deducida a partir del marco abierto de lectura (ORF) era la de la SEC ID N°: 16. Se supuso, usando un software de predicción de secuencia de señal SignalP 3.0, que la secuencia de aminoácidos en la posición -28 a -1 de BGLC era una secuencia de señal.

10 << Ejemplo 9: Clonación del gen BGLD >>

(9-1) Preparación del ADN genómico y el ADNc

El ADN genómico de *Acremonium cellulolyticus* ACCP-5-1 se aisló según el procedimiento descrito en el Ejemplo 1-1. El ADNc de *Acremonium cellulolyticus* ACCP-5-1 se preparó según el procedimiento descrito en el Ejemplo 1-4.

(9-2) Clonación del fragmento del gen BGLD

15 Se prepararon los siguientes cebadores en base a las secuencias de β -glucosidasas conocidas clasificadas en la familia Glucósido Hidrolasa 1.

BGLD-F: CACCGCCGCTACCARRTNGARGG (SEC ID N°: 77)

BGLD-R: TGGCGGTGTAGTGGTTCATGSCRWARWARTC (SEC ID N°: 78)

20 Se llevó a cabo una PCR usando BGLD-F y BGLD-R como cebadores y el ADN genómico como plantilla, y usando LA Taq polimerasa (Takara Bio). La PCR se llevó a cabo repitiendo 40 veces un ciclo que consiste en una reacción a 94°C durante 30 segundos, hibridación durante 30 segundos, y una reacción a 72°C durante 1 minuto. La temperatura de hibridación se redujo escalonadamente desde 63°C a 53°C en los primeros 20 ciclos, y se mantuvo a 53°C en los siguientes 20 ciclos. El fragmento de ADN amplificado de 1 kpb se insertó en un vector plasmídico pCR2.1-TOPO usando un kit de clonación TOPO TA (Invitrogen) según un protocolo asociado al kit para obtener el plásmido TOPO-pBGLD-parcial.

25 El fragmento de ADN insertado clonado en el plásmido TOPO-pBGLD-parcial se secuenció, y la secuencia de nucleótidos obtenida se tradujo en la secuencia de aminoácidos, y se realizó una búsqueda de homología usando la secuencia de aminoácidos. La secuencia mostró una identidad del 76% con la de β -glucosidasa 1 (Q8X214) derivada de *Talaromyces emersonii* y, de esta manera, se consideró que el fragmento de ADN era parte de un gen de β -glucosidasa (familia Glucósido Hidrolasa 1).

30 (9-3) Clonación de longitud completa del gen BGLC mediante PCR inversa

Según el procedimiento descrito en el Ejemplo 1-3, la PCR se llevó a cabo usando ADN circular (obtenido mediante digestión con *Xho*I) como plantilla y las siguientes secuencias contenidas en el fragmento de gen BGLD como cebadores para obtener la región aguas arriba de 5' y la región aguas abajo de 3' del gen BGLD.

35 BGLD-inv-F: CGGTTTCAATATCGGTAAGC (SEC ID N°: 79)

BGLD-inv-R: GTGTCCAAAGCTCTGGAATG (SEC ID N°: 80)

La región aguas arriba de 5' y la región aguas abajo de 3' se secuenciaron para determinar la secuencia de nucleótidos completa del gen BGLD.

40 Se prepararon los siguientes cebadores en base a la secuencia de nucleótidos obtenida mediante PCR inversa y se llevó a cabo una PCR usando ADN genómico como plantilla para amplificar el gen BGLD.

pBGLD-F: TTCTCTCACTTTCCCTTTCC (SEC ID N°: 81)

pBGLD-R: AATTGATGCTCCTGATGCGG (SEC ID N°: 82)

45 El ADN amplificado se insertó en un vector plasmídico pCR2.1-TOPO usando un kit de clonación TOPO TA (Invitrogen) para obtener el plásmido pBGLD. *Escherichia coli* TOP10 (Invitrogen) se transformó con el plásmido pBGLD obtenido para obtener *Escherichia coli* TOP10/pBGLD.

(9-4) Análisis de intrones del gen BGLD

Los siguientes cebadores que contenían el codón de iniciación y el codón de parada se prepararon en base a la secuencia del gen BGLD, y se llevó a cabo una PCR usando ADNc como plantilla para amplificar el gen BGLD ADNc.

BGLD-N: ATGGGTAGCGTAACTAGTACCAAC (SEC ID N°: 83)

5 BGLD-C: CTA CTCTTCGAGATGTATTTGTT (SEC ID N°: 84)

La secuencia de nucleótidos del gen BGLD ADNc se secuenció, y se comparó con el gen pBGLD para determinar la ubicación de los intrones.

(9-5) Deducción de la secuencia de aminoácidos de BGLD

10 El gen de β -glucosidasa BGLD aislado a partir de Acremonium cellulolyticus mediante el procedimiento descrito anteriormente consistía en 1700 pb con nucleótidos correspondientes a los nucleótidos 66-1765 de la SEC ID N°: 17. Se encontró que el gen BGLD contenía cuatro intrones en las posiciones 149-211, 404-460, 934-988 y 1575-1626 de la SEC ID N°: 17. La secuencia de aminoácidos de BGLD deducida a partir del marco abierto de lectura (ORF) era la de la SEC ID N°: 18. Se supuso, usando un software de predicción de secuencia de señal SignalP 3.0, que la secuencia de aminoácidos en la posición -33 a -1 de BGLD era una secuencia de señal.

15 **Aplicabilidad industrial**

La proteína de la presente invención puede ser usada como una preparación de celulasa, y puede ser aplicada al uso de la digestión de un sustrato a base de celulosa.

Texto libre en listado de secuencias

20 Las secuencias de nucleótidos de las SEC ID N°: 19 a 84 en la lista de secuencias son secuencias de cebadores sintetizadas artificialmente. Las abreviaturas "N" en la SEC ID N°: 27 (posiciones 18 y 27), la SEC ID N°: 41 (posición 18), la SEC ID N°: 42 (posición 14), la SEC ID N°: 54 (posiciones 26 y 29), la SEC ID N°: 61 (posiciones 22 y 25), la SEC ID N°: 70 (posición 22) y la SEC ID N°: 77 (posición 19) representan un nucleótido arbitrario.

Listado de secuencias

<110> Meiji Seika Kaisha, Ltd.

25 <120> Nuevos genes de celulasa aislados

<130> MEJ-855

<160> 84

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

30 <211> 1644

<212> ADN

<213> Acremonium cellulolyticus

<220>

35 <221> sig_peptide

<222> (136)..(216)

<220>

<221> exón

40 <222> (136)..(232)

<220>

<221> CDS

<222> (136)..(232)

5

<220>

<221> mat_peptide

<222> join (217..232, 292..350, 426..578, 632..696, 755..852, 908..1434)

10

<220>

<221> Intrón

<222> (233)..(291)

<220>

15

<221> exón

<222> (292)..(350)

<220>

<221> CDS

20

<222> (292)..(350)

<220>

<221> Intrón

<222> (351)..(425)

25

<220>

<221> exón

<222> (426)..(578)

30

<220>

<221> CDS

<222> (426)..(578)

<220>

35

<221> Intrón

<222> (579)..(631)

<220>

<221> exón

5 <222> (632)..(696)

<220>

<221> CDS

<222> (632)..(696)

10

<220>

<221> Intrón

<222> (697)..(754)

15

<220>

<221> exón

<222> (755)..(852)

<220>

20

<221> CDS

<222> (755)..(852)

<220>

<221> Intrón

25

<222> (853)..(907)

<220>

<221> exón

<222> (908)..(1437)

30

<220>

<221> CDS

<222> (908)..(1437)

35

<400> 1

gaaggatggt agattgtccg gtggttggtc gatccaatat aaaagcatgg caggcgctgt 60
 taaaaccgtg actactctca agacagaccg tacatcagat tcatcggaaa atacaagctt 120
 gagaatctta tcacg atg aag acc agc atc att tct atc gtt ctg tct acg 171
 Met Lys Thr Ser Ile Ile Ser Ile Val Leu Ser Thr
 -25 -20

gca gga ctc act tta ggg gcc ccc tca aag gac acc aag aaa cgt gct 219
 Ala Gly Leu Thr Leu Gly Ala Pro Ser Lys Asp Thr Lys Lys Arg Ala
 -15 -10 -5 -1 1

tca agt ttc gaa t gtatgcatat ctagtaaata gattcaagag ttcaatgact 272
 Ser Ser Phe Glu
 5

gatatatgat gctcgtag gg ttc ggt tca aat gag tcc gga gca gaa ttt 323
 Trp Phe Gly Ser Asn Glu Ser Gly Ala Glu Phe
 10 15

gga agt ggg aat atc cca ggt gtg gag gtagcagac ttatatcgt 370
 Gly Ser Gly Asn Ile Pro Gly Val Glu
 20 25

tctatcaagc gtgacatcca ggggggaaat tcaacttaac cagatgaatg gctag ggc 428
 Gly

acc gac tac acc ttt ccc aat aca aca gcg att caa ata ctc atc gac 476
 Thr Asp Tyr Thr Phe Pro Asn Thr Thr Ala Ile Gln Ile Leu Ile Asp
 30 35 40

gcc ggt atg aac atc ttc cgc gtt cca ttc cta atg gag cga atg atc 524
 Ala Gly Met Asn Ile Phe Arg Val Pro Phe Leu Met Glu Arg Met Ile
 45 50 55

ccg act gag atg act gga tct ctt aat acg gct tat ttt gag ggg tac 572
 Pro Thr Glu Met Thr Gly Ser Leu Asn Thr Ala Tyr Phe Glu Gly Tyr
 60 65 70

agc gag gtacggaccc ttatcagtcc cttcaggagt gttttggtcc tgatcggata 628
 Ser Glu
 75

tag gtc att aac tac atc acc ggt caa gga gca cat gca gtg gtt gac 676
 Val Ile Asn Tyr Ile Thr Gly Gln Gly Ala His Ala Val Val Asp
 80 85 90

cct cac aac ttt gga cga ta gtaagagtcc tctcctgggt attttgaaag 726
 Pro His Asn Phe Gly Arg Tyr
 95

actttagaga tacttactct cggcctag t tat gga acc cct atc tca tca aca 779
 Tyr Gly Thr Pro Ile Ser Ser Thr
 100 105

tcc gac ttc cag act ttc tgg tcc acg ctt gcc tcc caa ttc aaa tca 827
 Ser Asp Phe Gln Thr Phe Trp Ser Thr Leu Ala Ser Gln Phe Lys Ser
 110 115 120

aat gac aag gtc att ttt gac aca a gtaagtatat atattttttt 872
 Asn Asp Lys Val Ile Phe Asp Thr
 125 130

tacatctcaa atataaacct cgctgacaca ctcag ac aac gaa tac cac gac 924
 Asn Asn Glu Tyr His Asp
 135

5

 atg gat gaa tcc gtc gtc gta gcc cta aac caa gca gca atc gac ggc 972
 Met Asp Glu Ser Val Val Val Ala Leu Asn Gln Ala Ala Ile Asp Gly
 140 145 150

atc cgc gat gcc ggg gcc aca aca caa tac atc ttc gtc gaa ggc aac 1020
 Ile Arg Asp Ala Gly Ala Thr Thr Gln Tyr Ile Phe Val Glu Gly Asn
 155 160 165

10

 tct tac act ggt gcc tgg aca tgg aca aca tac aac acg gcc atg gtg 1068
 Ser Tyr Thr Gly Ala Trp Thr Trp Thr Thr Tyr Asn Thr Ala Met Val
 170 175 180

aac ctc acc gat cca tct gat cta atc gtc tac gaa atg cat caa tac 1116
 Asn Leu Thr Asp Pro Ser Asp Leu Ile Val Tyr Glu Met His Gln Tyr
 185 190 195 200

15

 ctc gac tct gac ggg tct ggt aca tca gac caa tgc gtg agc agc aca 1164
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Gly Thr Ser Asp Gln Cys Val Ser Ser Thr
 205 210 215

atc ggc cag gaa cgt gtt gta gat gct aca act tgg ttg caa acc aac 1212
 Ile Gly Gln Glu Arg Val Val Asp Ala Thr Thr Trp Leu Gln Thr Asn
 220 225 230

gga aag cga ggc atc ctc ggc gaa ttc gcg ggt ggc gca aat agt gtt 1260
 Gly Lys Arg Gly Ile Leu Gly Glu Phe Ala Gly Gly Ala Asn Ser Val
 235 240 245

20

 tgc gaa gag gcc gtg gag ggg atg ctg aat tat ctg gag cag aat tcc 1308
 Cys Glu Glu Ala Val Glu Gly Met Leu Asn Tyr Leu Glu Gln Asn Ser
 250 255 260

gac gtc tgg ctc gga gcg agc tgg tgg agt gcg ggc cca tgg tgg ggt 1356
 Asp Val Trp Leu Gly Ala Ser Trp Trp Ser Ala Gly Pro Trp Trp Gly
 265 270 275 280

25

 gac tac att ttc tca atg gaa cca cct agt ggc act gcg tat gtg aat 1404
 Asp Tyr Ile Phe Ser Met Glu Pro Pro Ser Gly Thr Ala Tyr Val Asn
 285 290 295

tat ctg tgc att ctg gag agt tat ttc cca tga ttttgaggct attcgcaaat 1457
 Tyr Leu Ser Ile Leu Glu Ser Tyr Phe Pro
 300 305

atggtgatat agggcttggt agagactagt acaaaagtgg tatagtacgg tggagactat 1517

30

 ccgtaccttg ctatatcaac tagaatttct agctagaaaa ccagaaacgg ggagggcctt 1577

tcggtatttg ttctgtcaac tgggtcactc agtagcccaa aaaaccctgc gagaaatcct 1637

tctcgggt 1644

<210> 2

35 <211> 333

ES 2 608 402 T3

<212> PRT

<213> Acremonium cellulolyticus

<400> 2

5

```

Met Lys Thr Ser Ile Ile Ser Ile Val Leu Ser Thr Ala Gly Leu Thr
   -25                               -20                               -15

Leu Gly Ala Pro Ser Lys Asp Thr Lys Lys Arg Ala Ser Ser Phe Glu
   -10                               -5                               -1  1                               5

Trp Phe Gly Ser Asn Glu Ser Gly Ala Glu Phe Gly Ser Gly Asn Ile
                               10                               15                               20

Pro Gly Val Glu Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Pro Asn Thr Thr Ala Ile
                               25                               30                               35

Gln Ile Leu Ile Asp Ala Gly Met Asn Ile Phe Arg Val Pro Phe Leu
                               40                               45                               50

Met Glu Arg Met Ile Pro Thr Glu Met Thr Gly Ser Leu Asn Thr Ala
   55                               60                               65

Tyr Phe Glu Gly Tyr Ser Glu Val Ile Asn Tyr Ile Thr Gly Gln Gly
   70                               75                               80                               85

Ala His Ala Val Val Asp Pro His Asn Phe Gly Arg Tyr Tyr Gly Thr
                               90                               95                               100

Pro Ile Ser Ser Thr Ser Asp Phe Gln Thr Phe Trp Ser Thr Leu Ala
                               105                               110                               115

Ser Gln Phe Lys Ser Asn Asp Lys Val Ile Phe Asp Thr Asn Asn Glu
                               120                               125                               130

Tyr His Asp Met Asp Glu Ser Val Val Val Ala Leu Asn Gln Ala Ala
   135                               140                               145

Ile Asp Gly Ile Arg Asp Ala Gly Ala Thr Thr Gln Tyr Ile Phe Val
   150                               155                               160                               165

Glu Gly Asn Ser Tyr Thr Gly Ala Trp Thr Trp Thr Thr Tyr Asn Thr
                               170                               175                               180

Ala Met Val Asn Leu Thr Asp Pro Ser Asp Leu Ile Val Tyr Glu Met
                               185                               190                               195

His Gln Tyr Leu Asp Ser Asp Gly Ser Gly Thr Ser Asp Gln Cys Val
   200                               205                               210
    
```


ES 2 608 402 T3

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

<210> 3
 15 <211> 1839
 <212> ADN
 <213> Acremonium cellulolyticus

<220>
 20 <221> sig_peptide
 <222> (128)..(187)

<220>
 <221> exón
 25 <222> (128)..(1615)

<220>
 <221> CDS
 <222> (128)..(1615)

30 <220>
 <221> mat_peptide
 <222> (188)..(1612)

35 <400> 3

attgctccgc ataggttcaa gggatatataa acaggcttac tgtctaataa tctcaataac 60
 tgctcaaadc cattgtttgt ccttcttcgt acctgcggcg agattcaatt ttggactgat 120
 gtctaac atg gcg act aga cca ttg gct ttt gca gct att gct gct ctt 169
 Met Ala Thr Arg Pro Leu Ala Phe Ala Ala Ile Ala Ala Leu
 -20 -15 -10
 5 ttc cac cat gcc gcc tca cag cag gcc cct acc cca gat aat tta gct 217
 Phe His His Ala Ala Ser Gln Gln Ala Pro Thr Pro Asp Asn Leu Ala
 -5 -1 1 5 10
 tct cta ccg acc tgg aaa tgt aca act tcc ggc ggc tgt gtt caa cag 265
 Ser Leu Pro Thr Trp Lys Cys Thr Thr Ser Gly Gly Cys Val Gln Gln
 15 20 25
 10 tcg acc tct att gtc gtg gat tgg gtg tat cac tgg atc cac aca gtc 313
 Ser Thr Ser Ile Val Val Asp Trp Val Tyr His Trp Ile His Thr Val
 30 35 40
 aat ggg agc aca tcg tgc acc aca tct agc gga ttg gac cca act tta 361
 Asn Gly Ser Thr Ser Cys Thr Thr Ser Ser Gly Leu Asp Pro Thr Leu
 45 50 55
 15 tgt gga acg gaa gag gaa tgc tat aca aac tgt gaa atc tca cct gca 409
 Cys Gly Thr Glu Glu Glu Cys Tyr Thr Asn Cys Glu Ile Ser Pro Ala
 60 65 70
 acc tac gat ggc ctc ggt ata aaa act tct gga aac gct tta acc ctc 457
 Thr Tyr Asp Gly Leu Gly Ile Lys Thr Ser Gly Asn Ala Leu Thr Leu
 75 80 85 90
 20 aat caa tac gtc aca agc aat gga acg aca agt aac gcc tct ccg cgt 505
 Asn Gln Tyr Val Thr Ser Asn Gly Thr Thr Ser Asn Ala Ser Pro Arg
 95 100 105
 gta tat ctt ttg gat ccc gcc ggc aag aat tat gag atg ctg cag ctc 553
 Val Tyr Leu Leu Asp Pro Ala Gly Lys Asn Tyr Glu Met Leu Gln Leu
 110 115 120
 25 ctc ggt caa gag att agc ttt gac gta gat gcc tcc aat tta cca tgt 601
 Leu Gly Gln Glu Ile Ser Phe Asp Val Asp Ala Ser Asn Leu Pro Cys
 125 130 135
 ggc gaa aac ggg gct ctt tat ctc tct gag atg gat gcg act gga ggt 649
 Gly Glu Asn Gly Ala Leu Tyr Leu Ser Glu Met Asp Ala Thr Gly Gly
 140 145 150
 cga agc cag tac aac cct gcc gga gct tca tac ggt tcc ggt tac tgt 697
 Arg Ser Gln Tyr Asn Pro Ala Gly Ala Ser Tyr Gly Ser Gly Tyr Cys
 155 160 165 170
 30 gat gct cag tgt gga agt agc agc tgg ttt aat ggc tcg att aat agc 745
 Asp Ala Gln Cys Gly Ser Ser Ser Trp Phe Asn Gly Ser Ile Asn Ser
 175 180 185
 gct ggc ctc ggt tct tgc tgt aac gaa atg gat ctc tgg gaa gca aat 793
 Ala Gly Leu Gly Ser Cys Cys Asn Glu Met Asp Leu Trp Glu Ala Asn
 190 195 200
 35

ES 2 608 402 T3

	ggc gag gca act gct ttg aca cct cat cca tgc agt gtc gat ggt cct	841
	Gly Glu Ala Thr Ala Leu Thr Pro His Pro Cys Ser Val Asp Gly Pro	
	205 210 215	
	tat ggc tgc tct ggt agc gcc tgt ggt tgc act gga gtg tgt gac aag	889
	Tyr Gly Cys Ser Gly Ser Ala Cys Gly Ser Thr Gly Val Cys Asp Lys	
	220 225 230	
5	aat ggt tgc gga ttc aat cca tat gcc ctt gga aat cac agc tac tac	937
	Asn Gly Cys Gly Phe Asn Pro Tyr Ala Leu Gly Asn His Ser Tyr Tyr	
	235 240 245 250	
	ggc cca ggt ctt aca gtg gac aca agc aag ccc ttt aca gtt acg aca	985
	Gly Pro Gly Leu Thr Val Asp Thr Ser Lys Pro Phe Thr Val Thr Thr	
	255 260 265	
10	cag ttt gtg acc aac gat ggc acc aag acc ggc acc ctg acc gaa att	1033
	Gln Phe Val Thr Asn Asp Gly Thr Lys Thr Gly Thr Leu Thr Glu Ile	
	270 275 280	
	cgt cga tct tac act cag aat ggc aag gtt att gcg aat gcc gtt gca	1081
	Arg Arg Ser Tyr Thr Gln Asn Gly Lys Val Ile Ala Asn Ala Val Ala	
	285 290 295	
15	tcc tct tcg tcg ggg ttt tca ggt caa agt tct atc aca gag tcc ttc	1129
	Ser Ser Ser Ser Gly Phe Ser Gly Gln Ser Ser Ile Thr Glu Ser Phe	
	300 305 310	
	tgt act gcg atg gac tcc gaa gcc ggg aca ctg ggt ggt ctg act aca	1177
	Cys Thr Ala Met Asp Ser Glu Ala Gly Thr Leu Gly Gly Leu Thr Thr	
	315 320 325 330	
	atg ggt gag gcc ctt ggc cgt ggc atg gtt ctt atc ttc agc att tgg	1225
	Met Gly Glu Ala Leu Gly Arg Gly Met Val Leu Ile Phe Ser Ile Trp	
	335 340 345	
20	aat gat gca ggt gga tac atg aac tgg ctg gat agt ggt agc tca gcc	1273
	Asn Asp Ala Gly Gly Tyr Met Asn Trp Leu Asp Ser Gly Ser Ser Gly	
	350 355 360	
	cct tgc agt agt act gca gga att ccg tcc acc att cag gcg aat gac	1321
	Pro Cys Ser Ser Thr Ala Gly Ile Pro Ser Thr Ile Gln Ala Asn Asp	
	365 370 375	
25	ccc ggt act tcg gtt act ttc tca aac atc aag tgg ggt gat att gga	1369
	Pro Gly Thr Ser Val Thr Phe Ser Asn Ile Lys Trp Gly Asp Ile Gly	
	380 385 390	
	tct aca ggg tct ggc act gga gga agc agt tca tca tcg tcg tca act	1417
	Ser Thr Gly Ser Gly Thr Gly Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Thr	
	395 400 405 410	
	tcg acc tca cca aaa act acc agc acc aca aca aca tca gca acg acc	1465
	Ser Thr Ser Pro Lys Thr Thr Ser Thr Thr Thr Thr Ser Ala Thr Thr	
	415 420 425	
30	aaa aca tca gca acg aca act aca acc agc aca ggg gca act cag act	1513
	Lys Thr Ser Ala Thr Thr Thr Thr Thr Ser Thr Gly Ala Thr Gln Thr	
	430 435 440	
	cac tat ggt caa tgt gga ggc atg tat tat act ggt cct act gtt tgt	1561
	His Tyr Gly Gln Cys Gly Gly Met Tyr Tyr Thr Gly Pro Thr Val Cys	
	445 450 455	
35	gcc tct ccg tac acc tgt caa gta cag aat ccg tac tat tca cag tgc	1609

ES 2 608 402 T3

Ala Ser Pro Tyr Thr Cys Gln Val Gln Asn Pro Tyr Tyr Ser Gln Cys
460 465 470

ctt tag acgccgtgcc gacctatttg tatatatgcc aaattttcgt ggcttcacag 1665
Leu
475

5 cagaaatcat tcgatttact tcatttcttt tacatataaa ttgaaatat aaatttgact 1725

tgacaaagac gagcaaaaaa tttcctatat ttgctctaat cagctgttca atctatctga 1785

gagaaaaaga atagaagtag taacctcatt acgtctggag gcactaactc tgaa 1839

10 <210> 4

<211> 495

<212> PRT

<213> Acremonium cellulolyticus

15 <400> 4

ES 2 608 402 T3

Met Ala Thr Arg Pro Leu Ala Phe Ala Ala Ile Ala Ala Leu Phe His
 -20 -15 -10 -5

His Ala Ala Ser Gln Gln Ala Pro Thr Pro Asp Asn Leu Ala Ser Leu
 -1 1 5 10

5 Pro Thr Trp Lys Cys Thr Thr Ser Gly Gly Cys Val Gln Gln Ser Thr
 15 20 25

Ser Ile Val Val Asp Trp Val Tyr His Trp Ile His Thr Val Asn Gly
 30 35 40

10 Ser Thr Ser Cys Thr Thr Ser Ser Gly Leu Asp Pro Thr Leu Cys Gly
 45 50 55 60

Thr Glu Glu Glu Cys Tyr Thr Asn Cys Glu Ile Ser Pro Ala Thr Tyr
 65 70 75

15 Asp Gly Leu Gly Ile Lys Thr Ser Gly Asn Ala Leu Thr Leu Asn Gln
 80 85 90

Tyr Val Thr Ser Asn Gly Thr Thr Ser Asn Ala Ser Pro Arg Val Tyr
 95 100 105

20 Leu Leu Asp Pro Ala Gly Lys Asn Tyr Glu Met Leu Gln Leu Leu Gly
 110 115 120

Gln Glu Ile Ser Phe Asp Val Asp Ala Ser Asn Leu Pro Cys Gly Glu
 125 130 135 140

25 Asn Gly Ala Leu Tyr Leu Ser Glu Met Asp Ala Thr Gly Gly Arg Ser
 145 150 155

30

35

ES 2 608 402 T3

Gln Tyr Asn Pro Ala Gly Ala Ser Tyr Gly Ser Gly Tyr Cys Asp Ala
 160 165 170
 Gln Cys Gly Ser Ser Ser Trp Phe Asn Gly Ser Ile Asn Ser Ala Gly
 175 180 185
 5 Leu Gly Ser Cys Cys Asn Glu Met Asp Leu Trp Glu Ala Asn Gly Glu
 190 195 200
 Ala Thr Ala Leu Thr Pro His Pro Cys Ser Val Asp Gly Pro Tyr Gly
 205 210 215 220
 10 Cys Ser Gly Ser Ala Cys Gly Ser Thr Gly Val Cys Asp Lys Asn Gly
 225 230 235
 Cys Gly Phe Asn Pro Tyr Ala Leu Gly Asn His Ser Tyr Tyr Gly Pro
 240 245 250
 Gly Leu Thr Val Asp Thr Ser Lys Pro Phe Thr Val Thr Thr Gln Phe
 255 260 265
 15 Val Thr Asn Asp Gly Thr Lys Thr Gly Thr Leu Thr Glu Ile Arg Arg
 270 275 280
 Ser Tyr Thr Gln Asn Gly Lys Val Ile Ala Asn Ala Val Ala Ser Ser
 285 290 295 300
 20 Ser Ser Gly Phe Ser Gly Gln Ser Ser Ile Thr Glu Ser Phe Cys Thr
 305 310 315
 Ala Met Asp Ser Glu Ala Gly Thr Leu Gly Gly Leu Thr Thr Met Gly
 320 325 330
 25 Glu Ala Leu Gly Arg Gly Met Val Leu Ile Phe Ser Ile Trp Asn Asp
 335 340 345
 Ala Gly Gly Tyr Met Asn Trp Leu Asp Ser Gly Ser Ser Gly Pro Cys
 350 355 360
 Ser Ser Thr Ala Gly Ile Pro Ser Thr Ile Gln Ala Asn Asp Pro Gly
 365 370 375 380
 30 Thr Ser Val Thr Phe Ser Asn Ile Lys Trp Gly Asp Ile Gly Ser Thr
 385 390 395
 Gly Ser Gly Thr Gly Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Thr Ser Thr
 400 405 410
 35 Ser Pro Lys Thr Thr Ser Thr Thr Thr Thr Ser Ala Thr Thr Lys Thr

ES 2 608 402 T3

		415				420				425							
		Ser	Ala	Thr	Thr	Thr	Thr	Thr	Ser	Thr	Gly	Ala	Thr	Gln	Thr	His	Tyr
		430						435					440				
5		Gly	Gln	Cys	Gly	Gly	Met	Tyr	Tyr	Thr	Gly	Pro	Thr	Val	Cys	Ala	Ser
		445					450					455					460
		Pro	Tyr	Thr	Cys	Gln	Val	Gln	Asn	Pro	Tyr	Tyr	Ser	Gln	Cys	Leu	
					465						470					475	
10	<210>	5															
	<211>	1746															
	<212>	ADN															
	<213>	Acremonium cellulolyticus															
15	<220>																
	<221>	sig_peptide															
	<222>	(169)..(231)															
	<220>																
20	<221>	exón															
	<222>	(169)..(253)															
	<220>																
	<221>	CDS															
25	<222>	(169)..(253)															
	<220>																
	<221>	mat_peptide															
	<222>	join (232..253, 310..405, 462..1371, 1451..1595)															
30	<220>																
	<221>	Intrón															
	<222>	(254)..(309)															
35	<220>																

<221> exón

<222> (310)..(405)

<220>

5 <221> CDS

<222> (310)..(405)

<220>

<221> Intrón

10 <222> (406)..(461)

<220>

<221> exón

<222> (462)..(1371)

15

<220>

<221> CDS

<222> (462)..(1371)

20

<220>

<221> Intrón

<222> (1372)..(1450)

<220>

25 <221> exón

<222> (1451)..(1598)

<220>

<221> CDS

30 <222> (1451)..(1598)

<400> 5

35

ctctgcattg aatccccgaga gatgcacgac tcgtctgcag aaatgggaac gaaaaaccga 60
 taagccaaaa ggtttgata ttaaagatat ggccatatct ccagtcgagt ttcttgaaa 120
 ttggagacaa gaatcacatc ccggtttcgt cgctattact tgcgcagc atg aca atc 177
 Met Thr Ile
 -20
 5 atc tca aaa ttc ggt att ggg gtg ttg atc gca gtg gcc act gcg gcc 225
 Ile Ser Lys Phe Gly Ile Gly Val Leu Ile Ala Val Ala Thr Ala Ala
 -15 -10 -5
 act gcg caa cag act gtt tgg ggg caa t gtgagcttac atatctctga 273
 Thr Ala Gln Gln Thr Val Trp Gly Gln
 -1 1 5
 10 accaaacgaa ttggcttctc atcattatct ctatag gt ggt ggt atc ggc tgg 326
 Cys Gly Gly Ile Gly Trp
 10
 act gga ccc agc act tgt gtt tct ggc tcc tac tgc gct cct ggg aat 374
 Thr Gly Pro Ser Thr Cys Val Ser Gly Ser Tyr Cys Ala Pro Gly Asn
 15 15 20 25
 15 ccc tac tac tct cag tgt ctt cca ggg tct g gttggtggtt tactctcaat 425
 Pro Tyr Tyr Ser Gln Cys Leu Pro Gly Ser
 30 35
 aatgtccgaa tatctcaatc gctcacttga actcag ga ccg gca aca tcc acg 478
 Gly Pro Ala Thr Ser Thr
 40 45
 20 gta aca acc acg tca aga acg aca aca acc aca gcg agc att acg aca 526
 Val Thr Thr Thr Ser Arg Thr Thr Thr Thr Thr Ala Ser Ile Thr Thr
 50 55 60
 agt gtt agc aca acg aca act ccc acg agt acc ggt aag gtg cag ttc 574
 Ser Val Ser Thr Thr Thr Thr Pro Thr Ser Thr Gly Lys Val Gln Phe
 65 70 75
 25 gcc gga gtg aac att gcc ggc ttc gac ttt ggc atg gtt acc agc ggc 622
 Ala Gly Val Asn Ile Ala Gly Phe Asp Phe Gly Met Val Thr Ser Gly
 80 85 90
 aca cag gat cta agt cag att gtc gat gag tcc gtc gat ggc gtc acg 670
 Thr Gln Asp Leu Ser Gln Ile Val Asp Glu Ser Val Asp Gly Val Thr
 95 100 105
 caa atg aag cat ttt gtt aac gat gat acc ttt aac ata ttc cgc ttg 718
 Gln Met Lys His Phe Val Asn Asp Asp Thr Phe Asn Ile Phe Arg Leu
 110 115 120 125
 30 cct act ggg tgg cag tat ctc gtc aac aat gcc cta ggt ggc cag ctt 766
 Pro Thr Gly Trp Gln Tyr Leu Val Asn Asn Ala Leu Gly Gly Gln Leu
 130 135 140

35

5
 10
 15
 20
 25
 30
 35

gac gcg aca aag ttc ggc cag tac gat aag ctc gtt cag ggc tgc ctt 814
 Asp Ala Thr Lys Phe Gly Gln Tyr Asp Lys Leu Val Gln Gly Cys Leu
 145 150 155

tct acg ggt gcg cac tgc atc gtt gac att cat aac tat gcc cgc tgg 862
 Ser Thr Gly Ala His Cys Ile Val Asp Ile His Asn Tyr Ala Arg Trp
 160 165 170

aat gga gcc atc att ggc caa ggt gga ccg acc gat gca caa ttt gtg 910
 Asn Gly Ala Ile Ile Gly Gln Gly Gly Pro Thr Asp Ala Gln Phe Val
 175 180 185

gat ttg tgg act cag ctt gcg acc aaa tat aag gct aat agc agg atc 958
 Asp Leu Trp Thr Gln Leu Ala Thr Lys Tyr Lys Ala Asn Ser Arg Ile
 190 195 200 205

gtc ttt ggc gtc atg aat gag ccc cat gat ctg aat atc acc aca tgg 1006
 Val Phe Gly Val Met Asn Glu Pro His Asp Leu Asn Ile Thr Thr Trp
 210 215 220

gct gcc acc gta caa aag gtc gtt aca gca att cgt aat gct ggc gca 1054
 Ala Ala Thr Val Gln Lys Val Val Thr Ala Ile Arg Asn Ala Gly Ala
 225 230 235

act tca cag atg atc ttg ctc cct ggt acc gac tac aca agt gcc gcc 1102
 Thr Ser Gln Met Ile Leu Leu Pro Gly Thr Asp Tyr Thr Ser Ala Ala
 240 245 250

aat ttc gtg gaa aat gga tcc ggt gca gcc ctg gcg gca gtg gtc aat 1150
 Asn Phe Val Glu Asn Gly Ser Gly Ala Ala Leu Ala Ala Val Val Asn
 255 260 265

cca gat gga tct act cac aat ttg atc ttc gat gta cat aag tac ctg 1198
 Pro Asp Gly Ser Thr His Asn Leu Ile Phe Asp Val His Lys Tyr Leu
 270 275 280 285

gat tcg gac aat agt ggc acc cat tcc gag tgc gtc acc aac aat gtc 1246
 Asp Ser Asp Asn Ser Gly Thr His Ser Glu Cys Val Thr Asn Asn Val
 290 295 300

gac gct ttc tcg agt ctc gca acc tgg ctg cga tct gta ggt cgc cag 1294
 Asp Ala Phe Ser Ser Leu Ala Thr Trp Leu Arg Ser Val Gly Arg Gln
 305 310 315

gct ctg ctc tct gaa acc ggt ggc ggt aac gtt cag agc tgt gca acg 1342
 Ala Leu Leu Ser Glu Thr Gly Gly Gly Asn Val Gln Ser Cys Ala Thr
 320 325 330

tac atg tgc caa cag ctt gac ttc ctg aa gtaagtgtac atatgaatct 1391
 Tyr Met Cys Gln Gln Leu Asp Phe Leu Asn
 335 340

cctatatattt gcactaaaaa tccgtcaagc catatctgat atgctgatat tgccctgtag 1450

t gcg aac tcc gat gtc tac ctc gga tgg act tcc tgg tca gct ggt ggc 1499
 Ala Asn Ser Asp Val Tyr Leu Gly Trp Thr Ser Trp Ser Ala Gly Gly
 345 350 355

ttt cag gcg tcg tgg aac tat att ttg acg gaa gta cca aat ggc aat 1547
 Phe Gln Ala Ser Trp Asn Tyr Ile Leu Thr Glu Val Pro Asn Gly Asn
 360 365 370 375

acc gat cag tac ttg gtc cag cag tgt ttc gtt cca aag tgg aaa tcc 1595
 Thr Asp Gln Tyr Leu Val Gln Gln Cys Phe Val Pro Lys Trp Lys Ser
 380 385 390

ES 2 608 402 T3

tga atggctggtc caggtcttgt attaggtcgt acgctaaatt cttaagtttt	1648
tgggcctata tctgcttgat gcgtaagatg tgggtaatct ataaacctgc aagcctagct	1708
agcttaacgc agtaggatga tgagcacttt agcgttgc	1746

5

<210> 6

<211> 412

<212> PRT

<213> Acremonium cellulolyticus

10

<400> 6

ES 2 608 402 T3

Met Thr Ile Ile Ser Lys Phe Gly Ile Gly Val Leu Ile Ala Val Ala
-20 -15 -10

Thr Ala Ala Thr Ala Gln Gln Thr Val Trp Gly Gln Cys Gly Gly Ile
-5 -1 1 5 10

Gly Trp Thr Gly Pro Ser Thr Cys Val Ser Gly Ser Tyr Cys Ala Pro
15 20 25

Gly Asn Pro Tyr Tyr Ser Gln Cys Leu Pro Gly Ser Gly Pro Ala Thr
30 35 40

Ser Thr Val Thr Thr Thr Ser Arg Thr Thr Thr Thr Thr Ala Ser Ile
45 50 55

Thr Thr Ser Val Ser Thr Thr Thr Thr Pro Thr Ser Thr Gly Lys Val
60 65 70 75

Gln Phe Ala Gly Val Asn Ile Ala Gly Phe Asp Phe Gly Met Val Thr
80 85 90

Ser Gly Thr Gln Asp Leu Ser Gln Ile Val Asp Glu Ser Val Asp Gly
95 100 105

Val Thr Gln Met Lys His Phe Val Asn Asp Asp Thr Phe Asn Ile Phe
110 115 120

Arg Leu Pro Thr Gly Trp Gln Tyr Leu Val Asn Asn Ala Leu Gly Gly
125 130 135

Gln Leu Asp Ala Thr Lys Phe Gly Gln Tyr Asp Lys Leu Val Gln Gly
140 145 150 155

Cys Leu Ser Thr Gly Ala His Cys Ile Val Asp Ile His Asn Tyr Ala
160 165 170

Arg Trp Asn Gly Ala Ile Ile Gly Gln Gly Gly Pro Thr Asp Ala Gln
175 180 185

ES 2 608 402 T3

Phe Val Asp Leu Trp Thr Gln Leu Ala Thr Lys Tyr Lys Ala Asn Ser
 190 195 200
 Arg Ile Val Phe Gly Val Met Asn Glu Pro His Asp Leu Asn Ile Thr
 205 210 215
 5
 Thr Trp Ala Ala Thr Val Gln Lys Val Val Thr Ala Ile Arg Asn Ala
 220 225 230 235
 Gly Ala Thr Ser Gln Met Ile Leu Leu Pro Gly Thr Asp Tyr Thr Ser
 240 245 250
 10
 Ala Ala Asn Phe Val Glu Asn Gly Ser Gly Ala Ala Leu Ala Ala Val
 255 260 265
 Val Asn Pro Asp Gly Ser Thr His Asn Leu Ile Phe Asp Val His Lys
 270 275 280
 15
 Tyr Leu Asp Ser Asp Asn Ser Gly Thr His Ser Glu Cys Val Thr Asn
 285 290 295
 Asn Val Asp Ala Phe Ser Ser Leu Ala Thr Trp Leu Arg Ser Val Gly
 300 305 310 315
 20
 Arg Gln Ala Leu Leu Ser Glu Thr Gly Gly Gly Asn Val Gln Ser Cys
 320 325 330
 Ala Thr Tyr Met Cys Gln Gln Leu Asp Phe Leu Asn Ala Asn Ser Asp
 335 340 345
 25
 Val Tyr Leu Gly Trp Thr Ser Trp Ser Ala Gly Gly Phe Gln Ala Ser
 350 355 360
 Trp Asn Tyr Ile Leu Thr Glu Val Pro Asn Gly Asn Thr Asp Gln Tyr
 365 370 375
 30
 Leu Val Gln Gln Cys Phe Val Pro Lys Trp Lys Ser
 380 385 390

<210> 7

<211> 1551

<212> ADN

<213> Acremonium cellulolyticus

35

<220>

<221> sig_peptide

<222> (70)..(129)

5 <220>

<221> exón

<222> (70)..(450)

<220>

10 <221> CDS

<222> (70)..(450)

<220>

<221> mat_peptide

15 <222> join (130..450, 501..764, 831..1373)

<220>

<221> Intrón

<222> (451)..(500)

20

<220>

<221> exón

<222> (501)..(764)

25 <220>

<221> CDS

<222> (501)..(764)

<220>

30 <221> Intrón

<222> (765)..(830)

<220>

<221> exón

35 <222> (831)..(1376)

ES 2 608 402 T3

<220>

<221> CDS

<222> (831)..(1376)

5

<400> 7

	cagtcagttg tgtagacacg tttactgaat attgaacagc tcccgcgtac tcaatacacc	60
10	ttaacaagc atg agg tct aca tca aca ttt gta gct agt gct ata cta gcg Met Arg Ser Thr Ser Thr Phe Val Ala Ser Ala Ile Leu Ala	111
	-20 -15 -10	
	gtc gct tcc gtt caa gcc cag cag act gga tat ggc cag tgc ggt ggt	159
	Val Ala Ser Val Gln Ala Gln Gln Thr Gly Tyr Gly Gln Cys Gly Gly	
	-5 -1 1 5 10	
15	gag aac tgg act ggt gcc acg acc tgc gtg tct ggt tgg aca tgt acc	207
	Glu Asn Trp Thr Gly Ala Thr Thr Cys Val Ser Gly Trp Thr Cys Thr	
	15 20 25	
	tat ctt aac gac tgg tac tct caa tgt cta cca gct tcc agc act ctg	255
	Tyr Leu Asn Asp Trp Tyr Ser Gln Cys Leu Pro Ala Ser Ser Thr Leu	
	30 35 40	
20	act acc acg aca tct tcg aag acc tct act act gct aca acg act tca	303
	Thr Thr Thr Thr Ser Ser Lys Thr Ser Thr Thr Ala Thr Thr Ser	
	45 50 55	
	aag act aca acc tca tcg acg agt tca ccg acg agt acc gga aaa ttg	351
	Lys Thr Thr Thr Ser Ser Thr Ser Ser Pro Thr Ser Thr Gly Lys Leu	
	60 65 70	
25	aaa tgg ttc ggt gta gat gaa tca tgt gcc gag ttc gga act gca atg	399
	Lys Trp Phe Gly Val Asp Glu Ser Cys Ala Glu Phe Gly Thr Ala Met	
	75 80 85 90	

cca ggc act tgg ggt gtc gac ttc acc ttc gcc aat aca gca acc att 447
 Pro Gly Thr Trp Gly Val Asp Phe Thr Phe Ala Asn Thr Ala Thr Ile
 95 100 105

ggg gtacgtattc ttgcatagtt cgccagaaaa agcgctaata gcatgagcag gaa 503
 Gly Glu

ttc atc agt cag ggt ttc aat att ttc cgt atc ccc ttt gcc atg gaa 551
 Phe Ile Ser Gln Gly Phe Asn Ile Phe Arg Ile Pro Phe Ala Met Glu
 110 115 120

cga atg gta caa ggg tca att gac gct gct tta aat acc gca tat ttg 599
 Arg Met Val Gln Gly Ser Ile Asp Ala Ala Leu Asn Thr Ala Tyr Leu
 125 130 135 140

acc aac tac tca gtt gcc gtc aac tat att acc tcg aat gga gca tac 647
 Thr Asn Tyr Ser Val Ala Val Asn Tyr Ile Thr Ser Asn Gly Ala Tyr
 145 150 155

gcc gtg att gat cct cat aat tat gga agg tac aat ggc agc atc atc 695
 Ala Val Ile Asp Pro His Asn Tyr Gly Arg Tyr Asn Gly Ser Ile Ile
 160 165 170

acc gat act act gct ttc cag acc ttc tgg tct aac ttg gcc act gct 743
 Thr Asp Thr Thr Ala Phe Gln Thr Phe Trp Ser Asn Leu Ala Thr Ala
 175 180 185

ttc aag agc aat tcc aaa gtt gtaagtgcac ctctctggc cttcttcttt 794
 Phe Lys Ser Asn Ser Lys Val
 190 195

cttcaaatc tatcagtaga gattgacaat cgaaag atc ttt gac aca aac aac 848
 Ile Phe Asp Thr Asn Asn
 200

gag tat cac gac atg gat gaa acc ctg gtt ttt aac ctg aac caa gca 896
 Glu Tyr His Asp Met Asp Glu Thr Leu Val Phe Asn Leu Asn Gln Ala
 205 210 215

gca att gac ggt att cgt ggc gcc gga gcc aca acg caa tat atc ttt 944
 Ala Ile Asp Gly Ile Arg Gly Ala Gly Ala Thr Thr Gln Tyr Ile Phe
 220 225 230

gcc gaa ggt aat agc tgg act gga gca tgg acc tgg aac acg acc aat 992
 Ala Glu Gly Asn Ser Trp Thr Gly Ala Trp Thr Trp Asn Thr Thr Asn
 235 240 245

gat tca ctc aaa gat cta agt gat cct gag aac cta ctt gtc tac gaa 1040
 Asp Ser Leu Lys Asp Leu Ser Asp Pro Glu Asn Leu Leu Val Tyr Glu
 250 255 260 265

atg cac caa tac ctt gac tct gat gga tct ggc aca aat tct gcc tgc 1088
 Met His Gln Tyr Leu Asp Ser Asp Gly Ser Gly Thr Asn Ser Ala Cys
 270 275 280

gtc tcc tca aca att ggt gtc gag cgt gta gaa ggt gcc act gct tgg 1136
 Val Ser Ser Thr Ile Gly Val Glu Arg Val Glu Gly Ala Thr Ala Trp
 285 290 295

tta cag gcg aac aaa aag ctc ggt gtt cta gga gag tat gcc ggt ggc 1184
 Leu Gln Ala Asn Lys Lys Leu Gly Val Leu Gly Glu Tyr Ala Gly Gly
 300 305 310

ES 2 608 402 T3

ccc aac tgc gtc tgt caa gcc gcc gta aca gga atg ctg gac cat cta 1232
 Pro Asn Ser Val Cys Gln Ala Ala Val Thr Gly Met Leu Asp His Leu
 315 320 325

gtc gcc aac aac gac gtc tgg cta gga gcc gtg tgg tgg gcg gct ggt 1280
 Val Ala Asn Asn Asp Val Trp Leu Gly Ala Val Trp Trp Ala Ala Gly
 330 335 340 345

5 cca tgg tgg cct tct tgc act tgg gca agc att gag cca ccg agt gga 1328
 Pro Trp Trp Pro Ser Ser Thr Trp Ala Ser Ile Glu Pro Pro Ser Gly
 350 355 360

cag gct tat gtc tat tat gat gaa atc ctg cag gcc tac acc cct tag 1376
 Gln Ala Tyr Val Tyr Tyr Asp Glu Ile Leu Gln Ala Tyr Thr Pro
 365 370 375

10 ataggcttag ggtaggggtt aacatcctct taaatcgtag caatcaagac gcttactacc 1436
 atgacggatg caccacttat aagggccttt ttaagatgac cttagatcac agttgggtcc 1496
 cataatatgt aacttctaca tgaattgttt gatacctatg aagaccagc tgagt 1551

<210> 8

15 <211> 396
 <212> PRT
 <213> Acremonium cellulolyticus

<400> 8

20 Met Arg Ser Thr Ser Thr Phe Val Ala Ser Ala Ile Leu Ala Val Ala
 -20 -15 -10 -5
 Ser Val Gln Ala Gln Gln Thr Gly Tyr Gly Gln Cys Gly Gly Glu Asn
 -1 1 5 10
 Trp Thr Gly Ala Thr Thr Cys Val Ser Gly Trp Thr Cys Thr Tyr Leu
 15 20 25

25 Asn Asp Trp Tyr Ser Gln Cys Leu Pro Ala Ser Ser Thr Leu Thr Thr
 30 35 40
 Thr Thr Ser Ser Lys Thr Ser Thr Thr Ala Thr Thr Thr Ser Lys Thr
 45 50 55 60
 Thr Thr Ser Ser Thr Ser Ser Pro Thr Ser Thr Gly Lys Leu Lys Trp
 65 70 75

30 Phe Gly Val Asp Glu Ser Cys Ala Glu Phe Gly Thr Ala Met Pro Gly
 80 85 90
 Thr Trp Gly Val Asp Phe Thr Phe Ala Asn Thr Ala Thr Ile Gly Glu
 95 100 105

35 Phe Ile Ser Gln Gly Phe Asn Ile Phe Arg Ile Pro Phe Ala Met Glu
 110 115 120

ES 2 608 402 T3

Arg Met Val Gln Gly Ser Ile Asp Ala Ala Leu Asn Thr Ala Tyr Leu
125 130 135 140

Thr Asn Tyr Ser Val Ala Val Asn Tyr Ile Thr Ser Asn Gly Ala Tyr
145 150 155

Ala Val Ile Asp Pro His Asn Tyr Gly Arg Tyr Asn Gly Ser Ile Ile
160 165 170

Thr Asp Thr Thr Ala Phe Gln Thr Phe Trp Ser Asn Leu Ala Thr Ala
175 180 185

Phe Lys Ser Asn Ser Lys Val Ile Phe Asp Thr Asn Asn Glu Tyr His
190 195 200

Asp Met Asp Glu Thr Leu Val Phe Asn Leu Asn Gln Ala Ala Ile Asp
205 210 215 220

Gly Ile Arg Gly Ala Gly Ala Thr Thr Gln Tyr Ile Phe Ala Glu Gly
225 230 235

Asn Ser Trp Thr Gly Ala Trp Thr Trp Asn Thr Thr Asn Asp Ser Leu
240 245 250

Lys Asp Leu Ser Asp Pro Glu Asn Leu Leu Val Tyr Glu Met His Gln
255 260 265

Tyr Leu Asp Ser Asp Gly Ser Gly Thr Asn Ser Ala Cys Val Ser Ser
270 275 280

Thr Ile Gly Val Glu Arg Val Glu Gly Ala Thr Ala Trp Leu Gln Ala
285 290 295 300

Asn Lys Lys Leu Gly Val Leu Gly Glu Tyr Ala Gly Gly Pro Asn Ser
305 310 315

Val Cys Gln Ala Ala Val Thr Gly Met Leu Asp His Leu Val Ala Asn
320 325 330

Asn Asp Val Trp Leu Gly Ala Val Trp Trp Ala Ala Gly Pro Trp Trp
335 340 345

Pro Ser Ser Thr Trp Ala Ser Ile Glu Pro Pro Ser Gly Gln Ala Tyr
350 355 360

Val Tyr Tyr Asp Glu Ile Leu Gln Ala Tyr Thr Pro
365 370 375

<210> 9

<211> 1090

<212> ADN

<213> Acremonium cellulolyticus

5

<220>

<221> sig_peptide

<222> (141)..(185)

10

<220>

<221> exón

<222> (141)..(550)

<220>

15

<221> CDS

<222> (141)..(550)

<220>

<221> mat_peptide

20

<222> join (186..550, 610..830, 895..971)

<220>

<221> Intrón

<222> (551)..(609)

25

<220>

<221> exón

<222> (610)..(830)

30

<220>

<221> CDS

<222> (610)..(830)

<220>

35

<221> Intrón

ES 2 608 402 T3

<222> (831)..(894)

<220>

<221> exón

5 <222> (895)..(974)

<220>

<221> CDS

<222> (895)..(974)

10

<400> 9

	aaagaccgcg tgtaggatac ggtagacttg tctataaaag cctcgactcc tacgcttcca	60
	gagttgtctg ctaggcttct atcatcggac tatcacaact tttaaacta cacttctaag	120
15	aaaaagaatc tcatttcaag atg aag cta act ttt ctc ctg aac ctg gcc gtt	173
	Met Lys Leu Thr Phe Leu Leu Asn Leu Ala Val	
	-15 -10 -5	
	gcc gca tct gct cag cag agc cta tgc tct caa tac tcg agc tac acc	221
	Ala Ala Ser Ala Gln Gln Ser Leu Cys Ser Gln Tyr Ser Ser Tyr Thr	
	-1 1 5 10	
	agt ggc cag tac tcc gtc aac aac aac cta tgg ggt gag agc agt ggc	269
	Ser Gly Gln Tyr Ser Val Asn Asn Asn Leu Trp Gly Glu Ser Ser Gly	
	15 20 25	
	tct ggc tcc cag tgc act tat gtc aat tcc att tcc agc tct ggc gtt	317
	Ser Gly Ser Gln Cys Thr Tyr Val Asn Ser Ile Ser Ser Ser Gly Val	

ES 2 608 402 T3

30	35	40	
tca tgg tct act acc tgg aac tgg tcc gga ggc agc acc tcg gtc aag			365
Ser Trp Ser Thr Thr Trp Asn Trp Ser Gly Gly Ser Thr Ser Val Lys			
45	50	55	60
agc tat gcc aat tcg cag ttg agt ggc ctc acc aag aag ctc gtc agc			413
Ser Tyr Ala Asn Ser Gln Leu Ser Gly Leu Thr Lys Lys Leu Val Ser			
	65	70	75
aac ttg caa agc att cct acc tct gtg cag tgg agc tat agc aat acc			461
Asn Leu Gln Ser Ile Pro Thr Ser Val Gln Trp Ser Tyr Ser Asn Thr			
	80	85	90
aac atc gtt gcc gat gtt tcg tat gat ctc ttc acg gca gcg gat atc			509
Asn Ile Val Ala Asp Val Ser Tyr Asp Leu Phe Thr Ala Ala Asp Ile			
	95	100	105
aac cat gtt acc tac agt ggt gac tat gag ctc atg atc tg			550
Asn His Val Thr Tyr Ser Gly Asp Tyr Glu Leu Met Ile Trp			
	110	115	120
gtaaatatgc ccccgtcgta tttcaagtat gagacatctc ccgctaataca agatatcag			609
g ctc ggt aag tac ggc ggt gcc cag ccc ctc ggc agt caa atc gga aca			658
Leu Gly Lys Tyr Gly Gly Ala Gln Pro Leu Gly Ser Gln Ile Gly Thr			
	125	130	135
gcc aac gtg gga ggc gca acc tgg cag ctg tgg tat ggc gta aac gga			706
Ala Asn Val Gly Gly Ala Thr Trp Gln Leu Trp Tyr Gly Val Asn Gly			
	140	145	150
tcc caa aaa acg tac agt ttc gtc gcc tcc agc caa aca act tca tgg			754
Ser Gln Lys Thr Tyr Ser Phe Val Ala Ser Ser Gln Thr Thr Ser Trp			
	155	160	165
aac ggc gat atc ttg cag ttc ttc aag tat cta cag agc aac cag ggc			802
Asn Gly Asp Ile Leu Gln Phe Phe Lys Tyr Leu Gln Ser Asn Gln Gly			
	175	180	185
ttt cca gct agc agc cag tac ttg atc g gtaagccatg accctttctg			850
Phe Pro Ala Ser Ser Gln Tyr Leu Ile			
	190	195	
ttcctataga ctccttgat ctgacatgat tgcttcggta tcag at ctg caa ttc			905
			Asp Leu Gln Phe
ggc acg gaa ccg ttt aca gga agc cag act act ttg acg gtc aac cat			953
Gly Thr Glu Pro Phe Thr Gly Ser Gln Thr Thr Leu Thr Val Asn His			
	200	205	210
215			
tgg tct gca tct gtc aat tag actactatag tctttcgaat tgcagacact			1004
Trp Ser Ala Ser Val Asn			
	220		
ggtttctacg tgtatctgtc atccagttgc atgtgaggat ggatgaactt cttccgtgga			1064
cgtattggtg tcttatttcc tacgcg			1090

ES 2 608 402 T3

<210> 10

<211> 236

<212> PRT

<213> Acremonium cellulolyticus

5 <400> 10

```

Met Lys Leu Thr Phe Leu Leu Asn Leu Ala Val Ala Ala Ser Ala Gln
-15          -10          -5          -1  1

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

Val Asn Asn Asn Leu Trp Gly Glu Ser Ser Gly Ser Gly Ser Gln Cys
          20          25          30

Thr Tyr Val Asn Ser Ile Ser Ser Ser Gly Val Ser Trp Ser Thr Thr
          35          40          45

Trp Asn Trp Ser Gly Gly Ser Thr Ser Val Lys Ser Tyr Ala Asn Ser
50          55          60          65

Gln Leu Ser Gly Leu Thr Lys Lys Leu Val Ser Asn Leu Gln Ser Ile
          70          75          80

Pro Thr Ser Val Gln Trp Ser Tyr Ser Asn Thr Asn Ile Val Ala Asp
          85          90          95

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

Ser Gly Asp Tyr Glu Leu Met Ile Trp Leu Gly Lys Tyr Gly Gly Ala
          115          120          125

Gln Pro Leu Gly Ser Gln Ile Gly Thr Ala Asn Val Gly Gly Ala Thr
130          135          140          145

Trp Gln Leu Trp Tyr Gly Val Asn Gly Ser Gln Lys Thr Tyr Ser Phe
          150          155          160

Val Ala Ser Ser Gln Thr Thr Ser Trp Asn Gly Asp Ile Leu Gln Phe
          165          170          175

Phe Lys Tyr Leu Gln Ser Asn Gln Gly Phe Pro Ala Ser Ser Gln Tyr
          180          185          190

Leu Ile Asp Leu Gln Phe Gly Thr Glu Pro Phe Thr Gly Ser Gln Thr
          195          200          205

Thr Leu Thr Val Asn His Trp Ser Ala Ser Val Asn
210          215          220

```

<210> 11

<211> 1379

<212> ADN

<213> Acremonium cellulolyticus

5

<220>

<221> sig_peptide

<222> (114)..(161)

10

<220>

<221> exón

<222> (114)..(182)

<220>

15

<221> CDS

<222> (114)..(182)

<220>

<221> mat_peptide

20

<222> join (162..182, 233..298, 358..1227)

<220>

<221> Intrón

<222> (183)..(232)

25

<220>

<221> exón

<222> (233)..(298)

30

<220>

<221> CDS

<222> (233)..(298)

<220>

35

<221> Intrón

ES 2 608 402 T3

<222> (299)..(357)

<220>

<221> exón

5 <222> (358)..(1230)

<220>

<221> CDS

<222> (358)..(1230)

10

<400> 11

tacattccga aggcacagtt ccttcttcca ttcattcctt tgcgtttact accgtttctct 60

tctctagact atctttgaat tcttgttcga gatctttacc accggttgga aaa atg 116
Met

15

aag gct ttc tat ctt tct ctc tgg gcg ctg gcg ggt tcg gcg tct gcc 164
Lys Ala Phe Tyr Leu Ser Leu Trp Ala Leu Ala Gly Ser Ala Ser Ala
-15 -10 -5 -1 1

tac ctt gca act act act gtaagaaact ggactattac atgggcgaat 212
Tyr Leu Ala Thr Thr Thr
5

ttatgctaatt tgtcttatag cgt tac tat gac ggc cag gaa ggt gct tgc ggt 265
Arg Tyr Tyr Asp Gly Gln Glu Gly Ala Cys Gly
10 15

tgt ggt agc agc tcc gga ctc gac tca tgg cag gttagtattc ccaaccgtct 318
Cys Gly Ser Ser Ser Gly Leu Asp Ser Trp Gln

ES 2 608 402 T3

20 25

tccatgacag gattacctag gtatgttaac atgaaacag ctc gac gtg tca acc 372
Leu Asp Val Ser Thr
30

ggt gtc tat acc gcc gcc ggt tct caa gcc ctc ttc gac acc gac ggc 420
Gly Val Tyr Thr Ala Ala Gly Ser Gln Ala Leu Phe Asp Thr Asp Gly
35 40 45 50

tcc tcc tgg tgc ggc ggc ggt tgc ggt aaa tgc tac aac cta acc tcc 468
Ser Ser Trp Cys Gly Gly Gly Cys Gly Lys Cys Tyr Asn Leu Thr Ser
55 60 65

acc ggc acc tcc gcc tgc aac ggc tgc ggc gaa gga ggt gtc gcc ggc 516
Thr Gly Thr Ser Ala Cys Asn Gly Cys Gly Glu Gly Gly Val Ala Gly
70 75 80

gaa agc atc atc gtc atg gtc acc aac ctc tgc ccc tac aac gga aac 564
Glu Ser Ile Ile Val Met Val Thr Asn Leu Cys Pro Tyr Asn Gly Asn
85 90 95

gaa gtc tgg tgc ccc tcg gtc ggt gcc aaa aac aac tac gga tac agc 612
Glu Val Trp Cys Pro Ser Val Gly Ala Lys Asn Asn Tyr Gly Tyr Ser
100 105 110

tac cac ttc gat atc atg gct caa agc gaa gtg ttt ggt gac aac gtt 660
Tyr His Phe Asp Ile Met Ala Gln Ser Glu Val Phe Gly Asp Asn Val
115 120 125 130

gtc gtc aac ttt gag ccc gtc gct tgc ccc ggt cag gct gcc tcg gat 708
Val Val Asn Phe Glu Pro Val Ala Cys Pro Gly Gln Ala Ala Ser Asp
135 140 145

tgg gag act tgt act tgc tat ggt cag acg gat act gat act acc cct 756
Trp Glu Thr Cys Thr Cys Tyr Gly Gln Thr Asp Thr Asp Thr Thr Pro
150 155 160

gct ggg atg acg act gct gct gga tct gcg ggt act gtt gcg act tca 804
Ala Gly Met Thr Thr Ala Ala Gly Ser Ala Gly Thr Val Ala Thr Ser
165 170 175

tct gct tct tcg tcg tcg act tca act tcg acc act ttg ctc gct gtt 852
Ser Ala Ser Ser Ser Ser Thr Ser Thr Ser Thr Thr Leu Leu Ala Val
180 185 190

tcg act tct ccc gtg aaa gag gtt gct tcc tcg act tcc acc tca tct 900
Ser Thr Ser Pro Val Lys Glu Val Ala Ser Ser Thr Ser Thr Ser Ser
195 200 205 210

acc tct acc tcg acc gtc aag cca gtc tcg act gtc gtt gcc gaa acc 948
Thr Ser Thr Ser Thr Val Lys Pro Val Ser Thr Val Val Ala Glu Thr
215 220 225

tcc cct gcc gct gtc gtt gag ccc acc aca aca gca gtc tca aac ccc 996
Ser Pro Ala Ala Val Val Glu Pro Thr Thr Thr Ala Val Ser Asn Pro
230 235 240

caa ggc gcc gct aca aca acc acc acc tac gtg aca gat tac act acc 1044
Gln Gly Ala Ala Thr Thr Thr Thr Thr Tyr Val Thr Asp Tyr Thr Thr
245 250 255

gtc acc gaa acc tcc acc atc tgg gcc act caa acc ccc agc tcc aca 1092
Val Thr Glu Thr Ser Thr Ile Trp Ala Thr Gln Thr Pro Ser Ser Thr
260 265 270

ES 2 608 402 T3

acc ggt agc tcc agt gcc gtc cag act ctg tac gga cag tgc ggc ggt 1140
 Thr Gly Ser Ser Ser Ala Val Gln Thr Leu Tyr Gly Gln Cys Gly Gly
 275 280 285 290

atc aac tgg acc ggc gcc acg aca tgc act tct ggc gca act tgc aag 1188
 Ile Asn Trp Thr Gly Ala Thr Thr Cys Thr Ser Gly Ala Thr Cys Lys
 295 300 305

5 gtg cag aac cct tac tac tac cag tgc gtc agc tcg tcc taa 1230
 Val Gln Asn Pro Tyr Tyr Tyr Gln Cys Val Ser Ser Ser
 310 315

atcagcgagt tgatccggga agataactag tccacttgga caaattctct gaagatattc 1290

atctttcttt tcaaaatctt tctacttctc tttgagacta ttacttttcg cttcgtgtct 1350

10 tctgtgcatg gtcaggataa tcagctcag 1379

<210> 12

<211> 335

<212> PRT

15 <213> Acremonium cellulolyticus

<400> 12

Met Lys Ala Phe Tyr Leu Ser Leu Trp Ala Leu Ala Gly Ser Ala Ser
 -15 -10 -5 -1

20 Ala Tyr Leu Ala Thr Thr Thr Arg Tyr Tyr Asp Gly Gln Glu Gly Ala
 1 5 10 15

Cys Gly Cys Gly Ser Ser Ser Gly Leu Asp Ser Trp Gln Leu Asp Val
 20 25 30

Ser Thr Gly Val Tyr Thr Ala Ala Gly Ser Gln Ala Leu Phe Asp Thr
 35 40 45

Asp Gly Ser Ser Trp Cys Gly Gly Gly Cys Gly Lys Cys Tyr Asn Leu
 50 55 60

Thr Ser Thr Gly Thr Ser Ala Cys Asn Gly Cys Gly Glu Gly Gly Val
 65 70 75 80

Ala Gly Glu Ser Ile Ile Val Met Val Thr Asn Leu Cys Pro Tyr Asn
 85 90 95

Gly Asn Glu Val Trp Cys Pro Ser Val Gly Ala Lys Asn Asn Tyr Gly
 100 105 110

Tyr Ser Tyr His Phe Asp Ile Met Ala Gln Ser Glu Val Phe Gly Asp
 115 120 125

Asn Val Val Val Asn Phe Glu Pro Val Ala Cys Pro Gly Gln Ala Ala
 130 135 140

ES 2 608 402 T3

Ser Asp Trp Glu Thr Cys Thr Cys Tyr Gly Gln Thr Asp Thr Asp Thr
 145 150 155 160
 Thr Pro Ala Gly Met Thr Thr Ala Ala Gly Ser Ala Gly Thr Val Ala
 165 170 175
 5 Thr Ser Ser Ala Ser Ser Ser Ser Thr Ser Thr Ser Thr Thr Leu Leu
 180 185 190
 Ala Val Ser Thr Ser Pro Val Lys Glu Val Ala Ser Ser Thr Ser Thr
 195 200 205
 10 Ser Ser Thr Ser Thr Ser Thr Val Lys Pro Val Ser Thr Val Val Ala
 210 215 220
 Glu Thr Ser Pro Ala Ala Val Val Glu Pro Thr Thr Thr Ala Val Ser
 225 230 235 240
 15 Asn Pro Gln Gly Ala Ala Thr Thr Thr Thr Thr Tyr Val Thr Asp Tyr
 245 250 255
 Thr Thr Val Thr Glu Thr Ser Thr Ile Trp Ala Thr Gln Thr Pro Ser
 260 265 270
 20 Ser Thr Thr Gly Ser Ser Ser Ala Val Gln Thr Leu Tyr Gly Gln Cys
 275 280 285
 Gly Gly Ile Asn Trp Thr Gly Ala Thr Thr Cys Thr Ser Gly Ala Thr
 290 295 300
 25 Cys Lys Val Gln Asn Pro Tyr Tyr Tyr Gln Cys Val Ser Ser Ser
 305 310 315

<210> 13

<211> 1348

<212> ADN

<213> Acremonium cellulolyticus

30

<220>

<221> sig_peptide

<222> (124)..(186)

35

<220>

<221> exón

<222> (124)..(224)

<220>

5 <221> CDS

<222> (124)..(224)

<220>

<221> mat_peptide

10 <222> join (187..224, 276..1140)

<220>

<221> Intrón

<222> (225)..(275)

15

<220>

<221> exón

<222> (276)..(1143)

20

<220>

<221> CDS

<222> (276)..(1143)

<400> 13

25

cgttgaccga aagccacttg actcttctct tctgtttctc aacatccacc aagctacca 60
 gctccttgcc tccttacctt ctttacctac aatttctacc tttacaaga actcgttgac 120
 gag atg cct tct act aaa gtc gct gcc ctt tct gct gtt cta gct ttg 168
 Met Pro Ser Thr Lys Val Ala Ala Leu Ser Ala Val Leu Ala Leu
 -20 -15 -10
 gcc tcc acg gtt gct ggc cat ggt ttt gtg caa aac atc gtt atc gac 216
 Ala Ser Thr Val Ala Gly His Gly Phe Val Gln Asn Ile Val Ile Asp
 -5 -1 1 5 10
 ggt aaa tc gtaagcagtg atgcatccat tattaaacta gacatgctta 264
 Gly Lys Ser

 caaaaaatca g t tac tct gga tac ctt gtg aat cag ttc ccc tac gag 312
 Tyr Ser Gly Tyr Leu Val Asn Gln Phe Pro Tyr Glu
 15 20 25
 tcc aac cca cca gct gtt att ggg tgg gca aca act gca acc gac ctg 360
 Ser Asn Pro Pro Ala Val Ile Gly Trp Ala Thr Thr Ala Thr Asp Leu
 30 35 40
 gga ttc gtc gct ccc agt gag tac acc aat gca gac att atc tgc cac 408
 Gly Phe Val Ala Pro Ser Glu Tyr Thr Asn Ala Asp Ile Ile Cys His
 45 50 55
 aag aac gcc aca cct ggc gcg ctt tct gct cca gtt gct gca ggg ggc 456
 Lys Asn Ala Thr Pro Gly Ala Leu Ser Ala Pro Val Ala Ala Gly Gly
 60 65 70
 act gtc gag ctc cag tgg act aca tgg ccc gat agt cat cac ggt cct 504
 Thr Val Glu Leu Gln Trp Thr Thr Trp Pro Asp Ser His His Gly Pro
 75 80 85
 gtc atc agc tac ctc gcc aac tgc aat ggc aat tgt tct acc gtg gat 552
 Val Ile Ser Tyr Leu Ala Asn Cys Asn Gly Asn Cys Ser Thr Val Asp
 90 95 100 105
 aag act aag cta aac ttt gtc aag att gac caa ggt ggt ttg atc gac 600
 Lys Thr Lys Leu Asn Phe Val Lys Ile Asp Gln Gly Gly Leu Ile Asp
 110 115 120
 gat act acc ccc ccg ggt aca tgg gct tcc gac aaa ctt atc gct gcc 648
 Asp Thr Thr Pro Pro Gly Thr Trp Ala Ser Asp Lys Leu Ile Ala Ala
 125 130 135
 aac aac agc tgg act gta act atc ccc tcc acc atc gcg cct gga aac 696
 Asn Asn Ser Trp Thr Val Thr Ile Pro Ser Thr Ile Ala Pro Gly Asn
 140 145 150
 tac gtt ttg cgc cac gaa atc att gct ctt cat tcc gct gga aac gca 744
 Tyr Val Leu Arg His Glu Ile Ile Ala Leu His Ser Ala Gly Asn Ala
 155 160 165
 gac ggt gcc caa aac tac cct caa tgc atc aac ttg gag atc acc ggc 792
 Asp Gly Ala Gln Asn Tyr Pro Gln Cys Ile Asn Leu Glu Ile Thr Gly
 170 175 180 185

ES 2 608 402 T3

agc gga acc gcc gct ccc tct ggt acc gct ggc gaa aag ctc tac acc 840
 Ser Gly Thr Ala Ala Pro Ser Gly Thr Ala Gly Glu Lys Leu Tyr Thr
 190 195 200

tct act gac ccc ggt atc ttg gtc aat atc tac caa tcc ttg tcg acc 888
 Ser Thr Asp Pro Gly Ile Leu Val Asn Ile Tyr Gln Ser Leu Ser Thr
 205 210 215

5

 tac gtt att ccc gga cca act ctg tgg agc ggt gct gcc aat ggc gct 936
 Tyr Val Ile Pro Gly Pro Thr Leu Trp Ser Gly Ala Ala Asn Gly Ala
 220 225 230

gtt gcc act ggt tct gct act gcg gtt gct acg act gcc gct gct tct 984
 Val Ala Thr Gly Ser Ala Thr Ala Val Ala Thr Thr Ala Ala Ala Ser
 235 240 245

10

 gcg acc gct act cct acc aca ctt gtt acc tct gtc gct cca gct tca 1032
 Ala Thr Ala Thr Pro Thr Thr Leu Val Thr Ser Val Ala Pro Ala Ser
 250 255 260 265

tct acc tct gcc act gct gtt gtg acc act gtc gct cct gca gta act 1080
 Ser Thr Ser Ala Thr Ala Val Val Thr Thr Val Ala Pro Ala Val Thr
 270 275 280

15

 gat gtc gtg act gtc acc gat gta gtt acc gtg acc acc gtc atc acc 1128
 Asp Val Val Thr Val Thr Asp Val Val Thr Val Thr Thr Val Ile Thr
 285 290 295

act act gtc ctt taa aaccctggc aaagttcatt gcgtgatctg tcaaccctga 1183
 Thr Thr Val Leu
 300

20

 cctgtttccc ccatttttcc ggatccaagt ctttgagaac atctgttttag ctgttcgagc 1243
 aactttctac catttttctt tctttctctg aacctgcttt cggattgtac atttttcaac 1303
 ttcattttta tgtccatatt tgtgacatca tttagcttta ggcca 1348

<210> 14
 <211> 322
 25 <212> PRT
 <213> Acremonium cellulolyticus

<400> 14

30

 Met Pro Ser Thr Lys Val Ala Ala Leu Ser Ala Val Leu Ala Leu Ala
 -20 -15 -10

Ser Thr Val Ala Gly His Gly Phe Val Gln Asn Ile Val Ile Asp Gly
 -5 -1 1 5 10

ES 2 608 402 T3

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

ES 2 608 402 T3

270

275

280

Val Thr Val Thr Asp Val Val Thr Val Thr Thr Val Ile Thr Thr Thr
285 290 295

5

Val Leu
300

<210> 15

<211> 2052

<212> ADN

10 <213> Acremonium cellulolyticus

<220>

<221> sig_peptide

<222> (238)..(321)

15

<220>

<221> exón

<222> (238)..(783)

20

<220>

<221> CDS

<222> (238)..(783)

<220>

25 <221> mat_peptide

<222> join (322..783, 851..1137, 1206..1702, 1757..1884)

<220>

<221> Intrón

30 <222> (784)..(850)

<220>

<221> exón

<222> (851)..(1137)

35

<220>

<221> CDS

<222> (851)..(1137)

5 <220>

<221> Intrón

<222> (1138)..(1205)

<220>

10 <221> exón

<222> (1206)..(1702)

<220>

<221> CDS

15 <222> (1206)..(1702)

<220>

<221> Intrón

<222> (1703)..(1756)

20

<220>

<221> exón

<222> (1757)..(1887)

25 <220>

<221> CDS

<222> (1757)..(1887)

<400> 15

30

ES 2 608 402 T3

ctccgtcaag tgcgaagtat attgtaactt cgagatctac tcaatatcca cttttgctaa 60
aacgccacga agccaccaaa gcctccaccg ctataaggaa gctcggagct tctgcttcg 120
tcgcatgctg gagaaaggtt cattttttct tgctagtcat aaacttcttt actttgattt 180
cctttttttg taaaaaata tcttgctgtg aagaaaagca tcacagtctc agcaaaa 237
atg ggc tct aca tct cct gcc caa gcc tca ttg cct cgc gac ttc gaa 285
Met Gly Ser Thr Ser Pro Ala Gln Ala Ser Leu Pro Arg Asp Phe Glu
-25 -20 -15
tgg ggg ttt gcg aca gca tcc tat cag atc gaa gga gct gtc aat gaa 333
Trp Gly Phe Ala Thr Ala Ser Tyr Gln Ile Glu Gly Ala Val Asn Glu
-10 -5 -1 1
gat ggt cgc gga aag tca atc tgg gat acc ttc tgt cac ttg gag cca 381
Asp Gly Arg Gly Lys Ser Ile Trp Asp Thr Phe Cys His Leu Glu Pro
5 10 15 20
aca aga aca aag ggc gcc agt ggt gat gtt gca tgc gac cat tac cat 429
Thr Arg Thr Lys Gly Ala Ser Gly Asp Val Ala Cys Asp His Tyr His
25 30 35
cgc tac gag gaa gat ttt gat ctc tta tcc aaa tac ggc gcc aag gca 477
Arg Tyr Glu Glu Asp Phe Asp Leu Leu Ser Lys Tyr Gly Ala Lys Ala
40 45 50
tat cgt ttc tct atc tct tgg tgc aga att att cct gac ggt gga aga 525
Tyr Arg Phe Ser Ile Ser Trp Ser Arg Ile Ile Pro Asp Gly Gly Arg
55 60 65
gga gat gcc gtg aac gag cag gga atc gcg ttc tat aac cgg ctt att 573
Gly Asp Ala Val Asn Glu Gln Gly Ile Ala Phe Tyr Asn Arg Leu Ile
70 75 80
gac tct ctg ctt tct agg ggt att gta cct tgg gtg act tta tac cac 621
Asp Ser Leu Leu Ser Arg Gly Ile Val Pro Trp Val Thr Leu Tyr His
85 90 95 100
tgg gat ctg ccc caa agt ctt cac gac aga tat ggc gcc tgg ctg aat 669
Trp Asp Leu Pro Gln Ser Leu His Asp Arg Tyr Gly Gly Trp Leu Asn
105 110 115
gtg gag gag tca cag tta gat ttt gag cga tat gcc cgg atc tgc tat 717
Val Glu Glu Ser Gln Leu Asp Phe Glu Arg Tyr Ala Arg Ile Cys Tyr
120 125 130
gag cgc ttt gga gat cga gtc aag aac tgg att acc ctg aat gag ccg 765
Glu Arg Phe Gly Asp Arg Val Lys Asn Trp Ile Thr Leu Asn Glu Pro
135 140 145
tgg att gtt tca att ttt gtaagcattt tagttttctt cgctttcttg 813
Trp Ile Val Ser Ile Phe
150
tcctatcgaa gtggaagttg gagctgacat tctatag gga tat tca aca ggt gga 868
Gly Tyr Ser Thr Gly Gly
155 160

ES 2 608 402 T3

aac gcc cca gga aga agc agc gtc aat cct caa tct tct gag ggt aac 916
 Asn Ala Pro Gly Arg Ser Ser Val Asn Pro Gln Ser Ser Glu Gly Asn
 165 170 175

tct gcg aca gag ccc tgg ata gtc gga agg gct ctc atc cta agc cac 964
 Ser Ala Thr Glu Pro Trp Ile Val Gly Arg Ala Leu Ile Leu Ser His
 180 185 190

gcg cgc gcg gtc tca ctt tac aac aaa gaa ttc cga tca aca caa aag 1012
 Ala Arg Ala Val Ser Leu Tyr Asn Lys Glu Phe Arg Ser Thr Gln Lys
 195 200 205

gga aga att gga ata tct ctg aat gga gac ttt ttt gaa cct tgg gat 1060
 Gly Arg Ile Gly Ile Ser Leu Asn Gly Asp Phe Phe Glu Pro Trp Asp
 210 215 220

gcc caa gat gag cgt gat cgc gag gca gct gag aga aga atg gaa ttt 1108
 Ala Gln Asp Glu Arg Asp Arg Glu Ala Ala Glu Arg Arg Met Glu Phe
 225 230 235 240

cat att gga tgg ttt gcc aat ccg gtg tg gtacgtgta ttttcatcta 1157
 His Ile Gly Trp Phe Ala Asn Pro Val Cys
 245 250

tgtgttatta tacacaaaag ctaactctta tcgctccac gaaaaaag c ctc gca 1212
 Leu Ala

cag gac tat cca aag tgt atg aga gag cag ctg aat gac cgt cta ccc 1260
 Gln Asp Tyr Pro Lys Cys Met Arg Glu Gln Leu Asn Asp Arg Leu Pro
 255 260 265

aag ttc aca gac tcc gaa ttt acc ctg ctt cgc gaa gcc gat ata gac 1308
 Lys Phe Thr Asp Ser Glu Phe Thr Leu Leu Arg Glu Ala Asp Ile Asp
 270 275 280

ttc tac gga atg aat tat tac aca tct caa ttc gcc cgc cat cgc gac 1356
 Phe Tyr Gly Met Asn Tyr Tyr Thr Ser Gln Phe Ala Arg His Arg Asp
 285 290 295 300

gaa act cct tcc aag aat gat tat ttg gga aat gta gaa gaa ctc cag 1404
 Glu Thr Pro Ser Lys Asn Asp Tyr Leu Gly Asn Val Glu Glu Leu Gln
 305 310 315

gag aac aag gac ggc gtg tca gtc ggc gaa ccg tct ggg gtt cat tgg 1452
 Glu Asn Lys Asp Gly Val Ser Val Gly Glu Pro Ser Gly Val His Trp
 320 325 330

ctt cgg tcg acc cca aag ctg ttt aga aag cat ttg act cga att tac 1500
 Leu Arg Ser Thr Pro Lys Leu Phe Arg Lys His Leu Thr Arg Ile Tyr
 335 340 345

cgc aaa tat gga aaa ccc gtc tac gtt act gag aat ggc tgt ccc tgt 1548
 Arg Lys Tyr Gly Lys Pro Val Tyr Val Thr Glu Asn Gly Cys Pro Cys
 350 355 360

cca gga gag gag aag atg acc gtg act gag gca gtg aac gat aca tat 1596
 Pro Gly Glu Glu Lys Met Thr Val Thr Glu Ala Val Asn Asp Thr Tyr
 365 370 375 380

cga atc cgg tat ttc gaa gac cat atc gag gct ctt gcg ctg gca cgc 1644
 Arg Ile Arg Tyr Phe Glu Asp His Ile Glu Ala Leu Ala Leu Ala Arg
 385 390 395

agc gaa gat ggc tct gac att aag gga tac ttt gcc tgg tca ctg atg 1692

ES 2 608 402 T3

Ser Glu Asp Gly Ser Asp Ile Lys Gly Tyr Phe Ala Trp Ser Leu Met
 400 405 410

gat aat tta g gtatgtttcc gggactcgct attctgactc aagcaacaac 1742
 Asp Asn Leu
 415

5 tgacatcttc ttag aa tgg tct gat ggg tac gga gtt cgg ttt ggt gcc 1791
 Glu Trp Ser Asp Gly Tyr Gly Val Arg Phe Gly Ala
 420 425

act ttc act gac tat aat acc ctt gaa agg acc ccg aaa cag tct gca 1839
 Thr Phe Thr Asp Tyr Asn Thr Leu Glu Arg Thr Pro Lys Gln Ser Ala
 430 435 440

10 ttg ctc ttg aaa ggg att ttc gag aaa tac ata gag ccg agg aac tag 1887
 Leu Leu Leu Lys Gly Ile Phe Glu Lys Tyr Ile Glu Pro Arg Asn
 445 450 455

tacctaggaa caatattata gagtcaaatg tcacgaggct atatacctgt agaatgggaa 1947

ctagctccag cctcgtagat cttagaatac acgaaaaatg tcaaatgctc actagctact 2007

ccgtaaagtc ggggaacatg agtaagcagt tagtattagc gagcc 2052

15

<210> 16

<211> 486

<212> PRT

<213> Acremonium cellulolyticus

20

<400> 16

Met Gly Ser Thr Ser Pro Ala Gln Ala Ser Leu Pro Arg Asp Phe Glu
 -25 -20 -15

Trp Gly Phe Ala Thr Ala Ser Tyr Gln Ile Glu Gly Ala Val Asn Glu
 -10 -5 -1 1

Asp Gly Arg Gly Lys Ser Ile Trp Asp Thr Phe Cys His Leu Glu Pro
 5 10 15 20

Thr Arg Thr Lys Gly Ala Ser Gly Asp Val Ala Cys Asp His Tyr His
 25 30 35

Arg Tyr Glu Glu Asp Phe Asp Leu Leu Ser Lys Tyr Gly Ala Lys Ala
 40 45 50

Tyr Arg Phe Ser Ile Ser Trp Ser Arg Ile Ile Pro Asp Gly Gly Arg
 55 60 65

Gly Asp Ala Val Asn Glu Gln Gly Ile Ala Phe Tyr Asn Arg Leu Ile
 70 75 80

Asp Ser Leu Leu Ser Arg Gly Ile Val Pro Trp Val Thr Leu Tyr His
 85 90 95 100

ES 2 608 402 T3

Trp Asp Leu Pro Gln Ser Leu His Asp Arg Tyr Gly Gly Trp Leu Asn
 105 110 115

Val Glu Glu Ser Gln Leu Asp Phe Glu Arg Tyr Ala Arg Ile Cys Tyr
 120 125 130

Glu Arg Phe Gly Asp Arg Val Lys Asn Trp Ile Thr Leu Asn Glu Pro
 135 140 145

Trp Ile Val Ser Ile Phe Gly Tyr Ser Thr Gly Gly Asn Ala Pro Gly
 150 155 160

Arg Ser Ser Val Asn Pro Gln Ser Ser Glu Gly Asn Ser Ala Thr Glu
 165 170 175 180

Pro Trp Ile Val Gly Arg Ala Leu Ile Leu Ser His Ala Arg Ala Val
 185 190 195

Ser Leu Tyr Asn Lys Glu Phe Arg Ser Thr Gln Lys Gly Arg Ile Gly
 200 205 210

Ile Ser Leu Asn Gly Asp Phe Phe Glu Pro Trp Asp Ala Gln Asp Glu
 215 220 225

Arg Asp Arg Glu Ala Ala Glu Arg Arg Met Glu Phe His Ile Gly Trp
 230 235 240

Phe Ala Asn Pro Val Cys Leu Ala Gln Asp Tyr Pro Lys Cys Met Arg
 245 250 255 260

Glu Gln Leu Asn Asp Arg Leu Pro Lys Phe Thr Asp Ser Glu Phe Thr
 265 270 275

Leu Leu Arg Glu Ala Asp Ile Asp Phe Tyr Gly Met Asn Tyr Tyr Thr
 280 285 290

Ser Gln Phe Ala Arg His Arg Asp Glu Thr Pro Ser Lys Asn Asp Tyr
 295 300 305

Leu Gly Asn Val Glu Glu Leu Gln Glu Asn Lys Asp Gly Val Ser Val
 310 315 320

Gly Glu Pro Ser Gly Val His Trp Leu Arg Ser Thr Pro Lys Leu Phe
 325 330 335 340

Arg Lys His Leu Thr Arg Ile Tyr Arg Lys Tyr Gly Lys Pro Val Tyr
 345 350 355

Val Thr Glu Asn Gly Cys Pro Cys Pro Gly Glu Glu Lys Met Thr Val

ES 2 608 402 T3

		360						365						370			
		Thr	Glu	Ala	Val	Asn	Asp	Thr	Tyr	Arg	Ile	Arg	Tyr	Phe	Glu	Asp	His
				375					380					385			
5		Ile	Glu	Ala	Leu	Ala	Leu	Ala	Arg	Ser	Glu	Asp	Gly	Ser	Asp	Ile	Lys
			390					395					400				
		Gly	Tyr	Phe	Ala	Trp	Ser	Leu	Met	Asp	Asn	Leu	Glu	Trp	Ser	Asp	Gly
		405					410					415					420
10		Tyr	Gly	Val	Arg	Phe	Gly	Ala	Thr	Phe	Thr	Asp	Tyr	Asn	Thr	Leu	Glu
						425					430					435	
		Arg	Thr	Pro	Lys	Gln	Ser	Ala	Leu	Leu	Leu	Lys	Gly	Ile	Phe	Glu	Lys
					440					445						450	
15		Tyr	Ile	Glu	Pro	Arg	Asn										
				455													

<210> 17
 <211> 1931
 <212> ADN
 20 <213> Acremonium cellulolyticus
 <220>
 <221> sig_peptide
 <222> (66)..(227)
 25 <220>
 <221> exón
 <222> (66)..(148)
 30 <220>
 <221> CDS
 <222> (66)..(148)
 <220>
 35 <221> Intrón

ES 2 608 402 T3

<222> (149)..(211)

<220>

<221> exón

5 <222> (212)..(403)

<220>

<221> CDS

<222> (212)..(403)

10

<220>

<221> mat_peptide

<222> join (228..403, 461..933, 989..1574, 1627..1762)

15

<220>

<221> Intrón

<222> (404)..(460)

<220>

20

<221> exón

<222> (461)..(933)

<220>

<221> CDS

25

<222> (461)..(933)

<220>

<221> Intrón

<222> (934)..(988)

30

<220>

<221> exón

<222> (989)..(1574)

35

<220>

ES 2 608 402 T3

<221> CDS

<222> (989)..(1574)

<220>

5 <221> Intrón

<222> (1575)..(1626)

<220>

<221> exón

10 <222> (1627)..(1765)

<220>

<221> CDS

<222> (1627)..(1765)

15

<400> 17

```

ttctctcact ttccctttcc atccgcttac cgagtcgcag aatcacatcc aacacatctc      60
cgagt atg ggt agc gta act agt acc aac ggc gag act ccc cag tcc aaa      110
  Met Gly Ser Val Thr Ser Thr Asn Gly Glu Thr Pro Gln Ser Lys
      -30                      -25                      -20
ctg ccg gca gac ttt gtc tgg gga tac gca acg gcc ag  gtgagattac      158
Leu Pro Ala Asp Phe Val Trp Gly Tyr Ala Thr Ala Ser
      -15                      -10
tcgctattca tgtgtgtaga agaaacctat ttaccgtctt gttttggttc tag c tac      215
                                     Tyr
                                     -5
cag atc gaa gga gcg tat gac gaa gac ggc cga gga cct tcc atc tgg      263
Gln Ile Glu Gly Ala Tyr Asp Glu Asp Gly Arg Gly Pro Ser Ile Trp
      -1  1                      5                      10
gat aca ttc agc aag aca cct gga aaa gta gag gat ggc acc aat ggc      311
Asp Thr Phe Ser Lys Thr Pro Gly Lys Val Glu Asp Gly Thr Asn Gly
      15                      20                      25
gac gtg gcc tgc gac tcc tac cac cgt aca cat gag gat att gcg att      359
Asp Val Ala Cys Asp Ser Tyr His Arg Thr His Glu Asp Ile Ala Ile
      30                      35                      40
ctg aag caa tat ggt gcc aag ctg tac cgc ttt tct ctg tcc tg      403
Leu Lys Gln Tyr Gly Ala Lys Leu Tyr Arg Phe Ser Leu Ser Trp
      45                      50                      55
gtatagctcc cttcggcttc ttgcgccaga atataactga cagtattgat aatcaag g      461
    
```


ES 2 608 402 T3

ccc cga atc att cct cta ggt ggc cga aac gac ccc atc aac caa aag 509
 Pro Arg Ile Ile Pro Leu Gly Gly Arg Asn Asp Pro Ile Asn Gln Lys
 60 65 70 75

gga ata gac ttt tac tcc aaa ttc atc gac gat ctc cac gcc gct gga 557
 Gly Ile Asp Phe Tyr Ser Lys Phe Ile Asp Asp Leu His Ala Ala Gly
 80 85 90

atc gag ccc ttc gtc acc ttg tac cac tgg gat ctt ccc gac gag ctg 605
 Ile Glu Pro Phe Val Thr Leu Tyr His Trp Asp Leu Pro Asp Glu Leu
 95 100 105

ttc aag aga tac ggc ggc ccc ctc aac aag gac gaa ttc gtg gct gac 653
 Phe Lys Arg Tyr Gly Gly Pro Leu Asn Lys Asp Glu Phe Val Ala Asp
 110 115 120

tat gcg aac ttc gcc cgc atc gca ttc cag agc ttt gga cac aaa gtc 701
 Tyr Ala Asn Phe Ala Arg Ile Ala Phe Gln Ser Phe Gly His Lys Val
 125 130 135

aag cat tgg gtt acc ttc aat gaa cca tgg tgt agc tcc gtg ctc ggt 749
 Lys His Trp Val Thr Phe Asn Glu Pro Trp Cys Ser Ser Val Leu Gly
 140 145 150 155

ttc aat atc ggt aag cat gcg cca gga cgg acg agc gat cgc aag aag 797
 Phe Asn Ile Gly Lys His Ala Pro Gly Arg Thr Ser Asp Arg Lys Lys
 160 165 170

aac ccg gtt ggt gat ggt gtg cgt gag cca tgg att gct ggt cat tcc 845
 Asn Pro Val Gly Asp Gly Val Arg Glu Pro Trp Ile Ala Gly His Ser
 175 180 185

ctt ttg gtg gct cac ggc acg gct gtt gat atc tac cgg aag gaa ttt 893
 Leu Leu Val Ala His Gly Thr Ala Val Asp Ile Tyr Arg Lys Glu Phe
 190 195 200

aag cct aca cag ggc gga gaa att ggc att aca ctc aat g gttagatcga 943
 Lys Pro Thr Gln Gly Gly Glu Ile Gly Ile Thr Leu Asn
 205 210 215

aatattcccc aacgcatgac aatcatgogc taatatgaat tcaag gt gac tgg gcc 999
 Gly Asp Trp Ala
 220

gaa ccc tgg gac ccc gaa gac cca gaa gac att gaa gcc ccc acc cgc 1047
 Glu Pro Trp Asp Pro Glu Asp Pro Glu Asp Ile Glu Ala Pro Thr Arg
 225 230 235

aaa ctc gaa ttc gcc atc tcc tgg ttt gca gac ccc atc tac ctt ggc 1095
 Lys Leu Glu Phe Ala Ile Ser Trp Phe Ala Asp Pro Ile Tyr Leu Gly
 240 245 250

aaa tac ccc gac agc gtc gtg aaa caa atc ggc gac cgt ctc cca ccc 1143
 Lys Tyr Pro Asp Ser Val Val Lys Gln Ile Gly Asp Arg Leu Pro Pro
 255 260 265

ttg aca ccc gat gaa gta gcc ttg atc aag gga agc aac gac ttt tac 1191
 Leu Thr Pro Asp Glu Val Ala Leu Ile Lys Gly Ser Asn Asp Phe Tyr
 270 275 280

ggc atg aac cac tac tgc gca aac tac atc cgt cac cga gaa ggt gaa 1239
 Gly Met Asn His Tyr Cys Ala Asn Tyr Ile Arg His Arg Glu Gly Glu
 285 290 295 300

gcg gat cca gac gac aca gcc gga aac ttg gac cat ttg ttt gag gat 1287

ES 2 608 402 T3

	Ala	Asp	Pro	Asp	Asp	Thr	Ala	Gly	Asn	Leu	Asp	His	Leu	Phe	Glu	Asp	
				305						310					315		
	aaa	ttc	gga	aac	tcg	att	gga	ccc	gag	acg	aat	tgt	gaa	tgg	ctt	cgc	1335
	Lys	Phe	Gly	Asn	Ser	Ile	Gly	Pro	Glu	Thr	Asn	Cys	Glu	Trp	Leu	Arg	
				320					325					330			
5	cct	cat	ccc	ttg	gga	ttc	agg	aag	ttg	ttg	aaa	tgg	ctt	tcg	gat	cgt	1383
	Pro	His	Pro	Leu	Gly	Phe	Arg	Lys	Leu	Leu	Lys	Trp	Leu	Ser	Asp	Arg	
			335					340					345				
	tat	ggt	tat	ccc	aaa	atc	tat	gtt	acg	gag	aac	ggg	acg	agt	atc	aag	1431
	Tyr	Gly	Tyr	Pro	Lys	Ile	Tyr	Val	Thr	Glu	Asn	Gly	Thr	Ser	Ile	Lys	
		350					355					360					
	ggc	gag	aac	gac	ttg	cca	cta	gag	gaa	ctc	ctc	aat	gat	gag	ttt	agg	1479
	Gly	Glu	Asn	Asp	Leu	Pro	Leu	Glu	Glu	Leu	Leu	Asn	Asp	Glu	Phe	Arg	
	365					370					375					380	
10	gtg	cag	tat	tac	cgg	gat	tat	gtc	ggt	gcc	atg	gct	gat	gct	gct	act	1527
	Val	Gln	Tyr	Tyr	Arg	Asp	Tyr	Val	Gly	Ala	Met	Ala	Asp	Ala	Ala	Thr	
					385					390						395	
	ttt	gac	gga	gtc	aat	gtt	aag	aaa	tat	atg	gcc	tgg	agt	ttg	atg	ga	1574
	Phe	Asp	Gly	Val	Asn	Val	Lys	Lys	Tyr	Met	Ala	Trp	Ser	Leu	Met	Asp	
				400					405					410			
	gtaagtcaaa acatcaccta ttcggaaga cttctgctaa tcgctctatt ag t aac															1630	
																Asn	
15	ttc	gag	tgg	tcc	gaa	ggt	tac	caa	tcc	aga	ttt	ggt	gtc	aca	tac	gtc	1678
	Phe	Glu	Trp	Ser	Glu	Gly	Tyr	Gln	Ser	Arg	Phe	Gly	Val	Thr	Tyr	Val	
													425				
	gac	tac	aag	gac	aac	cag	aaa	cgt	atc	ccc	aag	aag	agt	gcc	ctc	gtc	1726
	Asp	Tyr	Lys	Asp	Asn	Gln	Lys	Arg	Ile	Pro	Lys	Lys	Ser	Ala	Leu	Val	
	430					435					440					445	
20	att	gga	gaa	ttg	ttc	aac	aaa	tac	atc	tcg	aaa	gag	tag	aca	atttct	1775	
	Ile	Gly	Glu	Leu	Phe	Asn	Lys	Tyr	Ile	Ser	Lys	Glu					
					450						455						
	cgaattttat gttttatata ctatacacta tgtaaatagt gatccatcat ttttgtactt															1835	
	gttgagtttt tgtcttgata ttctccttg gtgtgtagat ttttaacaaac tgcaatcata															1895	
	tcacgctcgc tttggcccgc atcaggagca tcaatt															1931	

25 <210> 18

<211> 490

<212> PRT

<213> Acremonium cellulolyticus

30 <400> 18

Met Gly Ser Val Thr Ser Thr Asn Gly Glu Thr Pro Gln Ser Lys Leu
 -30 -25 -20

Pro Ala Asp Phe Val Trp Gly Tyr Ala Thr Ala Ser Tyr Gln Ile Glu
 -15 -10 -5

ES 2 608 402 T3

Gly Ala Tyr Asp Glu Asp Gly Arg Gly Pro Ser Ile Trp Asp Thr Phe
-1 1 5 10 15

Ser Lys Thr Pro Gly Lys Val Glu Asp Gly Thr Asn Gly Asp Val Ala
20 25 30

Cys Asp Ser Tyr His Arg Thr His Glu Asp Ile Ala Ile Leu Lys Gln
35 40 45

Tyr Gly Ala Lys Leu Tyr Arg Phe Ser Leu Ser Trp Pro Arg Ile Ile
50 55 60

Pro Leu Gly Gly Arg Asn Asp Pro Ile Asn Gln Lys Gly Ile Asp Phe
65 70 75

Tyr Ser Lys Phe Ile Asp Asp Leu His Ala Ala Gly Ile Glu Pro Phe
80 85 90 95

Val Thr Leu Tyr His Trp Asp Leu Pro Asp Glu Leu Phe Lys Arg Tyr
100 105 110

Gly Gly Pro Leu Asn Lys Asp Glu Phe Val Ala Asp Tyr Ala Asn Phe
115 120 125

Ala Arg Ile Ala Phe Gln Ser Phe Gly His Lys Val Lys His Trp Val
130 135 140

Thr Phe Asn Glu Pro Trp Cys Ser Ser Val Leu Gly Phe Asn Ile Gly
145 150 155

Lys His Ala Pro Gly Arg Thr Ser Asp Arg Lys Lys Asn Pro Val Gly
160 165 170 175

Asp Gly Val Arg Glu Pro Trp Ile Ala Gly His Ser Leu Leu Val Ala
180 185 190

His Gly Thr Ala Val Asp Ile Tyr Arg Lys Glu Phe Lys Pro Thr Gln
195 200 205

Gly Gly Glu Ile Gly Ile Thr Leu Asn Gly Asp Trp Ala Glu Pro Trp
210 215 220

Asp Pro Glu Asp Pro Glu Asp Ile Glu Ala Pro Thr Arg Lys Leu Glu
225 230 235

Phe Ala Ile Ser Trp Phe Ala Asp Pro Ile Tyr Leu Gly Lys Tyr Pro
240 245 250 255

Asp Ser Val Val Lys Gln Ile Gly Asp Arg Leu Pro Pro Leu Thr Pro

ES 2 608 402 T3

				260					265					270		
	Asp	Glu	Val	Ala	Leu	Ile	Lys	Gly	Ser	Asn	Asp	Phe	Tyr	Gly	Met	Asn
				275					280					285		
5	His	Tyr	Cys	Ala	Asn	Tyr	Ile	Arg	His	Arg	Glu	Gly	Glu	Ala	Asp	Pro
			290					295					300			
	Asp	Asp	Thr	Ala	Gly	Asn	Leu	Asp	His	Leu	Phe	Glu	Asp	Lys	Phe	Gly
		305					310					315				
10	Asn	Ser	Ile	Gly	Pro	Glu	Thr	Asn	Cys	Glu	Trp	Leu	Arg	Pro	His	Pro
	320					325					330					335
	Leu	Gly	Phe	Arg	Lys	Leu	Leu	Lys	Trp	Leu	Ser	Asp	Arg	Tyr	Gly	Tyr
				340						345					350	
15	Pro	Lys	Ile	Tyr	Val	Thr	Glu	Asn	Gly	Thr	Ser	Ile	Lys	Gly	Glu	Asn
				355					360					365		
	Asp	Leu	Pro	Leu	Glu	Glu	Leu	Leu	Asn	Asp	Glu	Phe	Arg	Val	Gln	Tyr
			370						375				380			
20	Tyr	Arg	Asp	Tyr	Val	Gly	Ala	Met	Ala	Asp	Ala	Ala	Thr	Phe	Asp	Gly
		385					390					395				
	Val	Asn	Val	Lys	Lys	Tyr	Met	Ala	Trp	Ser	Leu	Met	Asp	Asn	Phe	Glu
	400					405					410					415
	Trp	Ser	Glu	Gly	Tyr	Gln	Ser	Arg	Phe	Gly	Val	Thr	Tyr	Val	Asp	Tyr
				420						425					430	
25	Lys	Asp	Asn	Gln	Lys	Arg	Ile	Pro	Lys	Lys	Ser	Ala	Leu	Val	Ile	Gly
			435						440					445		
	Glu	Leu	Phe	Asn	Lys	Tyr	Ile	Ser	Lys	Glu						
			450					455								

30 <210> 19

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

35 <220>

<223> cebador: ACC3-F

<400> 19

gggcgtctgt rtygartgt 20

5

<210> 20

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

10

<220>

<223> cebador: ACC3-R

<400> 20

15

aaaatgtagt ctccccacca 20

<210> 21

<211> 20

<212> ADN

20

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador: ACC3-inv-F

25

<400> 21

actccagac ttctgtcc 20

<210> 22

<211> 20

30

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador: ACC3-inv-R

35

<400> 22

aggccgagag taagtatctc 20

<210> 23

5 <211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> cebador: pACC3-F

<400> 23

gaaggatggt agattgtccg 20

15 <210> 24

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

20 <220>

<223> cebador: pACC3-R

<400> 24

accgagaagg atttctcgca 20

25

<210> 25

<211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

30

<220>

<223> cebador: ACC3-N

<400> 25

35 atgaagacca gcatcatttc tatc 24

<210> 26

<211> 24

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador: ACC3-C

10 <400> 26

tcatgggaaa taactctcca gaat 24

<210> 27

<211> 29

15 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador: ACC5-F

20

<220>

<221> misc_feature

<222> (18)..(18)

<223> "n" representa cualquier base

25

<220>

<221> misc_feature

<222> (27)..(27)

<223> "n" representa cualquier base

30

<400> 27

cagcaggccc ccacccnga yaaytngc 29

<210> 28

35 <211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

5 <223> cebador: ACC5-R

<400> 28

aattcgcggc cgctaaaaaa aaa 23

10 <210> 29

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> cebador: ACC5-inv-F

<400> 29

atctcacctg caacctacga 20

20

<210> 30

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

25

<220>

<223> cebador: ACC5-INV-R

<400> 30

30 cctctccgt tccacataaa 20

<210> 31

<211> 20

<212> ADN

35 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador: pACC5-F

5 <400> 31

attgctccgc ataggttcaa 20

<210> 32

<211> 20

10 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador: pACC5-R

15

<400> 32

ttcagagtta gtgcctccag 20

<210> 33

20 <211> 25

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

25 <223> cebador: ACC5-N

<400> 33

atggcgacta gaccattggc ttttg 25

30 <210> 34

<211> 25

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

35 <220>

<223> cebador: ACC5-C

<400> 34

ctaaaggcac tgtgaatagt acgga 25

5

<210> 35

<211> 26

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

10

<220>

<223> cebador: ACC6-F

<400> 35

15

gtgaacatcg ccggcttyga ytygg 26

<210> 36

<211> 23

<212> ADN

20

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador: ACC6-R

25

<400> 36

ccgtccacc gggcrtartt rtg 23

<210> 37

<211> 20

30

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador: pACC6-F

35

<400> 37

ctctgcattg aatcccgaga 20

<210> 38

5 <211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> cebador: pACC6-R

<400> 38

gcaacgctaa agtgctcatc 20

15 <210> 39

<211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

20 <220>

<223> cebador: ACC6-N

<400> 39

atgacaatca tctcaaaatt cggc 24

25

<210> 40

<211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

30

<220>

<223> cebador: ACC6-C

<400> 40

35 tcaggatttc cactttggaa cgaa 24

<210> 41

<211> 28

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador: ACC7-F

10 <220>

<221> misc_feature

<222> (18)..(18)

<223> "n" representa cualquier base

15 <400> 41

cacgccatga tcgaccnca yaaytayg 28

<210> 42

<211> 22

20 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador: ACC7-R

25

<220>

<221> misc_feature

<222> (14)..(14)

<223> "n" representa cualquier base

30

<400> 42

accaggggcc ggcngyccac ca 22

<210> 43

35 <211> 20

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

5 <223> cebador: pACC7-F

<400> 43

cagtcagttg tgtagacacg 20

10 <210> 44

<211> 20

<212> ADN

<213> Artificial

15 <220>

<223> cebador: pACC7-R

<400> 44

actcagctgg gtcttcatag 20

20

<210> 45

<211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

25

<220>

<223> cebador: ACC7-N

<400> 45

30 atgaggtcta catcaacatt tgta 24

<210> 46

<211> 24

<212> ADN

35 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador: ACC7-C

5 <400> 46

ctaaggggtg taggcctgca ggat 24

<210> 47

<211> 39

10 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador: MSW-N

15

<400> 47

caacagagtc tatgcgctca atactcgagc tacaccagt 39

<210> 48

20 <211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

25 <223> cebador: MSW-C

<400> 48

ctaattgaca gctgcagacc aa 22

30 <210> 49

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

35 <220>

ES 2 608 402 T3

<223> cebador: pACC8-F

<400> 49

aaagaccgcg tgtaggatc 20

5

<210> 50

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

10

<220>

<223> cebador: pACC8-R

<400> 50

15

cgcgtaggaa ataagacacc 20

<210> 51

<211> 24

<212> ADN

20

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador: ACC8-N

25

<400> 51

atgaagctaa ctttctcct gaac 24

<210> 52

<211> 24

30

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador: ACC8-C

35

<400> 52

ctaattgaca gatgcagacc aatg 24

<210> 53

5 <211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> cebador: ACC9-F

<400> 53

ccggctgcgg caartgytay ma 22

15 <210> 54

<211> 31

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

20 <220>

<223> cebador: ACC9-R

<220>

<221> misc_feature

25 <222> (26)..(26)

<223> "n" representa cualquier base

<220>

<221> misc_feature

30 <222> (29)..(29)

<223> "n" representa cualquier base

<400> 54

agtaccactg gtctgcacc ttrcangtns c 31

35

ES 2 608 402 T3

<210> 55

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

5

<220>

<223> cebador: ACC9-inv-F

<400> 55

10 cgaagtgttt ggtgacaacg 20

<210> 56

<211> 20

<212> ADN

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador: ACC9-INV-R

20 <400> 56

gtggtagctg tatccgtagt 20

<210> 57

<211> 20

25 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador: pACC9-F

30

<400> 57

tacattccga aggcacagtt 20

<210> 58

35 <211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

5 <223> cebador: pACC9-R

<400> 58

ctgagctgat taccctgacc 20

10 <210> 59

<211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> cebador: ACC9-N

<400> 59

atgaaggctt tctatcttc tctc 24

20

<210> 60

<211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

25

<220>

<223> cebador: ACC9-C

<400> 60

30 ttaggacgag ctgacgcact ggta 24

<210> 61

<211> 27

<212> ADN

35 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador: ACC10-F

5 <220>

<221> misc_feature

<222> (22)..(22)

<223> "n" representa cualquier base

10 <220>

<221> misc_feature

<222> (25)..(25)

<223> "n" representa cualquier base

15 <400> 61

gggtgacgtg ggcaccaayg gnmnggg 27

<210> 62

<211> 23

20 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador: ACC10-R

25

<400> 62

aattcgcggc cgctaaaaaa aaa 23

<210> 63

30 <211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

35 <223> cebador: ACC10-inv-F

ES 2 608 402 T3

<400> 63

ttctgctact gcggttgcta 20

5 <210> 64

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

10 <220>

<223> cebador: ACC10-INV-R

<400> 64

gaataacgta ggtcgacaag 20

15

<210> 65

<211> 19

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

20

<220>

<223> cebador: pACC10-F

<400> 65

25 cgttgaccga aagccactt 19

<210> 66

<211> 20

<212> ADN

30 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador: pACC10-R

35 <400> 66

tggcctaaag ctaaagatg 20

<210> 67

<211> 25

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador: ACC10-N

10

<400> 67

atgccttcta ctaaagtcgc tgccc 25

<210> 68

15 <211> 25

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

20 <223> cebador: ACC10-C

<400> 68

ttaaaggaca gtagtggtga tgacg 25

25 <210> 69

<211> 28

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

30 <220>

<223> cebador: BGLC-F

<400> 69

cctgggtgac cctgtaccay tgggayt 28

35

<210> 70

<211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

5

<220>

<223> cebador: BGLC-R

<220>

10 <221> misc_feature

<222> (22)..(22)

<223> "n" representa cualquier base

<400> 70

15 tgggcaggag cagccrwwyt cngt 24

<210> 71

<211> 20

<212> ADN

20 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador: BGLC-inv-F

25 <400> 71

ggagtcttc tacattccc 20

<210> 72

<211> 20

30 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador: BGLC-INV-R

35

<400> 72

aacaaggacg gcgtgtcagt 20

<210> 73

5 <211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> cebador: pBGLC-F

<400> 73

ctccgtcaag tgccaagtat 20

15 <210> 74

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

20 <220>

<223> cebador: pBGLC-R

<400> 74

ggctcgctaa tactaactgc 20

25

<210> 75

<211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

30

<220>

<223> cebador: BGLC-N

<400> 75

35 atgggctcta catctcctgc ccaa 24

<210> 76

<211> 24

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador: BGLC-C

10 <400> 76

ctagttcctc ggctctatgt attt 24

<210> 77

<211> 24

15 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador: BGLD-F

20

<220>

<221> misc_feature

<222> (19)..(19)

<223> "n" representa cualquier base

25

<400> 77

caccgccgcc taccarrtng argg 24

<210> 78

30 <211> 31

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

35 <223> cebador: BGLD-R

<400> 78

tggcggtgta gtggtcatg scrwarwart c 31

5 <210> 79

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

10 <220>

<223> cebador: BGLD-inv-F

<400> 79

cggttcaat atcgtaagc 20

15

<210> 80

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

20

<220>

<223> cebador: BGLD-inv-R

<400> 80

25 ggtccaaag ctctggaatg 20

<210> 81

<211> 20

<212> ADN

30 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador: pBGLD-F

35 <400> 81

ttctctcact ttccctttcc 20

<210> 82

<211> 20

5

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador: pBGLD-R

10

<400> 82

aattgatgct cctgatgctgg 20

<210> 83

15

<211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

20

<223> cebador: BGLD-N

<400> 83

atgggtagcg taactagtac caac 24

25

<210> 84

<211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

30

<220>

<223> cebador: BGLD-C

<400> 84

ctactcttc gagatgtatt tgtt 24.

35

REIVINDICACIONES

1. Una proteína que comprende los aminoácidos 1-301 de la SEC ID N°: 14.
2. Proteína según la reivindicación 1, en la que la proteína se deriva de un hongo filamentoso.
3. Proteína según la reivindicación 2, en la que el hongo filamentoso es *Acremonium cellulolyticus*.
- 5 4. Un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
5. Polinucleótido según la reivindicación 4, que es un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N°: 13.
6. Polinucleótido según la reivindicación 4, que es un ADN seleccionado de entre:
 - 10 (i) un ADN que codifica la proteína según la reivindicación 1; y
 - (ii) un ADN que comprende los nucleótidos 124-1143 de la SEC ID N°: 13.
7. ADN en el que una secuencia de intrón se elimina del ADN según la reivindicación 6.
8. ADN según la reivindicación 7, en el que la secuencia de intrón son los nucleótidos 225-275 de la SEC ID N°: 13.
9. ADN en el que una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia señal es eliminada del ADN según una cualquiera de las reivindicaciones 5-8.
- 15 10. ADN según la reivindicación 9, en el que la secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia señal son los nucleótidos 124-186 de la SEC ID N°: 13.
11. Un vector de expresión, que comprende el ADN según una cualquiera de las reivindicaciones 4-10.
12. Una célula huésped transformada con el vector de expresión según la reivindicación 11.
- 20 13. Célula huésped según la reivindicación 12, en la que la célula huésped es una levadura o un hongo filamentoso.
14. Célula huésped según la reivindicación 13, en la que la levadura es un microorganismo perteneciente al género *Saccharomyces*, *Hansenula* o *Pichia*.
15. Célula huésped según la reivindicación 14, en la que la levadura es *Saccharomyces cerevisiae*.
- 25 16. Célula huésped según la reivindicación 13, en la que el hongo filamentoso es un microorganismo perteneciente al género *Humicola*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Fusarium* o *Acremonium*.
17. Célula huésped según la reivindicación 16, en la que el hongo filamentoso es *Acremonium cellulolyticus*, *Humicola insolens*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Trichoderma viride* o *Fusarium oxysporum*.
18. Un hongo filamentoso perteneciente al género *Acremonium*, que es deficiente en un gen que corresponde al ADN según una cualquiera de las reivindicaciones 4-10 por recombinación homóloga.
- 30 19. Hongo filamentoso según la reivindicación 18, en el que el hongo filamentoso es *Acremonium cellulolyticus*.
20. Un procedimiento de producción de la proteína según la reivindicación 1, que comprende
 - cultivar las células huésped según una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 17; y
 - recoger la proteína de las células huésped y/o su cultivo.
21. Una proteína producida mediante el procedimiento según la reivindicación 20.
- 35 22. Una preparación de celulasa que comprende la proteína según la reivindicación 1 o 21.
23. Un procedimiento de sacarificación de biomasa, que comprende poner en contacto una biomasa que contiene celulosa con la proteína según la reivindicación 1 o 21 o la preparación de celulasa según la reivindicación 22.
24. Un procedimiento de tratamiento de un tejido que contiene celulosa, que comprende
 - poner en contacto el tejido que contiene celulosa con la proteína según la reivindicación 1 o 21 o la preparación de

celulasa según la reivindicación 22.

25. Un procedimiento de destintado de papelote, **caracterizado por** el uso de la proteína según la reivindicación 1 o 21 o la preparación de celulasa según la reivindicación 22, en el procedimiento de tratamiento del papelote junto con un agente de destintado.

5 26. Un procedimiento para mejorar un drenaje de agua de la pasta de papel, que comprende
tratar la pasta de papel con la proteína según la reivindicación 1 o 21 o la preparación de celulasa según la reivindicación 22.

27. Un procedimiento para mejorar una digestibilidad de un pienso, que comprende
tratar el pienso con la proteína según la reivindicación 1 o 21 o la preparación de celulasa según la reivindicación 22.

10

Figura 1

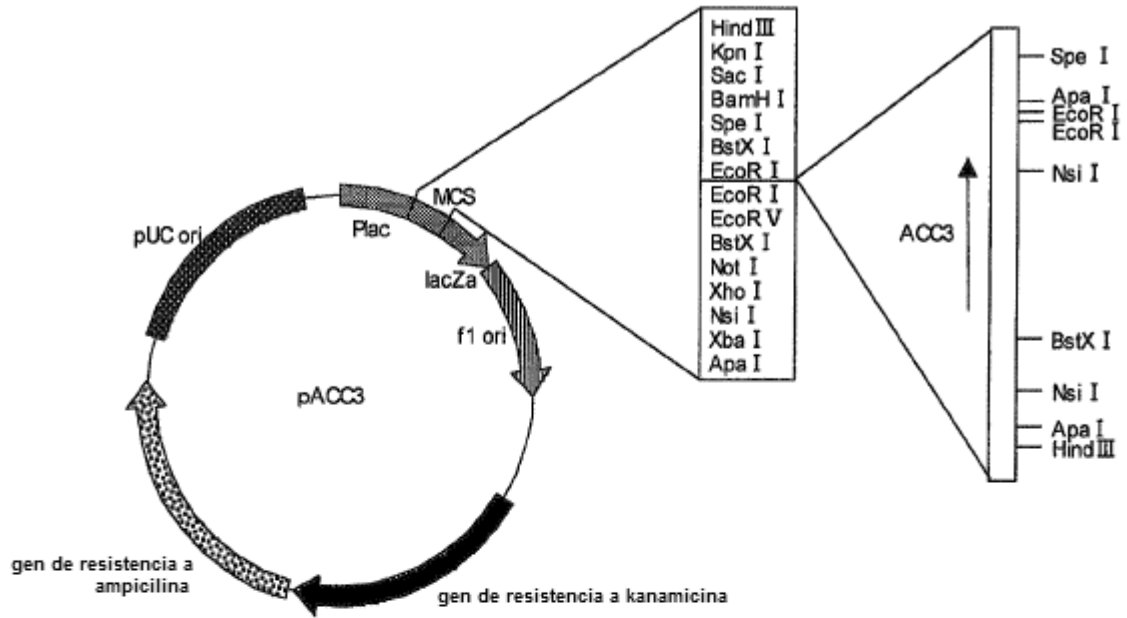


Figura 2

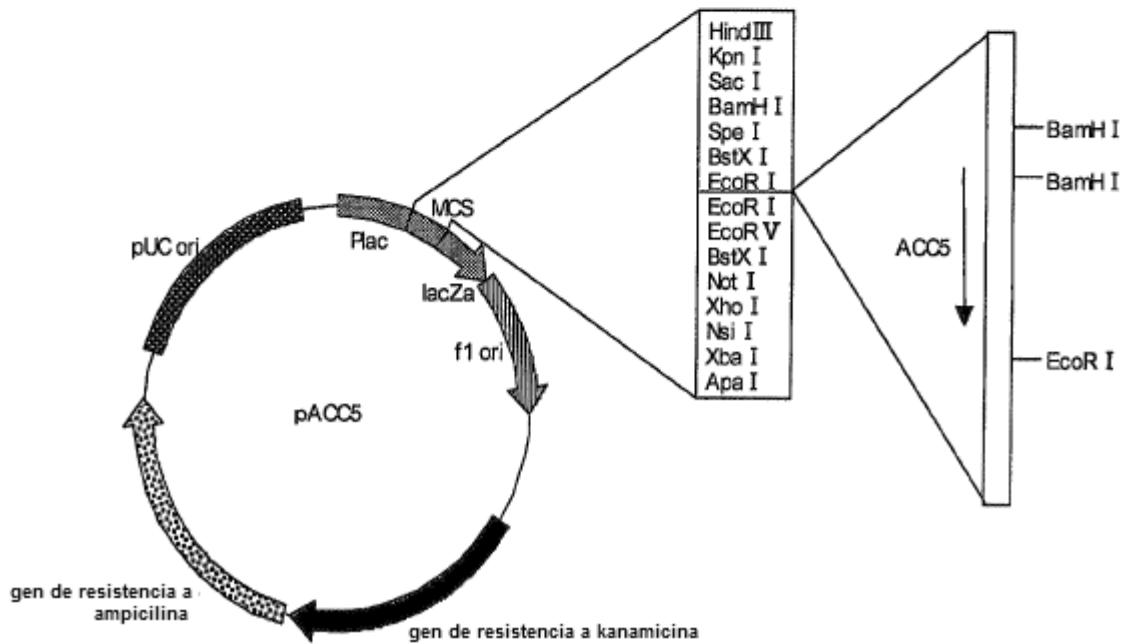


Figura 3

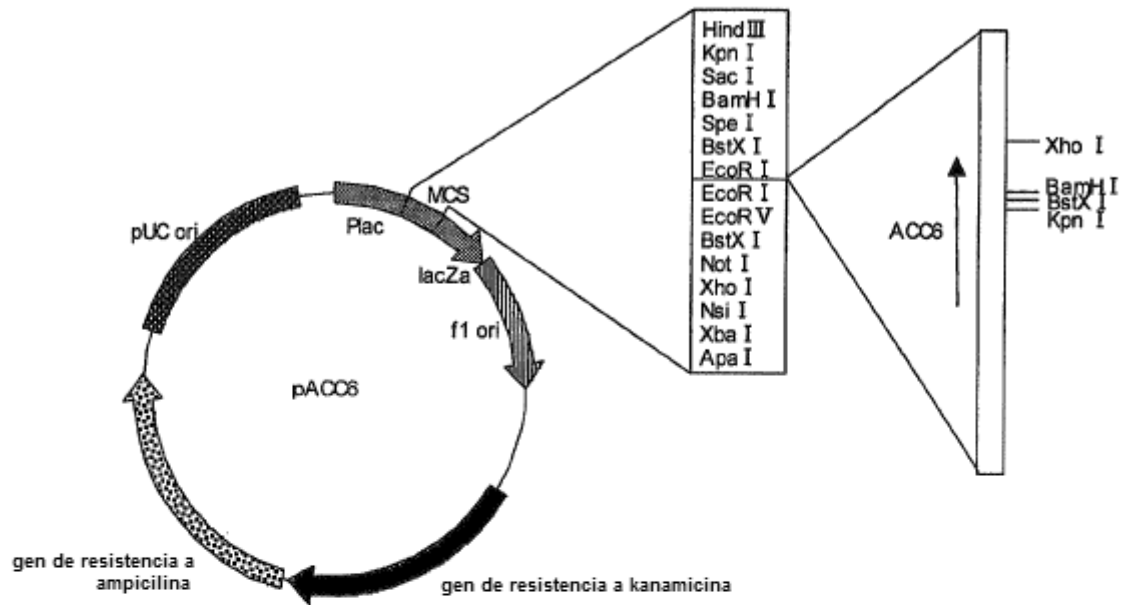


Figura 4

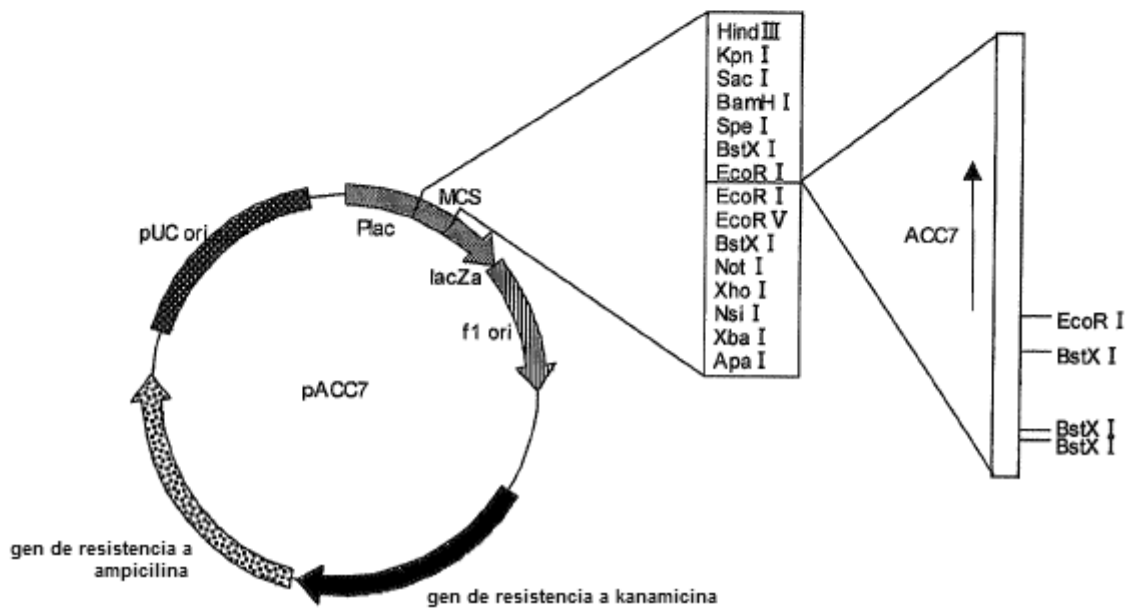


Figura 5

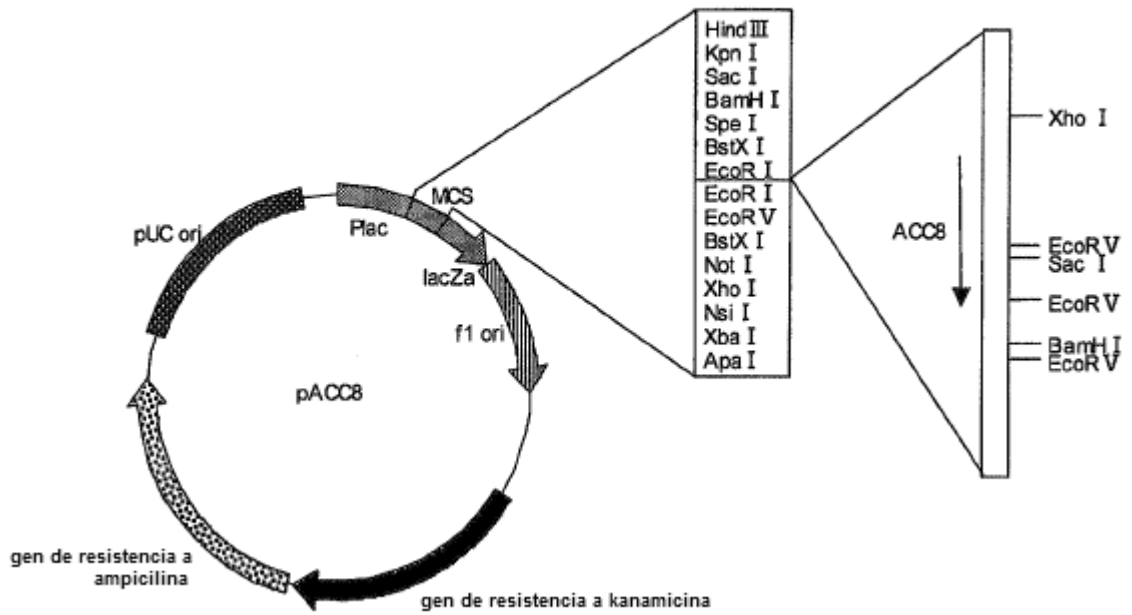


Figura 6

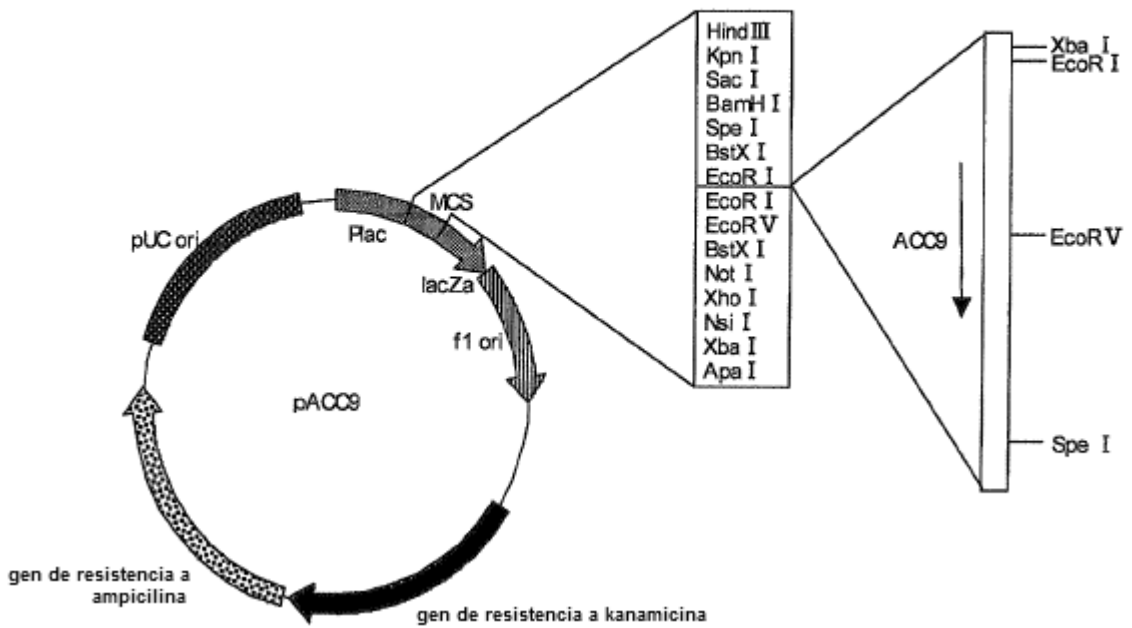


Figura 7

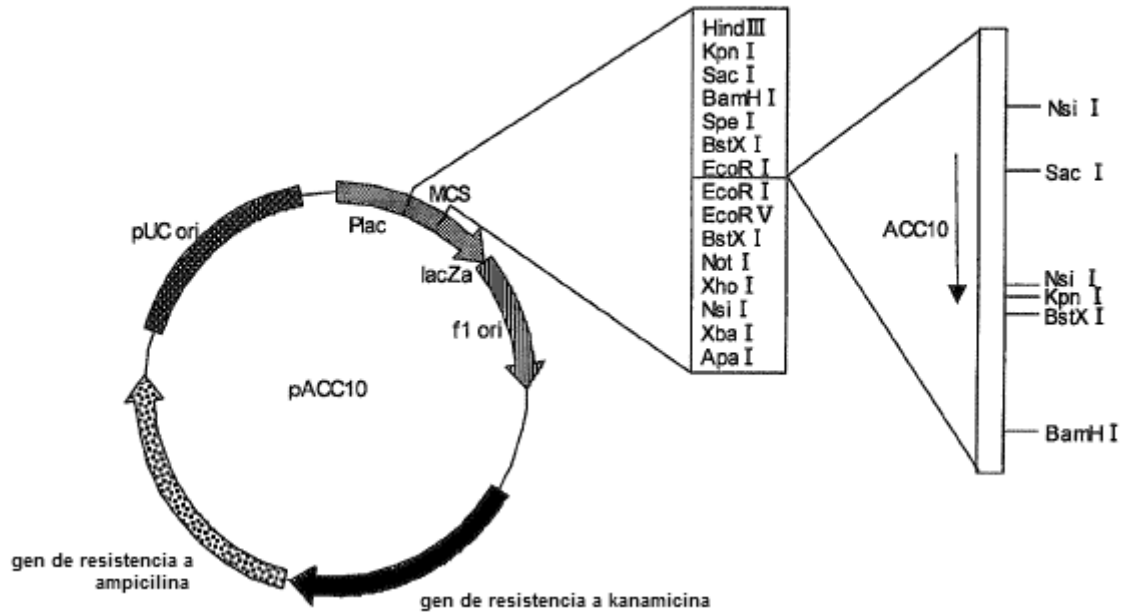


Figura 8

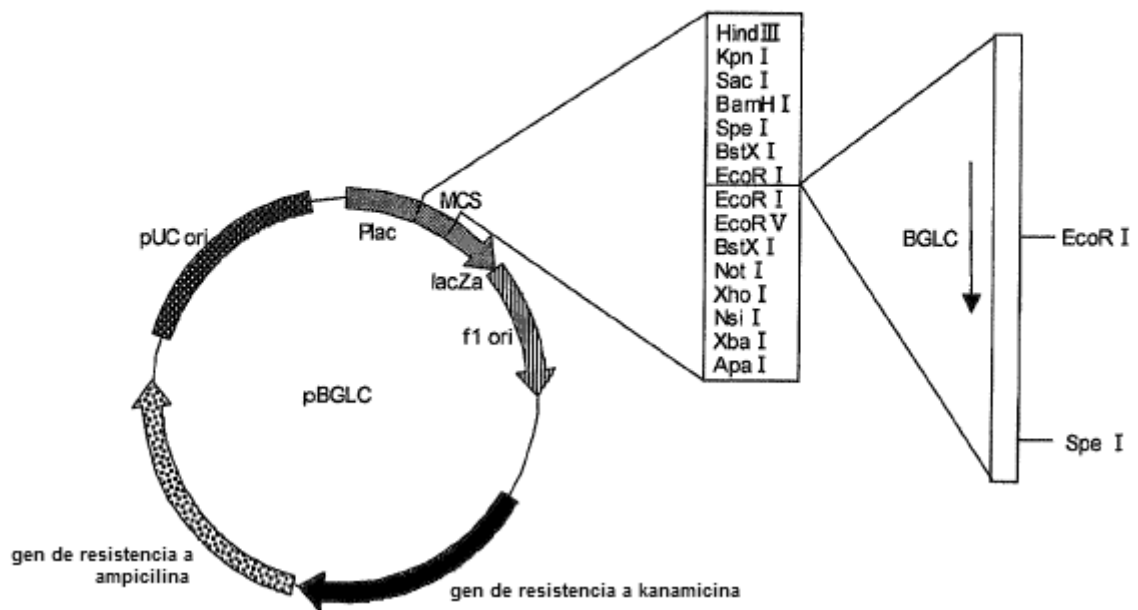


Figura 9

