

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 637 008**

51 Int. Cl.:

**C12N 9/42** (2006.01)

**C12N 15/62** (2006.01)

**C12N 15/56** (2006.01)

**D06M 16/00** (2006.01)

**C11D 3/386** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.12.2006 PCT/FI2006/050560**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.07.2017 WO07071820**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.12.2006 E 06830937 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.07.2017 EP 1969123**

54 Título: **Enzimas nuevas**

30 Prioridad:

**22.12.2005 FI 20055692**

**22.12.2005 US 316397**

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

**10.10.2017**

73 Titular/es:

**AB ENZYMES OY (100.0%)**

**Tykkimäentie 15b**

**05200 Rajamäki, FI**

72 Inventor/es:

**VALTAKARI, LEENA;**

**ALAPURANEN, MARIKA;**

**JÄMSÄ, SATU;**

**SIIKA-AHO, MATTI;**

**KALLIO, JARNO;**

**VIKARI, LIISA;**

**OJAPALO, PENTTI y**

**VEHMAANPERÄ, JARI**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 637 008 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

Enzimas nuevas

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a nuevas enzimas celulasa, especialmente nuevas endoglucanasas incluyendo proteínas de fusión de endoglucanasa, preparaciones y composiciones que contienen estas enzimas endoglucanasa y proteínas de fusión, vectores de expresión, células huésped y métodos para su preparación y usos de las celulasas, preparaciones y composiciones en las industrias textil, de detergentes, y de la pulpa y el papel.

**Antecedentes de la invención**

10 La celulosa es el componente estructural principal de las plantas superiores y aparece naturalmente en forma casi pura sólo en la fibra de algodón. Proporciona a las células de las plantas una alta resistencia a la tracción ayudándolas a resistir estrés mecánico y presión osmótica. La celulosa es un polisacárido lineal de residuos de glucosa conectados por uniones  $\beta$ -1,4. En la naturaleza, la celulosa está asociada habitualmente con lignina junto con hemicelulosas, tales como xilanos y glucomananos. Las enzimas celulolíticas hidrolizan la celulosa y están producidas por una amplia variedad de bacterias y hongos. Las celulasas son enzimas industrialmente importantes con un valor de mercado anual actual de aproximadamente 190 millones de dólares americanos. En la industria textil, las celulasas se usan en el acabado de tela vaquera para crear una apariencia de lavado a la piedra a la moda en las prendas de tela vaquera en un proceso de biolavado a la piedra ("biostoning"), y también se usan, por ejemplo, para limpiar pelusa y prevenir la formación de bolitas en la superficie de las prendas de algodón. En la industria de detergentes, las celulasas se usan para abrillantar los colores y para prevenir envejecimiento y frisado de las prendas. Las celulasas se usan además en la industria alimentaria y fabricación de alimento animal, y tienen un gran potencial en la industria de la pulpa y el papel, por ejemplo, para desteñir para liberar tinta de las superficies de fibra y para mejorar el drenaje de la pulpa. El amplio espectro de usos industriales para las celulasas ha establecido una necesidad de productos de celulasa comerciales que contienen diferentes componentes celulasa y que funcionan óptimamente en diferentes intervalos de pH y temperatura.

25 El uso práctico de celulasas está obstaculizado por la naturaleza de las composiciones de celulasa conocidas, que frecuentemente son mezclas de enzimas que tienen una variedad de actividades y especificidades de sustrato. Por esta razón, se han hecho esfuerzos para obtener celulasas que sólo tienen las actividades deseadas. Las propiedades únicas de cada celulasa hacen que algunas sean más adecuadas para determinados propósitos que otras. Aunque las enzimas se diferencian de varias maneras, una de las diferencias más importantes es el pH óptimo. Las celulasas neutras son más activas en el intervalo de pH 6-8 y las celulasas alcalinas en el intervalo de pH 7,5-10, mientras las celulasas ácidas, que tienen el pH óptimo a pH 4,5-5,5, muestran muy bajos niveles de actividad a valores de pH más altos. Las celulasas neutras y ácidas son especialmente útiles en la industria textil. En el tratamiento de telas, las celulasas atacan las cadenas de moléculas de celulosa que forman las fibras de algodón, afectando de esta manera las características de la tela.

35 En la industria textil, un aspecto "lavado a la piedra" o un aspecto desgastado ha centrado el interés de los productores de tela vaquera en los últimos años. El lavado a la piedra tradicional con piedras pómez reduce la resistencia de la tela y carga los aparatos de lavado. La tendencia ha sido hacia procesos de acabado de tela vaquera enzimáticos y las celulasas han reemplazado o se están usando junto con piedras pómez para proporcionar a la tela su aspecto "raído" deseado. Los tratamientos con enzimas controlados resultan en un menor daño a las prendas y máquinas y eliminan la necesidad de eliminación de las piedras.

40 Adicionalmente, la industria textil usa celulasas en el bioacabado, es decir, para crear una mejora permanente de desfrisado y resistencia a frisado mejorada, estructura superficial limpia por pelusa reducida, manejo textil mejorado, tal como suavidad, lisura y una sensación de seda, caída mejorada y colores más brillantes del tejido y absorbabilidad de la humedad mejorada.

45 Las celulasas aplicadas en el tratamiento de tela vaquera se dividen habitualmente en dos grupos principales: celulasas ácidas y neutras. Las celulasas ácidas operan típicamente a pH 4,0-5,5 y las celulasas neutras en el intervalo de pH 6-8. Las celulasas ácidas usadas en el biolavado a la piedra se originan principalmente de *Trichoderma reesei* (forma sexual *Hypocrea jecorina*) y las celulasas neutras provienen de una variedad de hongos, incluyendo los géneros de *Melanocarpus*, *Humicola*, *Myceliophthora*, *Fusarium*, *Acremonium*, y *Chrysosporium* (Haakana *et al.* 2004). Las enzimas de *T. reesei* incluyen, por ejemplo, celulasas de la familia glicósido 5 (endoglucanasa II, EGII), familia 7 (celobiohidrolasa I, CBHI) y familia 12 (endoglucanasa III, EGIII; Ward *et al.* 1993), y las celulasas neutras, lo más frecuentemente endoglucanasas, de la familia 45 y familia 7 (Henrissat, 1991; Henrissat y Bairoch, 1993, 1996).

55 Las celulasas comprenden un dominio/núcleo catalítico (CD) que expresa actividad celulasa. Además del dominio catalítico, la molécula celulasa puede comprender uno o más dominios de unión de celulosa (CBD), también denominados dominios/módulos de unión de carbohidrato (CBD/CBM), que pueden estar localizados bien en el extremo N o C terminal del dominio catalítico. Los CBD tienen actividad de unión de carbohidrato y median la unión de la celulasa a celulosa cristalina, pero tienen poco o ningún efecto en la actividad hidrolítica celulasa de la enzima

sobre sustratos solubles. Estos dos dominios están conectados típicamente a través de una región conectora flexible y altamente glicosilada.

Las celulasas que atacan principalmente en la superficie de la fibra son especialmente útiles en el lavado a la piedra de tela vaquera teñida con tinte Índigo, ya que el tinte está localizado en la superficie de la fibra. Cuando se usan para tratar tela de algodón, las celulasas ácidas requieren generalmente un tiempo de lavado más corto que las celulasas neutras. Las celulasas ácidas se usan especialmente en bioacabado (desfrisado) y también en el tratamiento de tela vaquera (biolavado a la piedra).

Las endoglucanasas (EG) en conexión con la presente invención significan enzimas clasificadas como E.C. 3.2.1.4 y son uno de los tres tipos de celulasas necesarias generalmente para la conversión biológica de celulosa a glucosa. Las endoglucanasas cortan enlaces beta-1,4-glucosídicos internos, mientras las celobiohidrolasas cortan el disacárido celobiosa del extremo de la cadena de polímero de celulosa y las beta-1,4-glucosidasas hidrolizan la celobiosa y otros celo-oligosacáridos cortos a glucosa. Algunas endoglucanasas naturales tienen un dominio de unión a celulosa (CBD), mientras otras no.

También, las endoglucanasas se usan ampliamente en la industria textil, de detergentes, de pulpa y papel. Por ejemplo, las endoglucanasas de la familia cel45 (EG fam 45) se describen, por ejemplo, en la Patente U.S. No. 6.001.639, que describe enzimas que tienen actividad endoglucanasa y que tienen dos secuencias de aminoácidos conservadas. Los usos en aplicaciones textiles, de detergentes, y de pulpa y papel se discuten generalmente y se menciona el tratamiento de material lignocelulósico. WO 2004/053039 está dirigido a aplicaciones de detergente de endoglucanasas. La Patente U.S. No. 5.958.082 describe el uso de endoglucanasa, especialmente de *Thielavia terrestris* en aplicaciones textiles proporcionando un aspecto de lavado a la piedra o desgastado de vaqueros de sarga. EP 0495258 se refiere a composiciones de detergente que contienen celulasa de *Humicola*. La Patente U.S. No. 5.948.672 describe una preparación de celulasa que contiene endoglucanasa, especialmente de *Humicola* y su uso en aplicaciones textiles y de pulpa. WO98/12307 proporciona variantes de endoglucanasa, por ejemplo, de *Thielavia terrestris* y *Myceliophora thermophila* para uso en aplicaciones textiles. También, se describe una endoglucanasa recombinante de *Acremonium*. No muestra una alta identidad con la de la presente invención.

Las composiciones y concentrados de EG y enriquecidas en EG también están disponibles comercialmente.

Sin embargo, existe una necesidad continua de celulasas mejoradas, incluyendo endoglucanasas, que sean más eficientes en el tratamiento de telas y en otros campos, en los que se usan tradicionalmente celulasas. En particular, existe una necesidad continua de celulasas más eficientes para mejorar los costes de los procesos.

La presente invención tiene como objetivo cumplir con esta necesidad.

### Descripción breve de la invención

Un objeto de la presente invención es proporcionar nuevas endoglucanasas y proteínas de fusión de endoglucanasa que tienen propiedades hidrolíticas mejoradas para uso en la industria textil, especialmente en los procesos de acabado del algodón, tales como en desfrisado, y lavado a la piedra de tela vaquera, y para uso en composiciones de detergente, así como en otros campos. Las nuevas endoglucanasas y proteínas de fusión de endoglucanasa de la invención tienen la ventaja de ser activas a valores de pH ácidos y neutros, tienen un rendimiento altamente mejorado en aplicaciones de bioacabado y biolavado a la piedra de tejidos y en aplicaciones de detergentes. Cuando se usan en el tratamiento de materiales textiles que contienen celulosa, las nuevas endoglucanasas y proteínas de fusión de endoglucanasa proporcionan una sensación de lisura, apariencia y suavidad mejorada, así como desfrisado permanente al tejido. Con la eficiencia mejorada de las endoglucanasas de la invención, el uso de las enzimas es significativamente más económico. Las ventajas adicionales también se consiguen en términos de logística y el almacenamiento de los productos de enzima, cuando son necesarias menores cantidades del producto de enzima. Además, las nuevas endoglucanasas y proteínas de fusión de endoglucanasa de la presente invención, al ser ácidas, actúan más rápidamente, rindiendo procedimientos de tratamiento más efectivos en términos de tiempo y coste y ahorros en equipamiento, así como instalaciones de tratamiento.

Un objeto adicional de la presente invención es proporcionar polinucleótidos que codifican las nuevas endoglucanasas y proteínas de fusión de endoglucanasa de la presente invención.

Un objeto adicional más de la presente invención es proporcionar nuevos plásmidos o vectores de expresión que contienen dichos polinucleótidos, útiles para la producción de las nuevas endoglucanasas y proteínas de fusión de endoglucanasa de la presente invención, así como nuevos huéspedes transformados con dichos plásmidos de expresión.

Un objeto adicional más de la presente invención es proporcionar preparaciones de enzima, que contienen una o más nuevas endoglucanasas y proteínas de fusión de endoglucanasa que tienen propiedades hidrolíticas mejoradas.

Un objeto adicional más de la presente invención es proporcionar métodos para el uso de las preparaciones de enzima y las endoglucanasas y proteínas de fusión de endoglucanasa para el acabado de tejidos, especialmente para bioacabado y biolavado a la piedra de tela vaquera.

5 Un objeto adicional más de la presente invención es proporcionar medios para el uso de las preparaciones de enzima de la invención en composiciones de detergente.

La presente invención se refiere a un polipéptido endoglucanasa que comprende actividad celulolítica y que se selecciona del grupo que consiste en:

a) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2;

10 b) un polipéptido de a) que carece del dominio de unión de carbohidrato, o del dominio de unión de carbohidrato y la región conectora.

La presente invención se refiere además a una proteína de fusión de endoglucanasa que comprende un fragmento celulolíticamente activo de un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 78% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2, unido a un dominio de unión de carbohidrato (CBD) heterólogo.

15 La presente invención también se refiere a una proteína de fusión de endoglucanasa que comprende una secuencia de aminoácidos derivada de un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2 unido a un dominio de unión de carbohidrato. La proteína de fusión puede comprender adicionalmente una región conectora.

20 La presente invención se refiere además a un polinucleótido aislado que codifica el polipéptido endoglucanasa o la proteína de fusión definidas anteriormente. Especialmente, la invención se refiere a un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en:

a) una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, o SEQ ID NO: 38;

b) una cadena complementaria de a);

25 y

c) una secuencia que es degenerada como resultado del código genético a una cualquiera de las secuencias como se define en a), o b).

La presente invención se refiere además a un vector de expresión que comprende la secuencia de polinucleótidos definida anteriormente.

30 La presente invención se refiere además a nuevos huéspedes transformados con los vectores de la invención, especialmente huéspedes que son capaces de un alto nivel de expresión de la endoglucanasa o proteína de fusión de endoglucanasa de la invención.

La presente invención se refiere además a una preparación de enzima, que contiene una o más endoglucanasas o proteínas de fusión de endoglucanasa de la invención.

35 La presente invención se refiere además a métodos para usar las preparaciones de enzima de la invención para el bioacabado de tejidos, especialmente para desfrisado.

La presente invención se refiere además a métodos para usar las preparaciones de enzima de la invención para el acabado de tejidos, especialmente para biolavado a la piedra de tela vaquera.

40 La presente invención se refiere además al uso de las preparaciones de enzima de la invención en composiciones de detergente.

La presente invención se refiere además a una cepa de *Escherichia coli* que tiene el número de acceso DSM 17324, DSM 18813, DSM 18814, DSM 18815, DSM 18816 o DSM 18817.

#### Descripción breve de los dibujos

45 La Figura 1 ilustra el dibujo esquemático de los casetes de expresión usados en la transformación de protoplastos de *Trichoderma reesei* para la producción de celulasas de *Acremonium thermophilum* de la invención. Los genes recombinantes estaban bajo el control del promotor *cbhl/ce17A* de *T. reesei* (prom *cbhl*) y la terminación de la transcripción se aseguró con la adición del terminados *cbhl* de *T. reesei* (term *cbhl*). El gen *amdS* (*amdS*) se incluyó para la selección de los transformantes.

5 La Figura 2 ilustra la dependencia de pH de las celulasas EG\_40 y semejantes a EG\_40 de *A. thermophilum* producidas heterológicamente por la determinación del sobrenadante del cultivo usando CMC como sustrato en una reacción de 10 min a 50°C (A). La temperatura óptima de las celulasas EG\_40 y semejantes a EG\_40 se determinó a pH 5,5 y 5, respectivamente. La reacción con CMC como sustrato se realizó durante 60 min. Se añadió BSA (100 µg/ml) como un estabilizador. (B).

La Figura 3 muestra el rendimiento de celulasa EG\_40 en el biolavado a la piedra a diferentes temperaturas evaluado por medición del color.

La Figura 4 muestra el efecto biolavado a la piedra de una mezcla de concentrados enriquecidos en EGII y de EG\_40 comparado con un concentrado enriquecido en EGII de la técnica anterior.

10 La Figura 5 muestra una serie de fotografías que muestran el efecto de desfrisado de una endoglucanasa de la invención.

### Descripción detallada de la invención

15 La presente invención se basa en esfuerzos para encontrar celulasas más mejoradas para uso en la industria textil. Sorprendentemente, se encontró que, empezando a partir de especies de *Acremonium*, podían aislarse nuevas endoglucanasas y podían producirse enzimas recombinantes, endoglucanasas que no sólo tienen un perfil de temperatura aceptable, sino que también muestran un rendimiento de desfrisado favorable inesperado y son al menos cuatro veces más eficientes que la preparación comercial que contiene EG. Adicionalmente, las nuevas endoglucanasas mostraron propiedades de biolavado a la piedra excelentes comparado con las celulasas de la técnica anterior.

20 De acuerdo con esto, la presente invención se refiere a un polipéptido endoglucanasa que comprende un fragmento que tiene actividad celulolítica y se selecciona del grupo que consiste en:

a) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2, y

25 b) un polipéptido de a) o b) que carece del dominio de unión de carbohidrato, o del dominio de unión de carbohidrato y la región conectora.

En una realización preferida de la invención, dicho aminoácido tiene al menos 98% identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2.

En otra realización preferida de la invención más, dicho aminoácido tiene SEQ ID NO: 2.

30 En otra realización preferida de la invención más, dicho fragmento tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 19.

En otra realización preferida de la invención más, los polipéptidos se pueden obtener u originar de una *Acremonium* sp., preferiblemente de *Acremonium thermophilum*.

35 Los polipéptidos endoglucanasa de la presente invención son preferiblemente polipéptidos recombinantes. Los polipéptidos recombinantes pueden producirse en un huésped heterólogo o en un huésped homólogo genéticamente modificado.

40 Según una realización particular de la invención, el polipéptido endoglucanasa es una modificación de un polipéptido que tiene al menos 95% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2, en el que el dominio de unión de carbohidrato CBD se ha reemplazado por un CBD heterólogo. Además, la región conectora y/o la secuencia señal pueden reemplazarse por una región conectora y/o secuencia señal heteróloga. Estas endoglucanasas modificadas también están englobadas en la presente memoria por el término proteína de fusión de endoglucanasa. En una realización preferida de la invención, la endoglucanasa modificada/fusionada tiene SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40 o SEQ ID NO: 41.

45 En una realización particular de la invención, la proteína de fusión es una proteína de fusión de endoglucanasa que comprende un fragmento celulolíticamente activo de un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2, y un dominio de unión de carbohidrato (CBD) heterólogo, en el que el CBD heterólogo y la región conectora opcional derivan de CBHI de *Trichoderma reesei*, CBHI de *Chaetomium thermophilum*, o xilanasas de *Acremonium* sp. "Heterólogo" como se usa en el presente contexto significa que el CBD y la parte conectora posible de la proteína de fusión de endoglucanasa se obtienen de otro organismo y se unen al núcleo celulolíticamente activo de la endoglucanasa por modificación génica.

50 Especialmente, la proteína de fusión comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 71% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 39, al menos 69% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 40, o al menos 69% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 41. Especialmente, la proteína de fusión comprende una secuencia de aminoácidos que tiene 75, 80, 85, 90, 95, ó 98% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40 o SEQ ID NO: 41.

La presente invención se refiere además a un polinucleótido aislado que codifica el polipéptido endoglucanasa definido anteriormente.

Específicamente, en una realización de la invención, el polinucleótido aislado tiene una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en:

- 5           a) una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, o SEQ ID NO: 38;
- b) una cadena complementaria de a); y
- c) una secuencia que es degenerada como resultado del código genético a una cualquiera de las secuencias como se define en a), o b).

- 10       La presente invención se refiere además a un vector de expresión que comprende la secuencia de polinucleótido definida anteriormente.

La presente invención se refiere además a nuevos huéspedes transformados con los vectores de la invención, especialmente huéspedes que son capaces de un alto nivel de expresión de la endoglucanasa o proteína de fusión de endoglucanasa de la invención. Según una realización preferida de la invención, las enzimas se pueden obtener de la cepa de *Acremonium thermophilum* ALKO4245 depositada como CBS 116240.

15       La presente invención se refiere además a una preparación de enzima, que contiene una o más endoglucanasas o proteínas de fusión de endoglucanasa de la invención.

La presente invención se refiere además a métodos para usar las preparaciones de enzima de la invención para el bioacabado de tejidos, especialmente para desfrisado.

- 20       La presente invención se refiere además a métodos para usar las preparaciones de enzima de la invención para el acabado de tejidos, especialmente para biolavado a la piedra de tela vaquera.

La presente invención se refiere además al uso de las preparaciones de enzima de la invención en composiciones de detergente.

25       Las preparaciones de endoglucanasa y proteína de fusión de endoglucanasa de la invención son especialmente útiles en la industria textil y de detergentes. Son especialmente útiles en la industria textil para el bioacabado de telas o prendas, por ejemplo, desfrisado, eliminación de pelusa, aclarado del color, reducción de dureza, creación de diferentes acabados (por ejemplo, un efecto de "piel de melocotón", "desgastado", "lavado a la arena", o "aspecto antiguo") y para el bioacabado de fibra, por ejemplo, reducción de pilosidad y mejora de la lisura. Los usos adicionales incluyen el uso en composiciones de detergentes para mejorar las propiedades de cuidado de las telas por anti-frisado, anti-envejecimiento, aclarado de color y suavidad, y para mejorar el efecto de limpieza textil, por ejemplo, eliminación de suciedad. Los usos adicionales incluyen además el uso en el biolavado a la piedra de tela vaquera.

30       En las telas de algodón, las pelusas (microfibras) surgen desde la superficie, que pueden enmarañarse durante el procesamiento, formando así bolitas. Las enzimas debilitan las microfibras que suben desde la superficie y las fuerzas de cizalla del tratamiento las eliminan (Nierstrasz y Warmoeskerken, 2003). Tal y como se usa en el presente contexto, la expresión "bioacabado" (también denominado desfrisado, eliminación de pelusas o biopulido) se refiere al uso de enzimas en una hidrólisis controlada de fibras celulósicas con el fin de modificar la superficie de la tela o fibra de una manera tal que previene el frisado permanentemente, mejora el manejo de la tela tal como suavidad y lisura, limpia la estructura de la superficie reduciendo la formación de pelusas, que resulta en el aclarado de colores, mejora la caída de la tela, mejora la absorbabilidad de la humedad, que puede mejorar también la capacidad de teñido. Las enzimas celulasa se usan para el tratamiento o acabado de materiales textiles que contienen celulosa, tales como algodón, lino, ramio, yute, viscosa, modal, lyocell y cupro, o mezclas de éstos.

35       Tal y como se usa en el presente contexto, la expresión "biolavado a la piedra" de tela o prenda significa el uso de enzimas en lugar de, o además de, piedras pómez para el tratamiento de la tela o prenda, especialmente tela vaquera.

Tal y como se usa en el presente contexto, la expresión "retroteñido" se refiere a la tendencia del tinte liberado de redepositarse en la superficie de las fibras de la tela.

40       Tal y como se usa en el presente contexto, la expresión "detergente" se refiere a un agente limpiador que puede contener agentes tensioactivos (tensioactivos aniónicos, no iónicos, catiónicos y anfólicos), potenciadores y otros ingredientes opcionales tales como agentes anti-redeposición y suspensión de suciedad, abrillantadores ópticos, agentes blanqueadores, tintes y pigmentos e hidrolasas. El listado adecuado de los contenidos de detergentes se proporciona en la Patente U.S. No. 5.433.750, una lista adecuada de tensioactivos se proporciona en la Patente U.S. No. 3.664.961.

La actividad biológica de una endoglucanasa es su actividad catalítica, y/o su capacidad de unirse a material celulósico. La actividad celolítica de una endoglucanasa es su actividad hidrolítica.

5 Tal y como se usa en el presente contexto, la expresión "*Acremonium sp.*" se refiere especialmente a un género de hongos filamentosos que tiene las características de la cepa CBS 116240. Esta cepa se clasifica actualmente como *A. thermophilum*.

10 Tal y como se usa en el presente contexto, "polinucleótido" se refiere tanto a ARN como ADN, y puede ser monocatenario o bicatenario. El polinucleótido también puede ser un fragmento de dichos polinucleótidos que comprende al menos 20 nucleótidos, por ejemplo, al menos 25, 30 ó 40 nucleótidos. Según una realización de la invención, tiene una longitud de al menos 100, 200 ó 300 nucleótidos. Además, el polinucleótido puede ser degenerado como resultado del código genético en una cualquiera de las secuencias como se define anteriormente. Esto significa que diferentes codones pueden codificar el mismo aminoácido.

15 Los nuevos polipéptidos también pueden ser variantes de dichos polipéptidos. Una "variante" puede ser un polipéptido natural, por ejemplo, una variante alélica en la misma cepa, especie o género, o puede haberse generado por mutagénesis. Puede comprender sustituciones, deleciones o inserciones de aminoácidos, pero aún así funciona de una manera sustancialmente similar a las enzimas definidas anteriormente, es decir, comprende un fragmento que tiene actividad celolítica.

20 Un vector de expresión es un plásmido o vector de clonación capaz de expresar ADN que codifica las endoglucanasas y proteínas de fusión de endoglucanasa de la invención después de transformación en un huésped deseado. Cuando se usa un huésped fúngico, el gen de interés se proporciona preferiblemente a un huésped fúngico como parte de un vehículo de clonación o expresión que se integra en el cromosoma fúngico, o permite que el gen de interés se integre en el cromosoma del huésped, o como un plásmido que se replica autónomamente. Las secuencias que son parte del vehículo de clonación o vehículo de expresión también pueden integrarse con dicho ADN durante el proceso de integración. Además, en hongos, el vector de expresión o partes de éste pueden dirigirse a loci predeterminados.

25 El ADN que codifica las endoglucanasas y las proteínas de fusión de endoglucanasa de la invención también se pone preferiblemente bajo el control de (es decir, unido de forma operativa a) determinadas secuencias de control tales como secuencias promotoras proporcionadas por el vector (que se integran con el gen de interés). Alternativamente, las secuencias de control pueden ser las del sitio de inserción.

30 Las secuencias de control de la expresión de un vector de expresión variarán dependiendo de si el vector se diseña para expresar un determinado gen en un huésped procarionta o en uno eucariota (por ejemplo, un vector lanzadera puede proporcionar un gen para la selección en huéspedes bacterianos). Las secuencias de control de la expresión pueden contener elementos reguladores de la transcripción tales como promotores, elementos potenciadores, y secuencias de terminación de la transcripción, y/o elementos reguladores de la traducción, tales como sitios de inicio y terminación de la traducción.

35 Una molécula de polinucleótido, tal como ADN, se dice que es "capaz de expresar" un polipéptido si contiene secuencias de control de la expresión que contienen información reguladora de la transcripción y dichas secuencias están "unidas de forma operativa" a la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido.

40 Una unión operativa es una unión en la que una secuencia está conectada con una secuencia (o secuencias) reguladora de manera tal que se pone la expresión de la secuencia bajo la influencia o control de la secuencia reguladora. Dos secuencias de ADN (tales como secuencia de región promotora unida al extremo 5' de la secuencia que codifica la proteína) se dice que están unidas de forma operativa si la función del promotor resulta en la transcripción.

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

45 En una realización preferida, se construyen transformantes genéticamente estables mediante lo cual el ADN que codifica las endoglucanasas o proteínas de fusión de endoglucanasa de la invención se integra en el cromosoma del huésped por transformación con un vector, que porta secuencias que promueven la integración de dicho vector en el cromosoma.

50 Las células que han integrado de forma estable el ADN que codifica las endoglucanasas o las proteínas de fusión de endoglucanasa de la invención en sus cromosomas se seleccionan introduciendo también uno o más marcadores, homólogos o heterólogos, que permiten la selección de células huésped que contienen el vector de expresión en el cromosoma, por ejemplo, el marcador puede proporcionar resistencia a biocida, por ejemplo, resistencia a antibióticos, o metales pesados, tal como cobre, o marcadores que complementan una mutación auxotrófica en el cromosoma del huésped, y semejantes. El gen del marcador seleccionable puede unirse bien directamente a las secuencias génicas de ADN que se van a expresar, o introducirse en la misma célula por co-transformación.

55

Una vez el vector o secuencia de ADN de la invención que contiene la o las construcciones está preparado para la expresión, la o las construcciones de ADN se introducen en una célula huésped apropiada por cualquiera de una variedad de medios adecuados, incluyendo transformación como se conoce en la técnica. Después de la introducción del vector, las células receptoras se crecen en un medio selectivo, que selecciona para el crecimiento de células transformadas.

Los sistemas huésped adecuados para expresión y producción son, por ejemplo, el sistema de producción desarrollado para el huésped fúngico *Trichoderma* (EP 244 234), o sistema de producción de *Aspergillus*, tal como *A. oryzae* o *A. niger* (WO 9708325 y WO 9533386, Patente U.S. No. 5.843.745, Patente U.S. No. 5.770.418), o el sistema de producción desarrollado para *Fusarium*, tal como *F. oxysporum* (Malardier *et al.*, 1989). Los sistemas de producción adecuados desarrollados para bacterias son un sistema de producción desarrollado para *Bacillus*, por ejemplo, *B. subtilis* o para *E. coli*, o para actinomicete *Streptomyces*. Los sistemas de producción adecuados desarrollados para levaduras son sistemas desarrollados para *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* o *Pichia pastoris*. También son posibles los sistemas de producción en algunos otros microbios o en células de mamíferos o en plantas.

La expresión de la o las secuencias de genes clonados resulta en la producción de la proteína deseada, o en la producción de un fragmento de esta proteína. Esta expresión puede tener lugar de una manera continua en las células transformadas, o de una manera controlada.

Se entiende que los fragmentos son partes de moléculas de polipéptido o ácido nucleico lo suficientemente largas como para tener las propiedades enzimáticas deseadas o para codificar las endoglucanasas o proteínas de fusión de endoglucanasa descritas o un fragmento biológicamente activo de éstas. El término "degenerado" significa que la secuencia de nucleótidos puede variar siempre que la secuencia de aminoácidos codificada sea la misma. Esto es así porque hay más de un triplete de nucleótidos que codifica un único aminoácido.

Tal y como se usa en el presente contexto, el término "identidad" de secuencia se refiere a la identidad global entre dos secuencias de aminoácidos comparadas entre sí desde el primer aminoácido codificado por el gen correspondiente hasta el último aminoácido. La identidad de secuencias de longitud completa se mide usando el paquete de programas de programa de alineamiento global de Needleman-Wunsch en EMBOSS (European Molecular Biology Open Software Suite; Rice *et al.*, 2000), versión 3.0.0, con los parámetros siguientes: EMBL62, penalización por hueco 10,0, penalización por extensión 0,5. El algoritmo se describe en Needleman y Wunsch (1970). El experto en la técnica es conocedor del hecho de que los resultados usando el algoritmo de Needleman-Wunsch son comparativos sólo cuando se alinean dominios correspondientes de la secuencia. Consecuentemente, la comparación, por ejemplo, de secuencias de celulasa incluyendo CBD o secuencias señal con secuencias que carecen estos elementos no puede hacerse.

Las enzimas celulolíticas útiles para hidrolizar material celulósico se pueden obtener u originar de *Acremonium sp.*, preferiblemente *A. thermophilum*. "Que se puede obtener de" o "se puede originar de" significa que pueden obtenerse de dichas especies, pero no excluye la posibilidad de obtenerlas de otras fuentes. En otras palabras, pueden originarse de cualquier organismo incluyendo plantas. Preferiblemente, se originan de microorganismos, por ejemplo, bacterias u hongos. Las bacterias pueden ser, por ejemplo, de un género seleccionado de *Bacillus*, *Azospirillum* y *Streptomyces*. Más preferiblemente, la enzima se origina de hongos (incluyendo hongos filamentosos y levaduras), por ejemplo, de un género seleccionado del grupo que consiste en *Thermoascus*, *Acremonium*, *Chaetomium*, *Achaetomium*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Chrysosporium*, *Collybia*, *Fomes*, *Fusarium*, *Humicola*, *Hypocrea*, *Lentinus*, *Melanocarpus*, *Myceliophthora*, *Myriococcum*, *Neurospora*, *Penicillium*, *Phanerochaete*, *Phlebia*, *Pleurotus*, *Podospora*, *Polyporus*, *Rhizoctonia*, *Scytalidium*, *Pycnoporus*, *Trametes* y *Trichoderma*.

Tal y como se usa en el presente contexto, las expresiones "preparación de enzima", "preparación de celulasa" y "preparación de endoglucanasa" se refieren a cualquier producto de enzima, que contiene al menos una endoglucanasa o proteína de fusión de endoglucanasa de la invención. Así, dicha preparación de enzima puede ser un medio de cultivo usado o filtrado que contiene una o más endoglucanasas o proteínas de fusión de endoglucanasa o una o más endoglucanasas o proteínas de fusión de endoglucanasa y otras enzimas, una endoglucanasa o proteína de fusión de endoglucanasa aislada o una mezcla de una o más endoglucanasas o proteínas de fusión de endoglucanasa o una mezcla de una o más endoglucanasas o proteínas de fusión de endoglucanasa y una o más otras enzimas. Además de la actividad endoglucanasa, dicha preparación puede contener aditivos, tales como estabilizadores, tampones, conservantes, tensioactivos y/o componentes del medio de cultivo. Los aditivos preferidos son tales como los usados comúnmente en las preparaciones de enzima pretendidas para la aplicación, en la que se usa la preparación de enzima. La preparación de enzima puede estar en la forma de líquido, polvo o granulado.

Por "medio de cultivo usado" se quiere decir aquí el medio de cultivo del huésped que comprende las enzimas producidas. Preferiblemente, las células huésped se separan de dicho medio después de la producción.

La preparación de enzima puede comprender una o más endoglucanasas o proteínas de fusión de endoglucanasa de la presente invención u otras enzimas celulasa junto con una o más endoglucanasas o proteínas de fusión de

endoglucanasa de la presente invención. Por ejemplo, las endoglucanasas que tienen diferentes propiedades pueden combinarse para hacer que la preparación de enzima sea más útil para diferentes condiciones.

5 Para obtener las preparaciones de enzima de la invención, los huéspedes que tienen las propiedades deseadas (esto es, huéspedes capaces de expresar cantidades económicamente factibles de las endoglucanasas o proteínas de fusión de endoglucanasa de la invención) se cultivan en condiciones adecuadas, las enzimas deseadas se secretan de los huéspedes en el medio de cultivo, y la preparación de enzima se recupera de dicho medio de cultivo por métodos conocidos en la técnica.

10 La preparación de enzima puede comprender, además de la endoglucanasa o proteína de fusión de endoglucanasa, una o más otras enzimas, que pueden ser, por ejemplo, amilasas, lipasas, proteasas, pectinasas y/o oxidasas, tales como lacasas y peroxidasas. Alternativamente, antes, durante o después del tratamiento con la endoglucanasa o la proteína de fusión de endoglucanasa de la presente invención, puede llevarse a cabo otro tratamiento enzimático. El tratamiento enzimático puede comprender, por ejemplo, uno o más tratamientos con amilasa, uno o más tratamientos con celulasa y/o uno o más tratamientos con peroxidasa y/o lacasa. La elección de las otras enzimas incluidas en la preparación de enzima o usadas en el tratamiento enzimático, depende de la aplicación.

15 La preparación de enzima puede ser el medio de cultivo con o sin las células huéspedes nativas o transformadas, o se recupera del mismo por la aplicación de métodos muy conocidos en la técnica. Sin embargo, como las endoglucanasas o las proteínas de fusión de endoglucanasa de la invención se secretan en el medio de cultivo y presentan actividad en condiciones ambientales del licor celulolítico, es una ventaja de la invención que las preparaciones de enzima de la invención pueden utilizarse directamente del medio de cultivo sin purificación adicional. Si se desea, dichas preparaciones pueden liofilizarse o la actividad enzimática concentrarse y/o estabilizarse de otra manera para almacenamiento. Las preparaciones de enzima de la invención son muy económicas de producir y usar debido a que (1) las enzimas pueden usarse en una forma cruda; el aislamiento de una enzima específica del medio de cultivo es innecesario y (2) como las enzimas se secretan en el medio de cultivo, sólo es necesario recuperar el medio de cultivo para obtener la preparación de enzima deseada; no es necesario extraer una enzima de los huéspedes. Preferiblemente, el huésped para dicha producción es *Trichoderma*, y especialmente *T. reesei*.

20 Las preparaciones de enzima de la invención pueden proporcionarse como un líquido o como un sólido, por ejemplo, en un polvo seco o forma granular o líquida, especialmente, gránulos no pulverulentos, o un líquido estabilizado, o la preparación de enzima puede concentrarse o estabilizarse de otra forma para almacenamiento o uso. Se prevé que las preparaciones de enzima que contienen una o más de las celulasas de la invención pueden enriquecerse adicionalmente o hacerse parcialmente o completamente deficientes en actividades enzimáticas específicas, de manera que se satisfagan los requerimientos de una utilidad específica en varias aplicaciones, por ejemplo, en la industria textil. Una mezcla de actividades enzimáticas secretada por un huésped y especialmente un huésped fúngico, puede elegirse para ser ventajosas en una aplicación industrial particular, por ejemplo, bioacabado y biolavado a la piedra.

30 Las preparaciones de enzima de la invención pueden ajustarse para satisfacer los requerimientos de necesidades específicas en varias aplicaciones en la industria textil, de detergentes o pulpa y papel.

35 Pueden prepararse mezclas con otras macromoléculas que no se producen todas necesariamente a partir del mismo huésped (por ejemplo, otras enzimas tales como endoglucanasas, amilasas, lipasas, proteasas, pectinasas y/o oxidasas, tales como lacasas y peroxidasas), o productos químicos que pueden potenciar el rendimiento, estabilidad, o tamponamiento de la preparación de enzima deseada. Los gránulos no pulverulentos pueden estar recubiertos. Las preparaciones de enzima líquidas pueden estabilizarse mediante la adición de un poliol tal como propileno glicol, un azúcar o azúcar alcohol, ácido láctico o ácido bórico, o cloruro de sodio, según métodos establecidos.

40 Las formas protegidas de las enzimas de la invención pueden prepararse como se describe en EP 238.216.

Las preparaciones de enzima de la invención pueden contener un tensioactivo que puede ser aniónico, no iónico, catiónico, anfotérico o una mezcla de estos tipos, especialmente cuando se usan como una composición de detergente. Las composiciones de detergente útiles se describen, por ejemplo, en WO 94/07998, Patente U.S. No. 5.443.750 y Patente U.S. No. 3.664.961.

45 Si se requiere, una enzima deseada puede aislarse, y purificarse adicionalmente según condiciones convencionales, tales como extracción, precipitación, cromatografía, cromatografía de afinidad, electroforesis, o semejantes. Un polipéptido aislado en este contexto puede significar simplemente que las células y restos celulares se han eliminado del medio de cultivo que contiene el polipéptido. Convenientemente, los polipéptidos se aíslan, por ejemplo, mediante la adición de polímeros aniónicos y/o catiónicos al medio de cultivo usado para potenciar la precipitación de las células, restos celulares y algunas enzimas que tienen actividades paralelas no deseadas. El medio se filtra entonces usando un agente filtrador inorgánico y un filtro para eliminar los precipitantes formados. Después de esto, el filtrado se procesa adicionalmente usando una membrana semi-permeable para eliminar el exceso de sales, azúcares y productos metabólicos.

Las preparaciones de enzima de esta invención son especialmente útiles en la industria textil, preferiblemente, en bioacabado y en biolavado a la piedra o en la industria de detergentes. Otras áreas útiles con la industria de la pulpa y el papel.

5 "Bioacabado" se refiere al uso de enzimas en una hidrólisis controlada de fibras celulósicas con el fin de modificar la superficie de la tela o fibra de una manera que previene el frisado permanentemente, mejora el manejo de la tela como suavidad y lisura, limpia la estructura de la superficie reduciendo la formación de pelusas, lo que resulta en el aclarado de los colores, mejora la caída de la tela, mejora la absorbabilidad de la humedad y que también puede mejorar la capacidad de teñido.

10 El desfrisado enzimático puede llevarse a cabo en cualquier etapa durante el procesamiento húmedo del tejido, preferiblemente después de desaprestado y blanqueamiento. El proceso enzimático requiere un equipo con fuerzas de cizalla suficientes y mezclado tal como cabestrante jet o máquina de lavado (Nierstrasz V.A. y Warmoeskerken M.M.C.G., 2003).

15 El bioacabado se realiza típicamente a aproximadamente pH 4,0-6,0. La temperatura de la reacción puede variar de aproximadamente 30°C a 70°C, y es preferiblemente 50-60°C. La relación de licor (la relación del volumen de líquido por peso de tela) puede variar de aproximadamente 3:1 a 20:1, preferiblemente, 5:1 a 10:1. El tiempo de incubación es generalmente 15 a 90 minutos, preferiblemente 30 a 60 min. La dosificación de la enzima depende en gran medida del tipo de telas, maquinaria, condiciones del proceso (pH, temperatura, relación de licor, tiempo de tratamiento, carga de tela vaquera, escala del proceso) y tipo de preparación de enzima y semejantes. Un experto en la técnica es capaz de definir dosificaciones y condiciones adecuadas.

20 Las endoglucanasas y proteínas de fusión de endoglucanasa de la invención son especialmente útiles en la industria textil para el bioacabado de telas o prendas, por ejemplo, desfrisado, eliminación de pelusa, aclarado del color, reducción de dureza, la creación de diferentes acabados (por ejemplo, un efecto de "piel de melocotón", "desgastado", "lavado a la arena", o "aspecto antiguo") y bioacabado de fibra (por ejemplo, reducción de pilosidad, mejora de lisura). Las endoglucanasas y proteínas de fusión de endoglucanasa de la presente invención pueden usarse en el bioacabado en condiciones ácidas y neutras.

Las endoglucanasas y proteínas de fusión de endoglucanasa de la presente invención son útiles en composiciones de detergente para mejorar las propiedades del cuidado de las telas por antifrisado, antienviejamiento, aclarado de colores y suavidad, y para mejorar el efecto de limpieza de los tejidos, por ejemplo, eliminación de suciedad.

30 El lavado a la piedra tiene tres etapas: desaprestado, abrasión y post-tratamiento. La primera etapa, el proceso de desaprestado, es normalmente el primer tratamiento húmedo de los vaqueros y significa la eliminación de almidón y otros agentes de apresto aplicados habitualmente a las fibras de urdimbre para prevenir el daño durante el proceso de tejido. Se usan alfa-amilasas para eliminar apresto basado en almidón para un procesamiento húmedo mejorado y uniforme. Después del desaprestado, los vaqueros se aclaran normalmente con agua o se continúa directamente con la etapa de abrasión.

35 La segunda etapa, abrasión, puede realizarse con enzimas o piedras pómez o ambas. En todos los casos, es necesaria una acción mecánica para eliminar el tinte, y el tratamiento se lleva a cabo habitualmente en máquinas de lavado, como lavadores de tambor. El término "desgastado" significa en la presente memoria la apariencia de una tela vaquera cuando se ha tratado con enzimas celulasa o piedras, o ambas. Como resultado de la eliminación no uniforme del tinte, existen contrastes entre áreas teñidas y áreas de las que se ha eliminado el tinte. Las expresiones sinónimas son "aspecto lavado a la piedra" o "aspecto desgastado". En el lavado a la piedra enzimático, o biolavado a la piedra, la abrasión con piedras pómez se elimina completamente o parcialmente y se añade celulasa para facilitar la abrasión del tinte Índigo de la superficie de las fibras. El tratamiento con celulasa puede hacerse usando celulasas neutras o ácidas o ambas.

45 La abrasión está seguida generalmente por una tercera etapa, post-tratamiento que incluye etapas de lavado y aclarado durante las que pueden usarse detergentes, abrillantadores ópticos o suavizantes. Después del tratamiento enzimático, la reacción debe pararse con el fin de evitar daño a los materiales tratados, por ejemplo, por inactivación con temperatura y/o pH, comprendiendo el último un aclarado concienzudo y/o eliminación de detergente por lavado. Esto asegura que la resistencia mecánica de la tela no se ve comprometida adicionalmente por la presencia continuada de la enzima.

50 Por "tela vaquera" se quiere decir, en conexión con esta invención, tela vaquera, habitualmente prendas vaqueras, particularmente pantalones vaqueros. Ventajosamente, la tela vaquera es tela vaquera teñida con Índigo. La tela vaquera también puede tratarse con Índigo, con derivados de Índigo o tela vaquera teñida con Índigo junto con algún otro tinte, por ejemplo, tela vaquera teñida con Índigo con fondo de azufre.

55 El tratamiento con una o unas celulasas puede reemplazar completamente el tratamiento con piedras pómez (por ejemplo, 1 kg de enzima comercial frente a 100 kg de piedras). Sin embargo, el tratamiento con celulasa puede combinarse con tratamiento con piedra pómez cuando se desea producir un acabado fuertemente desgastado. Un efecto de piel de melocotón en el que se crea una fina cubierta semejante a pelo protuberante también se consigue por un lavado que combina una celulasa neutra con piedras pómez. Las celulasas e esta invención son

especialmente útiles para proporcionar un aspecto desgastado y para minimizar la retrotinción en biolavado a la piedra.

El biolavado a la piedra se realiza típicamente a aproximadamente pH 3,0-8,0, y preferiblemente a pH 4,0-6,0. La temperatura de la reacción puede variar de aproximadamente 30°C a 70°C y es preferiblemente entre 50-60°C. La relación de licor (la relación del volumen de líquido por peso de tela) puede variar de aproximadamente 3:1 a 20:1, preferiblemente, 5:1 a 10:1. El tiempo de tratamiento puede variar entre 15 min-90 min y preferiblemente 30 min-60 min. Debe enfatizarse que la dosificación de la enzima depende en gran medida del tipo de telas, maquinaria, condiciones del proceso (pH, temperatura, relación de licor, tiempo de tratamiento, carga de tela vaquera, escala del proceso) y tipo de preparación de enzima y semejantes. Si se desea, pueden usarse piedras pómez en combinación con las endoglucanasas o proteínas de fusión de endoglucanasa. La dosificación de la enzima requerida será entonces significativamente menor. Un experto en la técnica es capaz de definir las dosificaciones y condiciones adecuadas.

El material textil que se trata con las preparaciones de enzima de la invención puede fabricarse de fibras que contienen celulosa natural o fibras que contienen celulosa artificial o mezclas de éstas. Los ejemplos de celulósicos naturales son algodón, lino, cáñamo, yute y ramio. Los ejemplos de celulósicos artificiales son viscosa, acetato de celulosa, triacetato de celulosa, rayón, cupro y lyocell. Los celulósicos mencionados anteriormente también pueden emplearse como mezclas de fibras sintéticas tales como poliéster, poliamida o fibras acrílicas. El material textil puede ser fibra o tejido o entrelazado o formado por cualquier otro medio.

Las endoglucanasas y proteínas de fusión de endoglucanasa de la presente invención, además de ser especialmente útiles para el tratamiento de telas, son útiles en general en cualquier área que requiere actividad celulasa.

En la industria de la pulpa y el papel, las celulosas pueden usarse, por ejemplo, en el desteñido o modificación de fibras de diferentes papeles y cartones reciclados que tienen pH neutro o alcalino, en la mejora de la calidad de las fibras, o en el incremento del drenaje en la fabricación del papel. Otros ejemplos incluyen la eliminación de espesante de pasta de impresión y tinte en exceso después de la impresión textil, y como un tratamiento para el alimento animal. Por ejemplo, si la aplicación pretendida es la mejora de la resistencia de la pulpa mecánica, entonces las preparaciones de enzima de la invención pueden proporcionar una o más de estas proteínas de manera que se potencia o facilita la capacidad de las fibras de celulosa para unirse entre sí. De una manera similar, en la aplicación del refinado de pulpa, las preparaciones de endoglucanasas y proteínas de fusión de endoglucanasa de la invención pueden proporcionar una o más de estas proteínas a un nivel que potencia o facilita dicho hinchamiento.

Las endoglucanasas y proteínas de fusión de endoglucanasa de la presente invención proporcionan ventajas inesperadas cuando se usan en la industria textil y especialmente en bioacabado, tal como desfrisado, y en biolavado a la piedra. Las endoglucanasas y proteínas de fusión de endoglucanasa de la presente invención son considerablemente más eficientes que las celulosas de la técnica anterior. En el bioacabado se podrían usar dosificaciones al menos cuatro veces menores. En otras palabras, se consigue un mayor rendimiento usando las endoglucanasas y proteínas de fusión de endoglucanasa de la presente invención. En desfrisado, las endoglucanasas y proteínas de fusión de endoglucanasa de la presente invención fueron más eficientes y produjeron una superficie lisa estable.

La invención se describe con más detalle en los ejemplos siguientes, que no deben interpretarse para reducir el alcance de la invención sino sólo para aclarar el uso de la invención.

#### **Ejemplo 1. Cultivo del *Acremonium thermophilum* ALKO4245**

La cepa de *Acremonium thermophilum* ALKO4245 se creció en un biorreactor de 2 litros (Braun Biostat®, Braun, Melsungen, Alemania) en el medio siguiente, g/l: celulosa Solka Flocc 40, polvo de maíz fermentado 15, grano usado de destilador 5, xilano de escanda 3, garrofín 3, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5. El intervalo de pH fue 5,2±0,2 (NH<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), aireación 1 vvm, agitación 300-600 rpm, control antiespuma con Struktol® y la temperatura 42°C. El tiempo de cultivo fue 4 días. Después del cultivo, las células y otros sólidos se recogieron por centrifugación y se recuperó el sobrenadante.

#### **Ejemplo 2. Purificación de una endoglucanasa de *Acremonium thermophilum* ALKO4245**

El sobrenadante del cultivo de *Acremonium thermophilum* ALKO4245, crecido como se describe en el Ejemplo 1, se incubó a 70°C durante 24 horas después de lo cual se concentró por ultrafiltración. La endoglucanasa pura se obtuvo por purificación secuencial con cromatografía de interacción hidrofóbica e intercambio catiónico seguida de filtración en gel. La actividad endoglucanasa de las fracciones recogidas durante la purificación se determinó usando carboximetil celulosa (CMC) como un sustrato (según el procedimiento de IUPAC, 1987).

El sobrenadante del cultivo concentrado se aplicó a la columna de interacción hidrofóbica HiPrep 16/10 Butil FF (GE Healthcare) equilibrada con 20 mM tampón fosfato de potasio, pH 6,0, que contenía 1 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Las proteínas unidas se eluyeron con un gradiente lineal del tampón anterior a 5 mM fosfato de potasio, pH 6,0. Se recogieron

fracciones y la actividad endoglucanasa se determinó como se ha descrito anteriormente. La actividad endoglucanasa eluyó en un área de conductividad amplia de 120 a 15 mS/cm.

Las fracciones combinadas se aplicaron a la columna de intercambio catiónico HiTrap SP XL (GE Healthcare) equilibrada con 8 mM acetato de sodio, pH 4,5. Las proteínas unidas se eluyeron con un gradiente lineal de 0 a 0,25 M NaCl en el tampón de equilibrado. La proteína que contenía actividad endoglucanasa eluyó en el área de conductividad de 3-7 mS/cm. La cromatografía de intercambio catiónico se repitió y el eluato de proteína se concentró por liofilización.

La muestra disuelta se cargó en la columna de filtración en gel Superdex 75 HR10/30 (Pharmacia) equilibrada con 20 mM tampón fosfato de sodio, pH 7,0, que contenía 0,15 M NaCl. La fracción de proteína principal eluyó de la columna con el volumen de retención de 13,3 ml. El eluato de proteína fue puro según se juzgó por electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida y el peso molecular se evaluó como 40kDa. La actividad específica de la proteína purificada, designada como EG\_40 o At EG\_40 de *Acremonium thermophilum* (SEQ ID NO: 2), a 50°C, se determinó que era 450 nkat/mg (según el procedimiento de IUPAC, 1987, *supra*, usando CMC como un sustrato).

La estabilidad térmica de la endoglucanasa purificada se determinó a diferentes temperaturas. La reacción se realizó en presencia de 0,1 mg/ml BSA a pH 5,0 durante 60 min usando CMC como un sustrato. At EG\_40 fue estable hasta 80°C. Las enzimas de referencia de *T. reesei* EGI (Cel7B) y EGII (Cel5A) retuvieron el 100% de su actividad hasta 60°C y 65°C, respectivamente.

Para la secuenciación de aminoácidos interna, la proteína EG\_40 de *Acremonium thermophilum* ALKO4245 (SEQ ID NO: 2) purificada se alquiló en primer lugar y se digirió en péptidos tripticos. Los péptidos generados se desalaron y separaron parcialmente por cromatografía nano líquida (fase inversa). Los péptidos internos se secuenciaron por ionización por electropulverización combinada con espectrometría de masa en tándem (ESI-MS/MS) usando el instrumento Q-TOF1 (Waters Micromass®). Las secuencias de péptidos internos así obtenidas se listan en la Tabla 1.

**Tabla 1. Secuencias de péptidos internos determinadas a partir de la celulasa EG\_40 de *Acremonium thermophilum***

| Péptido   | Secuencia         | SEQ ID NO: |
|-----------|-------------------|------------|
| Péptido 1 | QSCSSFPAPLKPGCQWR | 5          |
| Péptido 2 | YALTFNSGFPVAGK    | 6          |
| Péptido 3 | VQCPSELTSR        | 7          |
| Péptido 4 | NQPVFSCSADWQR     | 8          |
| Péptido 5 | YWDCCCKPSCGWPGK   | 9          |
| Péptido 6 | PTFT              | 10         |

### Ejemplo 3. Clonación de los genes *cel45A* y *cel45B* de *Acremonium thermophilum* (ALKO4245)

Se usaron métodos estándar de biología molecular en el aislamiento y tratamientos enzimáticos de ADN (plásmidos, fragmentos de ADN), en transformaciones de *E. coli*, etc. Los métodos básicos usados se describen en libros estándar de biología molecular, por ejemplo, Sambrook, J., *et al.*, 1989 y Sambrook J. y Russell, D.W., 2001.

La biblioteca genómica de *Acremonium thermophilum* ALKO4245 se construyó en el vector Lambda DASH@II (Stratagene, EEUU) según las instrucciones del fabricante. El ADN cromosómico, aislado por el método de Raeder y Broda, 1985, se digirió parcialmente con *Sau3A*. El ADN digerido se fraccionó por tamaño en un gel de agarosa y los fragmentos del tamaño elegido (aproximadamente 5-23 kb) se aislaron, desfosforilaron y ligaron a brazos del vector lambda digerido con *Bam*HI. La mezcla de ligación se empaquetó usando extractos de empaquetamiento Gigapack III Gold según las instrucciones del fabricante (Stratagene, EEUU). La titulación de la biblioteca genómica fue  $3,7 \times 10^5$  pfu/ml y la de la biblioteca amplificada fue  $4,2 \times 10^8$  pfu/ml.

Las secuencias de péptidos internos de la celulasa EG\_40 de *Acremonium thermophilum* purificada obtenidas como se describe en el Ejemplo 2 compartían homología con celulasas de la familia glicosil hidrolasa 45, tal como endoglucanasa de *Thielavia terrestris* (No. de Acceso de GenBank CQ827970) y celulasa Cel45A de *Melanocarpus albomyces* (No. de Acceso de GenBank AJ515703). Con el fin de amplificar una sonda para cribar el gen que codifica EG\_40 de *A. thermophilum* (*cel45A*: SEQ ID NO: 1) de la biblioteca genómica, se diseñaron cebadores degenerados sobre la base de las secuencias peptídicas listadas en la Tabla 1 (Ejemplo 2). El orden de los péptidos en la secuencia de proteína y la naturaleza con sentido o anti-sentido correspondiente de los cebadores se dedujeron de la comparación con la secuencia homóloga de Cel45A de *M. albomyces*. El cebador con sentido (TAYTGGGAYTGYTGYAARCC, SEQ ID NO: 11) se basa en los aminoácidos 1 a 6 del péptido 5 (SEQ ID NO: 9) y el cebador anti-sentido (RTTRTCNGCRTTYTGRAACCA, SEQ ID NO: 12) se basa en una secuencia peptídica (WFQNADN; SEQ ID NO: 13) de la proteína homóloga Cel45A de *M. albomyces*. Las mezclas de reacción de PCR contenían 50 mM Tris-HCl, pH 9,0, 15 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,1% Tritón X-100, 1,5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,1 mM dNTP, 0,5  $\mu\text{g}$  de

cada cebador, 1 unidad de ADN polimerasa Dynazyme EXT (Finnzymes, Finlandia), y aproximadamente 0,5 µg de ADN de *Acremonium*. Las condiciones para las reacciones de PCR fueron como sigue: 5 min desnaturalización inicial a 95°C, seguido de 30 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min de hibridación a 50-60°C, 2 min de extensión a 72°C y una extensión final a 72°C durante 10 min. Los productos de extensión se examinaron en un gel de agarosa.

- 5 Se obtuvieron dos productos de PCR de la reacción de PCR de *Acremonium*. Los fragmentos de ADN de aproximadamente 0,6 kb (SEQ ID NO: 14) y 0,8 kb (SEQ ID NO: 15) se aislaron del gel de agarosa y se clonaron en el vector pCR4-TOPO® TA (Invitrogen, EEUU) resultando en los plásmidos pALK1710 y pALK1711, respectivamente. Los productos de PCR clonados se caracterizaron por secuenciación y realizando hibridaciones de transferencias Southern (como se describe más adelante) con el ADN genómico de *Acremonium* digerido con varias enzimas de restricción. Los patrones de hibridación obtenidos con los dos fragmentos en condiciones de lavado astringentes sugieren que dos genes de endoglucanasa posibles podrían cribarse a partir de la biblioteca genómica de *Acremonium*. Las secuencias de aminoácidos deducidas a partir de ambos productos de PCR tienen homología con varias secuencias de endoglucanasa publicadas de la familia glicosil hidrolasa 45 (programa BLAST, National Center for Biotechnology Information; Altschul *et al.*, 1990).
- 10 El inserto del plásmido pALK1710 y pALK1711 se aisló por digestión con enzimas de restricción y se marcó con digoxigenina según las instrucciones del fabricante (Roche, Alemania). Aproximadamente 1-2 x 10<sup>5</sup> placas de la biblioteca genómica de *Acremonium* amplificada se transfirieron a filtros de nitrocelulosa y se cribaron por hibridación usando insertos marcados con digoxigenina. La temperatura para la hibridación fue 68°C y los filtros se lavaron 2 x 5 min a RT usando 2 x SSC-0,1% SDS seguido de 2 x 15 min a 68°C usando 0,1 x SSC-0,1% SDS. Se obtuvieron varias placas positivas, de las cuales se purificaron cinco placas con fuerte hibridación de ambos cribados. Los ADN de fago se aislaron y analizaron por hibridación de transferencia Southern. Los fragmentos de restricción de los ADN de fago que hibridaron con las sondas se subclonaron en el vector pBluescript II KS+ (Stratagene, EEUU) y las partes relevantes se secuenciaron. En ambos casos, el fragmento de fago subclonado contiene el gen de interés de longitud completa.
- 15 La Tabla 2 resume la información de las sondas usadas para el cribado de genes de endoglucanasa, clones de fago de los que se aislaron los genes, fragmentos de restricción elegidos que contienen los genes de longitud completa con sus regiones promotora y terminadora, nombres de los plásmidos que contienen el fragmento de fago subclonado, y los números de depósito en la colección de cultivos Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSM) para cepas de *E. coli* que portan estos plásmidos. Los depósitos se hicieron bajo el Tratado de Budapest.
- 20
- 25
- 30

**Tabla 2. Sondas usadas para la clonación de los genes de endoglucanasa, clones de fago y los subclones elegidos, nombres de plásmidos y el número de depósito correspondiente de las cepas de *E. coli***

| Gen             | Biblioteca genómica             | Sonda usada en el cribado | Clon de fago | Fragmento subclonado | Plásmido | No. de depósito de <i>E. coli</i> |
|-----------------|---------------------------------|---------------------------|--------------|----------------------|----------|-----------------------------------|
| At <i>ce45A</i> | <i>A. thermophilum</i> ALKO4245 | pALK1710                  | P24          | 5,5 kb <i>Sma</i> I  | pALK1908 | DSM 17324                         |
| At <i>ce45B</i> | <i>A. thermophilum</i> ALKO4245 | pALK1711                  | P41          | 6,0 kb <i>Xho</i> I  | pALK1904 | DSM 17323                         |

- 35 La información relevante de los dos genes, designados como At *ce45A* (SEQ ID NO: 1) y At *ce45B* (SEQ ID NO: 3) se resume en la Tabla 3 y de las secuencias de proteína deducidas respectivas, At EG\_40 (SEQ ID NO: 2) y semejante a At EG\_40 (SEQ ID NO: 4), en la Tabla 4. Las secuencias peptídicas de la endoglucanasa EG\_40 de *Acremonium* purificada se encontraron en la secuencia de aminoácidos deducida correspondiente del gen clonado confirmando que se clonó un gen apropiado.

- 40 El gen At *ce45A* de longitud completa (SEQ ID NO: 1) tiene una longitud de 1.076 pb, interrumpido por dos intrones de 59 pb y 123 pb, y codifica un polipéptido de 297 aminoácidos At EG\_40 (SEQ ID NO: 2). El sitio posible de escisión del péptido señal es después de Ala21, y el extremo N de la proteína madura empieza con Leu22, la proteína madura (incluyendo CBD) que comprende los aminoácidos 22 a 297 de SEQ ID NO: 2). La celulasa EG\_40 tiene un dominio de unión de carbohidrato consenso C-terminal que porta los aminoácidos Lys265 a Leu297 del polipéptido de longitud completa. La proteína madura predicha después de la escisión del péptido señal tiene un peso molecular y pI de 28.625 Da y 4,79, respectivamente (predicción hecha usando la herramienta Compute pI/MW en el servidor ExPASy, Gasteiger *et al.*, 2003). La proteína tiene dos posibles sitios de N-glicosilación N-X-S/T (predicho usando el programa NetNGlyc 1.0, Gupta *et al.*, 2004).
- 45

- Correspondientemente, el gen At *ce45B* de longitud completa (SEQ ID NO: 3) tiene una longitud de 1.013 pb, interrumpido por dos intrones de 155 pb y 102 pb, y codifica un polipéptido de 251 aminoácidos semejante a At EG\_40 (SEQ ID NO: 4). El sitio posible de escisión del péptido señal es después de Ala20, y el extremo N de la proteína madura empieza con Gln21, la proteína madura que comprende los aminoácidos 21 a 251 de SEQ ID NO: 4). La celulasa semejante a EG\_40 no tiene dominio de unión de carbohidrato consenso C-terminal. La proteína
- 50

madura predicha después de la escisión del péptido señal tiene un peso molecular y pI de 23.972 Da y 6,11 respectivamente (predicción hecha usando la herramienta Compute pI/MW en el servidor ExPASy, Gasteiger *et al.*, 2003). La proteína tiene dos posibles sitios de N-glicosilación N-X-S/T (predicho usando el programa NetNGlyc 1.0, Gupta *et al.*, 2004).

5 **Tabla 3. Resumen de los genes de endoglucanasa aislados de *Acremonium thermophilum* ALKO4245**

| Gen de endoglucanasa | Longitud con intrones (pb) <sup>(a)</sup> | Región codificadora (pb) <sup>(b)</sup> | No. de intrones | Longitudes de los intrones (pb) | SEQ ID NO: |
|----------------------|---|---|-----------------|---------------------------------|------------|
| At <i>cel45A</i>     | 1.076                                     | 891                                     | 2               | 59, 123                         | 1          |
| At <i>cel45B</i>     | 1.013                                     | 753                                     | 2               | 155, 102                        | 3          |

<sup>(a)</sup> Se incluye el codón de PARADA.

<sup>(b)</sup> No se incluye el codón de PARADA.

Tabla 4. Resumen de las secuencias de endoglucanasas deducidas de *Acremonium thermophilum* ALKO4245. ss, secuencia señal

| Proteína endoglucanasa | No. de aas | Longitud de NN/HMM <sup>(a)</sup> | CBD <sup>(b)</sup> | PM predicho (ss, no incl) <sup>(c)</sup> | Da, pl predicho (ss, no incl) | Sitios de glicosilación <sup>(d)</sup> | Sitios posibles N-glicosilación <sup>(d)</sup> | SEQ ID NO: |
|------------------------|------------|-----------------------------------|--------------------|--|-------------------------------|--|--|------------|
| At EG_40               | 297        | 21/21                             | Si; K265 a L297    | 28.625                                   | 4,79                          | 2                                      | 2  | 2          |
| Semejante a EG_40      | 251        | 20/20                             | No                 | 23.972                                   | 6,11                          | 2                                      | 4  | 4          |

<sup>(a)</sup> La predicción sobre la secuencia señal se hizo usando el programa SignalP V3.0 Nielsen *et al.*, 1997; Bendtsen *et al.*, 2004); el valor NN se obtuvo usando redes neurales y el valor HMM usando modelos ocultos de Markov.

<sup>(b)</sup> Presencia de un dominio de unión de carbohidrato en la proteína, los aminoácidos del CBD C-terminal se indican (numeración según el polipéptido de longitud completa)

<sup>(c)</sup> La secuencia señal predicha no se incluye. La predicción se hizo usando la herramienta Compute pI/MW en el servidor ExpASY (Gasteiger *et al.*, 2003).

<sup>(d)</sup> Los sitios de N-glicosilación posibles N-X-S/T se predijeron usando el programa NetNGlyc 1.0 (Gupta *et al.*, 2004, En preparación; [www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/](http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/)).

Las secuencias de proteína deducidas de las celulasas EG\_40 y semejante a EG\_40 de *A. thermophilum* son similares a celulasas de la familia glicosil hidrolasa 45 (Tabla 5). Las homologías de secuencia más cercanas encontradas para EG\_40/Cel45A y semejante a EG\_40/Cel45B fueron secuencias de endoglucanasa de *Thielavia terrestris* (No. de Acceso de GenBank CQ827970) y *Myceliophthora thermophila* (No. de Acceso de GenBank AR094305), respectivamente. Los alineamientos se realizaron usando el programa Needle del paquete de programas EMBOSS.

**Tabla 5. Comparación de las secuencias de proteína deducidas de las celulasas EG\_40 y semejante a EG\_40 de *Acremonium thermophilum* con sus equivalentes homólogos**

| Organismo, enzima, y número de acceso                         | Identidad (%) |
|---|---------------|
| <b><i>Acremonium thermophilum</i> EG_40</b>                   |               |
| <i>Thielavia terrestris</i> EG45, CQ827970                    | 77,3          |
| <i>Melanocarpus albomyces</i> Cel45, AJ515703                 | 75,3          |
| <i>Neurospora crassa</i> , hipotético XM_324477               | 68,9          |
| <i>Humicola grisea</i> var <i>thermoidea</i> , EGL3, AB003107 | 67,5          |
| <i>Humicola insolens</i> EG5, A23635                          | 67,3          |
| <i>Myceliophthora thermophila</i> fam 45, AR094305            | 57,9          |
| <b><i>Acremonium thermophilum</i> semejante a EG_40</b>       | 53,7          |
| <b><i>Acremonium thermophilum</i> semejante a EG_40</b>       |               |
| <i>Myceliophthora thermophila</i> fam 45, AR094305            | 66,9          |
| <i>Magnaporthe grisea</i> 70-15 hipotético, XM_363402         | 61,9          |
| <i>Thielavia terrestris</i> EG45, CQ827970                    | 56,8          |
| <b><i>Acremonium thermophilum</i> EG_40</b>                   | 53,7          |
| <i>Melanocarpus albomyces</i> Cel45, AJ515703                 | 52,8          |

#### 10 Ejemplo 4. Producción de celulasas EG\_40 y semejante a EG\_40 de *Acremonium thermophilum* en *Trichoderma reesei*

Se construyeron plásmidos de expresión para la producción de las celulasas recombinantes EG\_40/Cel45A y semejante a EG\_40/Cel45B de *A. thermophilum*. Ambos genes (*ce45A* o *ce45B*) incluyendo su propia secuencia señal, se fusionaron exactamente con el promotor de *cbh1* (*ce7A*) de *T. reesei* por PCR (Tabla 6). El promotor de *cbh1*, el terminador de *cbh1* y el gen marcador *amdS* se incluyeron como se describe en Paloheimo *et al.* 2003, *supra*. El casete de expresión lineal (Figura 1) se aisló del núcleo del vector por digestión con enzimas de restricción, se transformó en *T. reesei* A96 y los transformantes se seleccionaron con acetamida como la única fuente de nitrógeno. La cepa huésped carece de cuatro celulasas endógenas principales: CBHI/Cel7A, CBHII/Cel6A, EGI/Cel7B y EGII/Cel5A. Las transformaciones se realizaron según Penttilä *et al.*, 1987, con las modificaciones descritas en Karhunen *et al.*, 1993. Los transformantes se purificaron en placas de selección a través de conidio único antes de esporularlas en agar de extracto de patata.

**Tabla 6. Los casetes de expresión construidos para la producción de las celulasas EG\_40 y semejante a EG\_40 de *Acremonium thermophilum* en *Trichoderma reesei*. La estructura esquemática de los casetes de expresión se describe en la Figura 1**

| Endoglucanasa        | Plásmido de expresión | Tamaño del casete de expresión <sup>a</sup> | Terminador heterólogo <sup>b</sup> |
|----------------------|-----------------------|---|------------------------------------|
| At EG_40             | pALK1920              | 10,9 kb <i>NotI</i>                         | 156 pb ( <i>HindIII</i> )          |
| Semejante a At EG_40 | pALK1921              | 8,6 kb <i>EcoRI</i>                         | 282 pb ( <i>SspI</i> )             |

<sup>a</sup> El casete de expresión para la transformación de *T. reesei* se aisló del núcleo del vector por digestión con *EcoRI* y *NotI*.

<sup>b</sup> Se indica el número de nucleótidos después del codón de PARADA del gen clonado que están incluidos en el casete de expresión. El sitio de restricción en la región 3' del gen que se usó en la construcción del casete de expresión se indica entre paréntesis.

La producción de endoglucanasa de los transformantes se analizó a partir de los sobrenadantes del cultivo de cultivos en matraz agitado (50 ml). Los transformantes se crecieron durante 7 días en un medio inductor de celulosa complejo (Joutsjoki *et al.*, 1993) tamponado con 5%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  a pH 5,5. La actividad enzimática de la proteína recombinante se midió a partir del sobrenadante del cultivo como la liberación de azúcares reductores de carboximetilcelulosa (2% CMC) a 50°C en 50 mM Tampón citrato pH 4,8 esencialmente como se describe por Bailey, M. J. y Nevalainen, K.M.H., 1981; Haakana, H., *et al.*, 2004. La producción de la proteína recombinante también se detectó a partir del sobrenadante del cultivo por electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida. Se produjeron anticuerpos policlonales específicos de EG\_40 en conejos (Universidad de Helsinki, Finlandia). La expresión de celulasa EG\_40 se verificó por análisis de transferencia Western con anticuerpos anti-EG\_40 usando el

sistema de transferencia Western AP ProtoBlot (Promega). Los genotipos de los transformantes elegidos se analizaron por transferencia Southern usando el casete de expresión como una sonda.

El pH óptimo de las celulasas EG\_40/Cel45A y semejante a EG\_40/Cel45B producidas de forma heteróloga se determinó en el tampón universal de Mcllvaine con un intervalo de pH de 4,0-8,0 usando CMC como un sustrato. Como se muestra en la Figura 2A, el intervalo de pH de la celulasa EG\_40/Cel45A es relativamente amplio (4,5-6,0), siendo el óptimo a pH 5,5. El pH óptimo para semejante a EG\_40/Cel45B se determinó que era pH 5,0-5,5. La temperatura óptima para la actividad enzimática de las celulasas EG\_40/Cel45A y semejante a EG\_40/Cel45B se determinó que era 75-80°C y 60°C, respectivamente (Figura 2B). La estabilidad térmica de la celulasa EG\_40/Cel45A producida de forma heteróloga es comparable a la de la proteína purificada.

Los transformantes elegidos RF6118 (At EG\_40) y RF6071 (semejante a At EG\_40) se cultivaron en un biorreactor de 2 litros durante cuatro días (28°C, pH 4,2) para obtener material para los ensayos de aplicación (véanse los Ejemplos 8 a 13).

#### **Ejemplo 5. Construcción y producción de celulasas EG\_40 de *Acremonium thermophilum* modificadas**

Se usaron métodos estándar de biología molecular como se describe en el Ejemplo 3. La secuencia señal de la celulasa EG\_40 se reemplazó con la de CBHI de *Trichoderma reesei*. Se esperaba que el uso de la secuencia señal endógena del huésped mejorara la producción de proteína heteróloga. Con el fin de amplificar el fragmento 5' del gen At *cel45A* se diseñaron dos oligonucleótidos. El cebador con sentido (ATTAACCGCGGACTGCGCATCATGTATCGGAAGTTGGCCGTCATCTCGGCCTTCTTGCCACAGCTCGTGCC TCGACGGAAAGTCGAC, SEQ ID NO: 22) contiene la secuencia señal de *cel7A* de *T. reesei* y el cebador antisentido (TCGACTGCACCACCATGGTC, SEQ ID NO: 23) es específico para At *cel45A*. El gen de longitud completa se reconstituyó por ligación del producto de PCR amplificado como un fragmento *SacI*-*NcoI* con el extremo 3' del gen At *cel45A*.

Posteriormente, se modificó el dominio de unión de carbohidrato de EG\_40/Cel45A: Se prepararon tres construcciones que contenían el dominio catalítico de EG\_40/Cel45A (aminoácidos 22-234 de SEQ ID NO: 2) unidos a la región conectora y CBD bien de CBHI/*cel7A* de *Trichoderma reesei* (SEQ ID NO: 24), XYN60/*Xyn10A* de *Acremonium thermophilum* ALKO4245 (SEQ ID NO: 25), o CBHI/*cel7A* de *Chaetomium thermophilum* ALKO4265 (SEQ ID NO: 26). El conector y la región CBD del gen que codifica CBHI/*cel7A* de *T. reesei* (*cel7A*, SEQ ID NO: 27), el gen que codifica XYN60/*Xyn10A* de *A. thermophilum* ALKO4245 (*xyn10A*, SEQ ID NO: 28) o gen que codifica CBHI/*cel7A* de *C. thermophilum* ALKO4265 (*cel7A*, SEQ ID NO: 29) se amplificó por PCR usando combinaciones de oligonucleótidos de TTGGATCCGAGTCGCAGCGGCAACCCTAGCGGCGGCAAC (SEQ ID NO: 30) + TAATTCTGCAGTTACAGGCACTGAGAGTAG (SEQ ID NO: 31), o TTGGATCCGAGTCGCAGCGGCGGCAACCACCCCGTCAC (SEQ ID NO: 32) + TAATTCTGCAGTCACAGGCACTGAGAGTACCAGT (SEQ ID NO: 33), o TAATTTACGTACCTGGCCTTGACGGCAG (SEQ ID NO: 34) + ATTAAGTGCAGTTACAGGCACTGTTGAGCA (SEQ ID NO: 35), respectivamente. Los productos de PCR amplificados se ligaron en el gen *cel45A* para crear los genes At *cel45A*\_Tr *cel7A*conectorCBD (SEQ ID NO: 36), At *cel45A*\_At *xyn10A*conectorCBD (SEQ ID NO: 37), o At *cel45A*\_Ct *cel7A*conectorCBD (SEQ ID NO: 38). Los plásmidos resultantes se designaron como pALK2022, pALK2024, y pALK2026. Los números de depósito de las cepas de *E. coli* correspondientes en la colección de cultivos Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH son DSM 18815, DSM 18816, y DSM 18817, respectivamente. Los depósitos se hicieron bajo el Tratado de Budapest.

Se construyeron plásmidos de expresión para la producción de proteínas EG\_40/Cel45A modificadas y las proteínas recombinantes EG\_40\_TrCBD (SEQ ID NO: 39), EG\_40\_AtCBD (SEQ ID NO: 40), y EG\_40\_CtCBD (SEQ ID NO: 41) se produjeron en *Trichoderma* como se describe en el Ejemplo 4. La temperatura y pH óptimos de las celulasas EG\_40/Cel45A modificadas fue similar a los de la proteína de tipo salvaje. Los transformantes elegidos RF6828 (EG\_40\_TrCBD), RF6835 (EG\_40\_AtCBD), y RF6821 (EG\_40\_CtCBD) se cultivaron en un biorreactor de 2 litros durante cuatro días (28°C, pH 4,2) para obtener material para los ensayos de aplicación (Ejemplos 9 y 13).

#### **Ejemplo 6. Construcción y producción de celulasas EG\_40 de *Acremonium thermophilum* ALKO4245 que carecen del dominio de unión de carbohidrato o dominio de unión de carbohidrato más la región conectora**

Para producir celulasas EG\_40 de *Acremonium thermophilum* ALKO4245 que carecen del dominio de unión de carbohidrato (CBD), At *cel45A*\_CBDmenos, o el CBD más la región conectora, At *cel45A*\_conectorCBDmenos, se hicieron dos construcciones de delección *cel45A*; la primera carecía de la región que codifica el CBD y la segunda carecía además de la región conectora entre el núcleo catalítico y el dominio de unión de carbohidrato.

Se usaron métodos estándar de biología molecular como se describe en el Ejemplo 3. Se amplificaron dos fragmentos 3' de diferente longitud del gen *cel45A* por PCR. Los cebadores antisentido se diseñaron para excluir la región CBD o conector+CBD del producto. Un producto de PCR amplificado con los cebadores GCAGCAACCAGTTCGACCTC (SEQ ID NO: 42) y TTAAGTGCAGTCACTGGGCACTGCAGCCACCGCCTC (SEQ ID NO: 43) se ligó con un fragmento *SacI*-*PstI* y otro fragmento de PCR amplificado con los cebadores ACTGCTGCAAGCCGTCCTGC (SEQ ID NO: 44) y TTAAGTGCAGTCAACCCTAGGCGGTTGAAGACGGGATAG (SEQ ID NO: 45) como un fragmento *NcoI*-*PstI* al fragmento 5' del gen *cel45A* para reconstituir los genes de longitud

completa At *ce45A\_CBD*menos (SEQ ID NO: 16) y At *ce45A\_conectorCBD*menos (SEQ ID NO: 18), respectivamente. Los plásmidos resultantes se designaron pALK2009 y pALK2014. Los números de depósito de las cepas de *E. coli* correspondientes en la colección de cultivos Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH son DSM 18813, y DSM 18814, respectivamente. Los depósitos se hicieron bajo el Tratado de Budapest.

Se construyeron plásmidos de expresión para la producción de las versiones CBDmenos y conectorCBDmenos de la celulasa EG\_40/Cel45A de *A. thermophilum* y las proteínas recombinantes (SEQ ID NO: 17 y 19, respectivamente) se produjeron en *Trichoderma* como se describe en el Ejemplo 4.

**Ejemplo 7. Construcción y producción de la proteína de fusión recombinante semejante a EG\_40+CBD de *Acremonium thermophilum* ALKO4245**

Para producir una proteína de fusión recombinante semejante a EG\_40+CBD de *Acremonium thermophilum* ALKO4245 (SEQ ID NO: 21), el dominio de unión de carbohidrato (CBD) de la celulasa EG\_40/Cel45A se une a la celulasa semejante a EG\_40. La construcción contiene el dominio catalítico de semejante a EG\_40 (aminoácidos 1-242 del polipéptido de longitud completa) unidos a la región conectora y CBD de celulasa EG\_40 (aminoácidos 235-297 del polipéptido de longitud completa).

Se usan métodos estándar de biología molecular como se describe en el Ejemplo 3. En primer lugar, se introduce un único sitio de restricción *NruI* cerca del extremo C-terminal de la secuencia semejante a EG\_40 por PCR. Esto permite la fusión directa de cualquier ADN con extremos romos después del aminoácido S242 del polipéptido semejante a EG\_40. La región conector+CBD del gen que codifica EG\_40 (*ce45A*) se amplifica por PCR y un fragmento de restricción de éste se liga al gen *ce45B* (después de S242) para crear At *ce45B\_ce45AconectorCBD* (SEQ ID NO: 20). Se construye un plásmido de expresión para la producción de la celulasa semejante a EG\_40CBD y la proteína recombinante (SEQ ID NO: 21) se produce en *Trichoderma* como se describe en el Ejemplo 4.

**Ejemplo 8. Rendimiento de la preparación de celulasa EG\_40 en el acabado de tela vaquera a diferentes temperaturas**

La celulasa EG\_40 de *Acremonium thermophilum* de la cepa RF6118 producida usando *Trichoderma reesei* como huésped como se describe en el Ejemplo 4 se ensayó para su capacidad de crear un aspecto desgastado similar al proporcionado por piedras pómez en el biolavado a la piedra de tela vaquera a diferentes temperaturas. Una preparación comercial enriquecida en EGII producida usando *Trichoderma* como huésped (US 5.874.293) eficiente en acabado de tela vaquera se usó para comparación a 50°C.

Los pantalones vaqueros hechos de tela vaquera de sarga teñida con Índigo se usaron como material de ensayo después de desaprestado con alfa-amilasa ECOSTONE® A200. Los tratamientos con celulasa se realizaron con lavador extractor Wascator FOM 71 CLS de Electrolux bajo las condiciones descritas en la Tabla 7.

El concentrado de enzima estabilizado enriquecido en EGII se dosificó a 0,23% en peso de la tela, que es la dosificación típica para la preparación en aplicaciones industriales. Una preparación de EG\_40 concentrada y estabilizada obtenida de fermentación piloto se dosificó a 0,18%. Cuando se calcula [como proteína] en términos del contenido de proteína, las dosificaciones fueron aproximadamente 0,20 mg y 0,035 mg por g de tela usando el Reactivo de Tinción del Ensayo de Proteínas Bio-Rad (BioRad, Hercules, CA; EEUU) y gammaglobulina bovina como el estándar. La enzima celulasa se inactivó después de drenaje elevando el pH por encima de 11 mediante una adición de 5 g de NaOH (10 min, 40°C) y aclarando tres veces. Los pantalones vaqueros se secaron en una secadora.

El efecto de biolavado a la piedra/nivel de abrasión se evaluó midiendo el color como valores de reflectancia con espectrofotómetro Minolta CM 2500 usando coordenadas espaciales de color L\*a\*b\* (iluminante D65/2°). El color del lado frontal y el lado reverso de la tela vaquera se midió después de desaprestado (es decir, antes del tratamiento con celulasa) y después del tratamiento con celulasa. Cada valor de medida en el lado frontal de la tela vaquera fue un promedio de aproximadamente 40 medidas. Se usaron dos pares de pantalones vaqueros en cada ensayo y el resultado final fue el promedio de éstos. Los resultados se muestran en la Tabla 8 y Fig. 3.

**Tabla 7. Las condiciones de ensayo/parámetros del proceso usadas en los tratamientos con celulasa**

| Parámetro del proceso    |                                  |
|--------------------------|----------------------------------|
| Carga de tela vaquera    | 1,3-1,4 kg                       |
| Agua                     | 19 litros                        |
| Control de pH (pH 5-5,3) | 5 ml de Ácido acético (80%)      |
| Tiempo                   | 45 min                           |
| Temperatura              | 40, 50, 60, ó 70°C               |
| Dosificación de celulasa | 0,18% ó 0,23% en peso de la tela |

Tabla 8. Medidas de color del lado frontal de tela vaquera tratada con preparación de EG\_40 a diferentes temperaturas

| Preparación de enzima      | Dosificación,<br>%owf <sup>a)</sup> | Proteína,<br>mg/g de tela | Temp., °C | Antes del tratamiento con<br>celulasa |        | Después del tratamiento con<br>celulasa |        | Incremento<br>de L* |
|----------------------------|-------------------------------------|---------------------------|-----------|---------------------------------------|--------|---|--------|---------------------|
|                            |                                     |                           |           | L*                                    | b*     | L*                                      | b*     |                     |
| Conc. enriquecido en EGill | 0,23                                | 0,20                      | 50        | 22,24                                 | -15,57 | 30,08                                   | -17,64 | 7,84                |
| Conc. de EG 40             | 0,18                                | 0,035                     | 70        | 21,88                                 | -15,54 | 31,07                                   | -16,76 | 9,20                |
| Conc. de EG 40             | 0,18                                | 0,035                     | 60        | 22,21                                 | -15,40 | 34,16                                   | -16,34 | 11,95               |
| Conc. de EG 40             | 0,18                                | 0,035                     | 50        | 22,00                                 | -15,22 | 30,10                                   | -17,26 | 8,10                |
| Conc. de EG 40             | 0,18                                | 0,035                     | 40        | 22,13                                 | -14,98 | 27,26                                   | -17,50 | 5,13                |

a) en peso de la tela.

El tratamiento con la preparación enriquecida en EGill se usó para comparación a 50°C. L\* indica la claridad, -b\* es la dirección azul, +b\* es la dirección amarilla.

Los resultados en la Tabla 8 y Fig. 3 muestran que el efecto biolavado a la piedra de EG\_40 fue muy bueno a un intervalo bajo de dosificación. Con la preparación EG\_40 se obtuvo un nivel de abrasión similar (claridad L\*) comparado con la preparación enriquecida en EGII a 50°C con una cantidad 6 veces menor de proteína.

**Ejemplo 9. Rendimiento de celulasas EG\_40 modificadas en el acabado de tela vaquera**

5 Las celulasas EG\_40 de *Acremonium thermophilum* modificadas producidas en *Trichoderma reesei* como se describe en el Ejemplo 5 se ensayaron para su capacidad de crear un aspecto desgastado similar al proporcionado por piedras pómez en biolavado a la piedra de tela vaquera. Las proteínas recombinantes EG\_40\_TrCBD, EG\_40\_AtCBD, y EG\_40\_CtCBD se compararon con celulasa EG\_40 de tipo salvaje (Ejemplo 4).

10 Las perneras de tela vaquera hechas de telas vaqueras teñidas con Índigo de diferente tipo se usaron como material de ensayo después de desaprestado con alfa-amilasa ECOSTONE® A200. Los tratamientos con celulasa se realizaron con lavador extractor Wascator FOM 71 CLS de Electrolux bajo las condiciones descritas en la Tabla 9.

15 Las preparaciones de celulasa se dosificaron a 200 nkat/g en peso de la tela. La actividad endoglucanasa se midió como en el Ejemplo 4, excepto que se usó 3% CMC y 60°C. La enzima celulasa se inactivó después de drenaje elevando el pH por encima de 11 mediante una adición de 4,2 g de NaOH (10 min, 40°C) y aclarando tres veces. Las perneras de tela vaquera se secaron en una secadora.

El efecto de biolavado a la piedra/nivel de abrasión se evaluó midiendo el color en el lado frontal de la tela vaquera como en el Ejemplo 8. Cada valor de medida en el lado frontal de la pernera de tela vaquera fue un promedio de aproximadamente 20 medidas. El resultado final fue el promedio de tres telas vaqueras diferentes de Ukos Sport, Bélgica (Intrigue, Atlanta, Nostalg). Los resultados se muestran en la Tabla 10.

20 **Tabla 9. Las condiciones de ensayo/parámetros del proceso usadas en los tratamientos con celulasa**

| Parámetro del proceso    |  |
|--------------------------|--|
| Carga de tela vaquera    | 1,1 kg   |
| Agua                     | 17 litros  |
| Control de pH (pH 5)     | 27 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O + 19 g de ácido cítrico |
| Tiempo                   | 55 min   |
| Temperatura              | 60°C   |
| Dosificación de celulasa | 200 nkat/g de tela   |

**Tabla 10. Medidas de color del lado frontal de tela vaquera tratada con diferentes celulasas EG\_40 a 60°C y pH 5**

| Celulasa           | Tela vaquera    | Dosificación nkat/g <sup>a)</sup> | Antes del tratamiento con celulasa <sup>b)</sup> |               | Después del tratamiento con celulasa <sup>b)</sup> |               | Incremento de L* |
|--------------------|-----------------|-----------------------------------|--|---------------|--|---------------|------------------|
|                    |                 |                                   | L*   | b             | L*   | b             |                  |
| <b>EG_40_TrCBD</b> | Intrigue        |                                   | 20,56  | -9,88         | 26,43  | -12,22        | 5,87             |
|                    | Atlanta         |                                   | 21,22  | -16,41        | 25,99  | -18,40        | 4,77             |
|                    | Nostalg         |                                   | 19,70  | -10,26        | 24,49  | -13,11        | 4,79             |
|                    | <b>Promedio</b> | 200                               | <b>20,49</b>                                     | <b>-12,18</b> | <b>25,64</b>                                       | <b>-14,58</b> | <b>5,14</b>      |
|                    |                 |                                   |  |               |  |               |                  |
| <b>EG_40_AtCBD</b> | Intrigue        |                                   | 20,63  | -10,01        | 27,08  | -12,61        | 6,45             |
|                    | Atlanta         |                                   | 21,26  | -16,6         | 27,11  | -18,41        | 5,85             |
|                    | Nostalg         |                                   | 19,56  | -10,08        | 24,18  | -13,24        | 4,62             |
|                    | <b>Promedio</b> | 200                               | <b>20,48</b>                                     | <b>-12,23</b> | <b>26,12</b>                                       | <b>-14,75</b> | <b>5,64</b>      |
|                    |                 |                                   |  |               |  |               |                  |
| <b>EG_40_CtCBD</b> | Intrigue        |                                   | 20,58  | -9,91         | 26,97  | -11,94        | 6,39             |
|                    | Atlanta         |                                   | 21,19  | -16,45        | 26,61  | -18,06        | 5,42             |
|                    | Nostalg         |                                   | 19,70  | -10,17        | 23,71  | -12,53        | 4,01             |
|                    | <b>Promedio</b> | 200                               | <b>20,49</b>                                     | <b>-12,18</b> | <b>25,76</b>                                       | <b>-14,18</b> | <b>5,27</b>      |
|                    |                 |                                   |  |               |  |               |                  |
| <b>EG_40</b>       | Intrigue        |                                   | 20,59  | -9,76         | 26,56  | -12,24        | 5,97             |
|                    | Atlanta         |                                   | 21,26  | -16,59        | 16,83  | -18,52        | 5,57             |
|                    | Nostalg         |                                   | 19,61  | -10,12        | 24,32  | -13,09        | 4,71             |
|                    | <b>Promedio</b> | 200                               | <b>20,49</b>                                     | <b>-12,16</b> | <b>25,90</b>                                       | <b>-14,62</b> | <b>5,42</b>      |
|                    |                 |                                   |  |               |  |               |                  |

<sup>a)</sup> en peso de la tela

25 <sup>b)</sup> L\* indica la claridad, -b\* es la dirección azul, +b\* es la dirección amarilla.

Los resultados en la Tabla 10 muestran que el efecto biolavado a la piedra de las preparaciones de EG\_40 modificada fue comparable con el obtenido usando la preparación de EG\_40 que contenía celulasa de tipo salvaje.

**Ejemplo 10. Refuerzo del rendimiento de lavado de preparación de enzima enriquecida en EGII con celulasa EG\_40 en acabado de tela vaquera**

5 El efecto de la celulasa EG\_40 con preparación enriquecida en EGII se ensayó en biolavado a la piedra de tela vaquera. La tela vaquera y el sistema de ensayo fueron como en el Ejemplo 8, excepto para la temperatura, que fue 50°C. También se evaluó el efecto del tratamiento con celulasa como en el Ejemplo 8. Las preparaciones de enzima se dosificaron a 3-5 gramos resultando en 0,22-0,38% en peso de la tela (Tabla 11).

10 Los resultados en la Tabla 11 y Fig. 4 muestran que EG\_40 también puede usarse para mejorar el efecto de abrasión de una preparación enriquecida en EGII. Con la preparación enriquecida en EGII solo, no pudieron obtenerse niveles similares de claridad a los obtenidos por la mezcla que contiene 70% del concentrado enriquecido en EGII y 30% de concentrado de celulasa EG\_40 incluso con una dosificación incrementada.

Tabla 11. Medidas de color del lado frontal de tela vaquera tratada a 50°C con mezcla de preparaciones enriquecidas en EGII y de EG\_40 comparado con enriquecida en EGII sola

| Preparación de enzima     | Dosificación,<br>g | Dosificación,<br>% owf <sup>a)</sup> | Antes de tratamiento con celulasa <sup>b)</sup> |        | Después de tratamiento con celulasa <sup>b)</sup> |        | Incremento de claridad |
|---------------------------|--------------------|--------------------------------------|---|--------|---|--------|------------------------|
|                           |                    |                                      | L*  | b*     | L*  | b*     |                        |
| Conc. enriquecido en EGII | 5                  | 0,38                                 | 22,32   | -15,47 | 31,72   | -17,50 | 9,40                   |
| Conc. enriquecido en EGII | 3                  | 0,23                                 | 22,24   | -15,57 | 30,08   | -17,64 | 7,84                   |
| Mezcla EGII+EG_40 70%+30% | 4,3                | 0,33                                 | 22,20   | -15,53 | 32,31   | -17,46 | 10,11                  |
| Mezcla EGII+EG_40 70%+30% | 3                  | 0,22                                 | 22,18   | -15,74 | 32,03   | -17,55 | 9,85                   |

a) en peso de la tela

b) L\* indica la claridad, -b\* es la dirección azul, +b\* es la dirección amarilla.

**Ejemplo 11. Rendimiento de preparación de celulasa semejante a EG\_40 en el acabado de tela vaquera**

5 El líquido de fermentación de semejante a EG\_40 de la cepa RF6071 producido como se describe en el Ejemplo 4 se comparó con un concentrado enriquecido en EGII en el biolavado a la piedra de tela vaquera. La tela vaquera y el sistema de ensayo para biolavado a la piedra fueron como en el Ejemplo 8, excepto para la temperatura, que fue 60°C y la cantidad de tela vaquera, que se niveló a 1.430 g con una pieza extra de tela vaquera diferente que no se incluyó en las medidas. También se evaluó el efecto del tratamiento con celulasa como en el Ejemplo 8.

Los resultados en la Tabla 12 muestran que el efecto de abrasión de semejante a EG\_40 se obtuvo con menos retro-tinción (re-deposición de tinte Índigo) en el lado reverso de la tela vaquera. Especialmente, la claridad de los bolsillos fue mayor y fueron menos azules.

Tabla 12. Medidas de color del lado frontal y reverso de tela vaquera y bolsillos tratados a 60°C con preparación semejante a EG\_40

| Preparación de enzima | Dosificación | Prot., mg/g tela | Antes de tratamiento con celulasa |        | Después de tratamiento con celulasa |        | deltaL* | deltab* |
|-----------------------|--------------|------------------|-----------------------------------|--------|-------------------------------------|--------|---------|---------|
|                       |              |                  | L*                                | b*     | L*                                  | b*     |         |         |
| <b>Lado frontal:</b>  |              |                  |                                   |        |                                     |        |         |         |
| semejante a EG 40     | 100 ml       | 0,32             | 23,78                             | -16,20 | 31,09                               | -17,36 | 7,31    | -1,16   |
| enriquecido en EGII   | 1,5 g        | 0,095            | 23,64                             | -16,28 | 31,09                               | -17,39 | 7,45    | -1,11   |
| <b>Lado reverso:</b>  |              |                  |                                   |        |                                     |        |         |         |
| semejante a EG 40     | 100 ml       | 0,32             | 49,24                             | -7,34  | 47,74                               | -11,39 | -1,50   | -4,05   |
| enriquecido en EGII   | 1,5 g        | 0,095            | 49,32                             | -6,97  | 47,24                               | -11,78 | -2,09   | -4,81   |
| <b>Bolsillos:</b>     |              |                  |                                   |        |                                     |        |         |         |
| semejante a EG 40     | 100 ml       | 0,32             | 75,42                             | -8,78  | 66,39                               | -13,20 | -9,03   | -4,42   |
| enriquecido en EGII   | 1,5 g        | 0,095            | 76,63                             | -7,95  | 64,41                               | -13,91 | -12,22  | -5,96   |

El tratamiento con la preparación enriquecida en EGII se usó para comparación. L\* indica la claridad, -b\* es la dirección azul, +b\* es la dirección amarilla.

**Ejemplo 12. Rendimiento de preparación de EG\_40 y enriquecida en EGII reforzada con EG\_40 en bioacabado (desfrisado)**

La capacidad de la preparación concentrada de EG\_40 RF6118 y la capacidad de la preparación enriquecida en EGII reforzada con EG\_40 en desfrisado de prenda de punto de algodón se compararon con una preparación comercial enriquecida en EGII, usada típicamente en formulaciones de bioacabado. Los tratamientos con celulasa se realizaron con el lavador extractor Wascator FOM 71 CLS de Electrolux bajo las condiciones descritas en la Tabla 13.

Se usaron como material de ensayo piezas de dos clases de suéteres con cuello polo azules de baja calidad con superficie pilosa, hechos de tela basada en jersey 100% algodón o canalé hecho de 95% algodón y 5% licra. El material de relleno se añadió hasta 1 kg. Las muestras se pre-lavaron en primer lugar durante 10 min a 60°C con 1 ml/l de agentes tensioactivos/humectantes (Sandoclean PCJ de Sandos e Imacol CN de Clariant) y se aclaró 3 veces. Después de esto, las prendas de punto de algodón se trataron con celulasa a 60°C durante 60 minutos en presencia de los mismos auxiliares textiles que los usados en el pre-lavado. La enzima se inactivó como se describe en el Ejemplo 8, excepto por la temperatura que fue 60°C durante el aclarado alcalino, y las piezas de prensa de punto se aclararon tres veces y se secaron en la secadora.

**Tabla 13. Las condiciones de ensayo/parámetros del proceso usadas en los tratamientos de bioacabado**

| Parámetro del proceso           |   |
|---------------------------------|---|
| Carga de tela                   | 1,0 kg                                      |
| Agua                            | 15 litros                                   |
| Sandoclean PCJ e Imacol CN      | 1 ml/l                                      |
| Tampón/control de pH (pH 5-5,3) | aproximadamente 3 ml de Ácido acético (80%) |
| Tiempo                          | 60 min                                      |
| Temperatura                     | 60°C  |
| Dosificación de celulasa        | 0,04% a 0,63% en peso de la tela            |

El efecto del tratamiento con celulasa se evaluó visualmente a simple vista y con una lupa. La muestra pre-lavada sin enzima se usó como control. Los resultados se muestran en la Tabla 14 y las fotos de cámara digital tomadas con un macroobjetivo se muestran en la Fig. 5.

La preparación EG\_40 y la preparación enriquecida en EGII reforzada con EG\_40 tuvieron excelentes propiedades de desfrisado comparado con a preparación comercial enriquecida en EGII que se usó a un intervalo de dosificación típico para este concentrado de enzima en la aplicación de bioacabado. Con la preparación EG\_40, podía usarse una dosificación al menos 8 veces menor y con la mezcla enriquecida en EGII-EG\_40 dosificaciones al menos 4 veces menores que con la preparación EGII para obtener un efecto similar.

Los niveles de proteína en el sobrenadante del cultivo en el biorreactor son de alguna manera menores con la cepa RF6118 que la cepa productora *Trichoderma* de la preparación enriquecida en EGII, cuando se ensaya con el ensayo de determinación de proteínas usado. A pesar de esto, el medio de cultivo de EG\_40 es volumétricamente al menos 4-6 veces más efectivo en bioacabado.

**Tabla 14. Los resultados de tratamientos de bioacabado con preparaciones de EG\_40 y enriquecidas en EGII reforzadas con EG\_40 comparado con enriquecida en EGII sola**

| Muestra                                     | Dosificación, g | Dosificación, % owf <sup>a)</sup> | Efecto desfrisado <sup>b)</sup> | Prot mg/g de tela |
|---|-----------------|-----------------------------------|---------------------------------|-------------------|
| Conc. enriquecido en EGII                   | 6,3             | 0,63                              | +++++                           | 0,55              |
| Conc. enriquecido en EGII                   | 3,2             | 0,32                              | +++                             | 0,27              |
| Mezcla de enriquecido en EGII+EG_40 70%+13% | 3,2             | 0,32                              | +++++                           | 0,21              |
| Mezcla de enriquecido en EGII+EG_40 70%+13% | 1,6             | 0,16                              | +++++                           | 0,10              |
| Mezcla de enriquecido en EGII+EG_40 70%+13% | 0,8             | 0,08                              | +++                             | 0,052             |
| Conc. EG_40                                 | 1,6             | 0,16                              | +++++                           | 0,050             |
| Conc. EG_40                                 | 0,8             | 0,08                              | +++++                           | 0,025             |
| Conc. EG_40                                 | 0,4             | 0,04                              | +++                             | 0,012             |
| Prelavado sólo, sin enzima                  | -               | -                                 | -                               | -                 |

a) en peso de la tela.

b) +++++ Excelente efecto desfrisado, visualmente superficie muy limpia

+++ Buen efecto desfrisado, visualmente superficie relativamente limpia

- Presencia de pelusa densa en la superficie/y o frisado severo.

**5 Ejemplo 13. rendimiento de celulasas EG\_40 modificadas en bioacabado (desfrisado)**

10 Las celulasas EG\_40 de *Acremonium thermophilum* modificadas producidas en *Trichoderma reesei* como se describe en el Ejemplo 5 se ensayaron para su capacidad de desfrisado de prendas de punto de algodón. Las proteínas recombinantes EG\_40\_TrCBD, EG\_40\_AtCBD, y EG\_40\_CtCBD se compararon con celulasa EG\_40 de tipo salvaje. Los tratamientos con celulasa se realizaron con lavador extractor Wascator FOM 71 CLS de Electrolux bajo las condiciones descritas en el Ejemplo 12, excepto que la enzima se dosificó a 83 nkat/g de tela. La actividad endoglucanasa se midió como se describe en el Ejemplo 9.

15 Se usaron como material de ensayo piezas de tres diferentes prendas de punto con superficie pilosa, hechas de 100% algodón ó 95% algodón y 5% licra. El material de relleno se añadió hasta 1 kg. Las muestras se trataron como se describe en el Ejemplo 12. El efecto del tratamiento con celulasa se evaluó visualmente a simple vista o con una lupa. La muestra pre-lavada sin enzima se usó como control. Los resultados se muestran en la Tabla 15.

Todas las preparaciones EG\_40 tuvieron excelentes propiedades de desfrisado dando lugar a una reducción extensa de pelusa y prevención de la formación de bolitas. Las muestras control, tratadas sin enzima contenían pelusa densa en la superficie y frisado severo.

20 Los ensayos preliminares realizados a 50°C y 30 min usando una dosificación de enzima de 42 nkat/g de tela mostraron que todas las diferentes celulasas EG\_40 tenían también un efecto desfrisado considerable, cuando se usan dosificaciones menores y/o tiempo de reacción menor.

**Tabla 15. Los resultados de tratamientos de bioacabado con diferentes celulasas EG\_40**

| Muestra           | Dosificación, nkat/g de tela | Efecto desfrisado |
|-------------------|------------------------------|-------------------|
| EG_40_TrCBD       | 83                           | +++++             |
| EG_40_AtCBD       | 83                           | +++++             |
| EG_40_CtCBD       | 83                           | +++++             |
| EG_40             | 83                           | +++++             |
| Lavado sin enzima | -                            | -                 |

+++++ Excelente efecto desfrisado, visualmente superficie muy limpia

- Presencia de pelusa densa en la superficie/y o frisado severo

**Lista de organismos depositados**

*Acremonium thermophilum* ALKO4245 se depositó en el Centralbureau Voor Schimmelcultures en Uppsalalaan 8, 3584 CT, Utrecht, Holanda (CBS) el 20 de sep, 2004 bajo CBS 116240.

5 *Escherichia coli* que contiene el plásmido pALK1908 se depositó en Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Mascheroder Weg 1 b, D-38124 Braunschweig, Alemania el 13 de mayo, 2005 bajo DSM 17324.

*Escherichia coli* que contiene el plásmido pALK1904 se depositó en Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Mascheroder Weg 1 b, D-38124 Braunschweig, Alemania el 13 de mayo, 2005 bajo DSM 17323.

10 *Escherichia coli* que contiene el plásmido pALK2009 se depositó en Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Mascheroder Weg 1 b, D-38124 Braunschweig, Alemania el 24 de noviembre, 2006 bajo DSM 18813.

15 *Escherichia coli* que contiene el plásmido pALK2014 se depositó en Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Mascheroder Weg 1 b, D-38124 Braunschweig, Alemania el 24 de noviembre, 2006 bajo DSM 18814.

*Escherichia coli* que contiene el plásmido pALK2022 se depositó en Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Mascheroder Weg 1 b, D-38124 Braunschweig, Alemania el 24 de noviembre, 2006 bajo DSM 18815.

20 *Escherichia coli* que contiene el plásmido pALK2024 se depositó en Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Mascheroder Weg 1 b, D-38124 Braunschweig, Alemania el 24 de noviembre, 2006 bajo DSM 18816.

*Escherichia coli* que contiene el plásmido pALK2026 se depositó en Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Mascheroder Weg 1 b, D-38124 Braunschweig, Alemania el 24 de noviembre, 2006 bajo DSM 18817.

25

## REFERENCIAS

Altschul SF, W Gish, W Miller, EW Myers y DJ Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215:403-410.

Bailey MJ y KMH Nevalainen 1981. Induction, isolation and testing of stable *Trichoderma reesei* mutants with improved production of solubilizing cellulase. *Enz Microbiol Technol.* 3: 153-157.

Bendtsen JD, H Nielsen, G von Heijne y S Brunak. 2004. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J. Mol.Biol.* 340:783-795.

Gasteiger, E, A Gattiker, C Hoogland, I Ivanyi, RD Appel y A Bairoch. 2003. ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res.* 31:3784-3788.

Gupta, R., E. Jung y S. Brunak. 2004. Prediction of N-glycosylation sites in human proteins, **En preparación.**  
[www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/](http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/)

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

Haakana H, A Miettinen-Oinonen, V Joutsjoki, A Mäntylä, P Suominen, y J Vehmaanperä. 2004. Cloning of cellulase genes from *Melanocarpus albomyces* and their efficient expression in *Trichoderma reesei*. *Enz Microbiol Technol.* 34: 159-167.

Henrissat B. (1991) A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* 280: 309-316.

Henrissat B. y Bairoch A. (1993) New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* 293: 781-788.

Henrissat B. y Bairoch A. (1996).Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. *Biochem. J.* 316: 695-696

IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) (1987). Measurement of cellulase activities. *Pure and Appl. Chem.* 59:257-268.

Joutsjoki, VV, TK Torkkeli y KMH Nevalainen. 1993. Transformation of *Trichoderma reesei* with the *Hormoconis resinae* glucoamylase P (*gamP*) gene: production of a heterologous glucoamylase by *Trichoderma reesei*. *Curr. Genet.* 24:223-228.

Karhunen T, A Mäntylä, KMH Nevalainen y PL Suominen. 1993. High frequency one-step gene replacement in *Trichoderma reesei*. I. Endoglucanase I overproduction. Mol. Gen. Genet. 241:515-522.

Lowry OH, NJ Roseborough, AL Farr y RJ Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol Chem 193: 265-275.

Malardier L, Daboussi MJ, Julien J, Roussel F, Scazzocchio C y Brygoo Y. 1989. Cloning of the nitrate reductase gene (*niaD*) of *Aspergillus nidulans* and its use for transformation of *Fusarium oxysporum*. Gene 15:147-156.

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

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

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

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

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

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

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

Sambrook J, EF Fritsch y T Maniatis. 1989. Molecular cloning, a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, **Nueva York, EEUU.**

Sambrook J y DW Russell. 2001. Molecular cloning, a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, **Nueva York, EEUU.**

Ward M, Shan W, Dauberman J, Weiss G, Larenas E, Bower B, Rey M, Clarkson K y Bott R. (1993) Cloning, sequence and preliminary structural analysis of a small, high pl endoglucanase (EGIII) from *Trichoderma reesei*. **Actas del segundo simposio TRICEL sobre TRICHODERMA REESEI CELLULASES AND OTHER HYDROLASES**, Espoo, Finlandia, 1993 ed. por P. Suominen and T. Reinikainen. Foundation for Biotechnical and Industrial Fermentation Research 8 (1993): 153-158.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> AB Enzymes Oy  
 <120> Enzimas nuevas  
 5 <130> 2052060PC  
 <160> 45  
 10 <170> PatentIn versión 3.2  
 <210> 1  
 <211> 2334  
 <212> DNA  
 15 <213> Acremonium thermophilum  
 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (13) .. (13)  
 20 <223> n significa a, t, c, o g  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (715)..(797)  
 25 <220>  
 <221> Intrón  
 <222> (798)..(856)  
 30 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (857)..(1105)  
 <220>  
 35 <221> Intrón  
 <222> (1106)..(1228)  
 <220>  
 <221> CDS  
 40 <222> (1229)..(1787)

<400> 1  
 tctgtctctt gtntcagaac agatctcctg gcggcctgct ttgccggtcc gaattgogat 60  
 cgatgcaacg tcgattgcat acgagctaag cccgtctcgt gataaccgca aggggtcttc 120  
 cgagtttctg tctgacacc aggcattttc cgatttgtgt gcggggaccc aactgtcttc 180  
 tggggagtac ctggtgacaa aagcacagat aaacagatgg atgacggtat tgctgtgata 240  
 tcgccgtggc gctgaatcct ttctcttcgc taccaagata tttattcccc gttgtgaaat 300  
 cttctattca gcccatccca tccggcaaca cgcattctgct tttcgttccg gcattccgat 360  
 acctggttcc tggagtgcct accgagcctc gcttctctggg atcgggctgt gcaccccgcc 420  
 aaaccctatg ccccaaacgg tacggacaag gatgccggac cccggttttg tccagaaagg 480  
 ttgcattcct acccacctcg ctggagccac aacatgcaga tcaccgcccg agggaggaca 540

ES 2 637 008 T3

|  |                     |
|--|---------------------|
| tgtgtggtgc agggacgttg gcaactctgc tgtgtctgaa gtatatgagg ccgatggttc  | 600                 |
| tccttgacaca aagcagagaa tggagtagcc agctcctcct caccagagtc gcctttgcag | 660                 |
| cgtctcggca ttgcaggctc cccatcgtca gcatttcaact tctcagcaac gaac atg   | 717                 |
|  | Met                 |
|  | 1                   |
| cgc tcc tca ccc ttt ctc cgc gca gct ctg gct gcc gct ctg cct ctg    | 765                 |
| Arg Ser Ser Pro Phe Leu Arg Ala Ala Leu Ala Ala Ala Leu Pro Leu    |                     |
|  | 5 10 15             |
| agc gcc cat gcc ctc gac gga aag tcg acg ag gtatgccaat cctcgtacct   | 817                 |
| Ser Ala His Ala Leu Asp Gly Lys Ser Thr Arg                        |                     |
|  | 20 25               |
| ctgccctctg tagaaacaag tgaccgactg caaagacag a tac tgg gac tgc tgc   | 872                 |
|  | Tyr Trp Asp Cys Cys |
|  | 30                  |
| aag ccg tcc tgc ggc tgg ccg gga aag gcc tcg gtg aac cag ccc gtc    | 920                 |
| Lys Pro Ser Cys Gly Trp Pro Gly Lys Ala Ser Val Asn Gln Pro Val    |                     |
|  | 35 40 45            |
| ttc tcg tgc tcg gcc gac tgg cag cgc atc agc gac ttc aac gcg aag    | 968                 |
| Phe Ser Cys Ser Ala Asp Trp Gln Arg Ile Ser Asp Phe Asn Ala Lys    |                     |
|  | 50 55 60 65         |
| tcg ggc tgc gac gga ggc tcc gcc tac tcg tgc gcc gac cag acg ccc    | 1016                |
| Ser Gly Cys Asp Gly Gly Ser Ala Tyr Ser Cys Ala Asp Gln Thr Pro    |                     |
|  | 70 75 80            |
| tgg gcg gtc aac gac aac ttc tcg tac ggc ttc gca gcc acg gcc atc    | 1064                |
| Trp Ala Val Asn Asp Asn Phe Ser Tyr Gly Phe Ala Ala Thr Ala Ile    |                     |
|  | 85 90 95            |
| gcc ggc ggc tcc gag tcc agc tgg tgc tgc gcc tgc tat gc             | 1105                |
| Ala Gly Gly Ser Glu Ser Ser Trp Cys Cys Ala Cys Tyr Ala            |                     |
|  | 100 105 110         |
| gtgagttctc tgcaagccgc ttcccacccc cgctttctgt gcaggccgct tccccctac   | 1165                |
| ccacccactt ccccccccc gcctctgtga tcgggcatcc gagctaagtt gcgtgtcgtc   | 1225                |
| cag a ctc acc ttc aac tcg ggc ccc gtc gcg ggc aag acc atg gtg gtg  | 1274                |
| Leu Thr Phe Asn Ser Gly Pro Val Ala Gly Lys Thr Met Val Val        |                     |
|  | 115 120 125         |
| cag tcg acc agc acc ggc ggc gac ctg ggc agc aac cag ttc gac ctc    | 1322                |
| Gln Ser Thr Ser Thr Gly Gly Asp Leu Gly Ser Asn Gln Phe Asp Leu    |                     |
|  | 130 135 140         |
| gcc atc ccc ggc ggc ggc gtg ggc atc ttc aac ggc tgc gcc tcc cag    | 1370                |
| Ala Ile Pro Gly Gly Gly Val Gly Ile Phe Asn Gly Cys Ala Ser Gln    |                     |
|  | 145 150 155         |
| ttc ggc ggc ctc ccc ggc gcc cag tac ggc ggc atc agc gac cgc agc    | 1418                |
| Phe Gly Gly Leu Pro Gly Ala Gln Tyr Gly Gly Ile Ser Asp Arg Ser    |                     |
|  | 160 165 170         |

ES 2 637 008 T3

cag tgc tgc tcc ttc ccc gcg ccg ctc cag ccg ggc tgc cag tgg cgc 1466  
 Gln Cys Ser Ser Phe Pro Ala Pro Leu Gln Pro Gly Cys Gln Trp Arg  
 175 180 185 190

ttc gac tgg ttc cag aac gcc gac aac ccc acc ttc acc ttc cag cgc 1514  
 Phe Asp Trp Phe Gln Asn Ala Asp Asn Pro Thr Phe Thr Phe Gln Arg  
 195 200 205

gtg cag tgc ccg tcc gag ctc acg tcc cgc acg ggc tgt aag cgc gac 1562  
 Val Gln Cys Pro Ser Glu Leu Thr Ser Arg Thr Gly Cys Lys Arg Asp  
 210 215 220

gac gac gcc agc tat ccc gtc ttc aac ccg cct agc ggt ggc tcc ccc 1610  
 Asp Asp Ala Ser Tyr Pro Val Phe Asn Pro Pro Ser Gly Gly Ser Pro  
 225 230 235

agc acc acc agc acc acc acc agc tcc ccg tcc ggt ccc acc ggc aac 1658  
 Ser Thr Thr Ser Thr Thr Thr Ser Ser Pro Ser Gly Pro Thr Gly Asn  
 240 245 250

cct cct gga ggc ggt ggc tgc act gcc cag aag tgg gcc cag tgc ggc 1706  
 Pro Pro Gly Gly Gly Gly Cys Thr Ala Gln Lys Trp Ala Gln Cys Gly  
 255 260 265 270

ggc act ggc ttc acg ggc tgc acc acc tgc gtc tcg ggc acc acc tgc 1754  
 Gly Thr Gly Phe Thr Gly Cys Thr Thr Cys Val Ser Gly Thr Thr Cys  
 275 280 285

cag gtg cag aac cag tgg tat tcc cag tgt ctg tgagcgggag ggttgttggg 1807  
 Gln Val Gln Asn Gln Trp Tyr Ser Gln Cys Leu  
 290 295

gtccgtttcc ctagggctga ggctgacgtg aactgggtcc tcttgtccgc cccatcacgg 1867

gttcgtattc gcgcgcttag ggagaggagg atgcagtttg agggggccac attttgaggg 1927

ggacgcagtc tggggtcgaa gcttgcggt tagggctgcc gtgacgtggt agagcagatg 1987

ggaccaagtg cggagctagg caggtgggtg gttgtggtgg tggcttacct tctgtaacgc 2047

aatggcatct catctcactc gcctgctccc tgattggtgg ctctgttcgg cctggcgctt 2107

tttgggaccg ctggctggaa tggattgctc cggaaoccca ggttgagctg ggctggcgcg 2167

agtagattgg ccgctccgag ctgcaaccat aataaaattt tcggaccctg taagccgcac 2227

ccgaccaggt ctccattggc ggacatgcac gacgtccttc gcaggcacgg cctgcccgcc 2287

tctgatcacc cgcagtttcc gtaccgtcag accagataca agccccg 2334

<210> 2  
 <211> 297  
 <212> PRT  
 <213> Acremonium thermophilum

<400> 2  
 Met Arg Ser Ser Pro Phe Leu Arg Ala Ala Leu Ala Ala Ala Leu Pro  
 1 5 10 15

10

ES 2 637 008 T3

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

ES 2 637 008 T3

Gly Gly Gly Gly Cys Thr Ala Gln Lys Trp Ala Gln Cys Gly Gly Thr  
 260 265 270

Gly Phe Thr Gly Cys Thr Thr Cys Val Ser Gly Thr Thr Cys Gln Val  
 275 280 285

Gln Asn Gln Trp Tyr Ser Gln Cys Leu  
 290 295

<210> 3  
 <211> 2033  
 5 <212> DNA  
 <213> Acremonium thermophilum

<220>  
 <221> CDS  
 10 <222> (259)..(702)

<220>  
 <221> Intrón  
 15 <222> (703)..(857)

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (858)..(888)

<220>  
 <221> Intrón  
 <222> (889)..(990)

<220>  
 25 <221> CDS  
 <222> (991)..(1268)

<400> 3  
 ctcgaggaga ggaaccgagt ttgaaagatg ctatatatcg atagactacc ggcgctgcct 60  
 cgccctgtcc gctctcttgc attccccctg ttgatgagac gagacaaaat tcctgggtag 120  
 aaaagatccg tcgccgagat ttcaccagtg gtaagtcccc agaattggtc attcgacggt 180  
 caatatgagt gtcaaagcta tgggtcctaa caaagaagga agcaagagct ttaaagagac 240  
 agaataacag cagcaaag atg cgt ctc cca cta ccg act ctg ctc gcc ctc 291  
 Met Arg Leu Pro Leu Pro Thr Leu Leu Ala Leu  
 1 5 10  
 ttg ccc tac tac ctc gaa gtg tcc gct cag ggg gca tcc gga acc ggc 339  
 Leu Pro Tyr Tyr Leu Glu Val Ser Ala Gln Gly Ala Ser Gly Thr Gly  
 15 20 25  
 acg aca aca cgt tac tgg gat tgc tgc aag ccg agc tgc gcg tgg cct 387  
 Thr Thr Thr Arg Tyr Trp Asp Cys Cys Lys Pro Ser Cys Ala Trp Pro  
 30 35 40  
 ctg aag ggc aat tcg ccc agc ccg gtg cag act tgc gac aag aat gac 435  
 Leu Lys Gly Asn Ser Pro Ser Pro Val Gln Thr Cys Asp Lys Asn Asp

30

ES 2 637 008 T3

| 15  | 50                                      | 55  |                 |
|---|---|-----|-----------------|
| agg ccg ctg aac gat ggg gga aac acc aag tcc ggc tgc gac aac ggt   |   |     | 483             |
| Arg Pro Leu Asn Asp Gly Gly Asn Thr Lys Ser Gly Cys Asp Asn Gly   |   |     |                 |
| 60  | 65                                      | 70  | 75              |
| ggc ggg gcc ttc atg tgc tca tcc cag agt ccc tgg gcc gtc aat gag   |   |     | 531             |
| Gly Gly Ala Phe Met Cys Ser Ser Gln Ser Pro Trp Ala Val Asn Glu   |   |     |                 |
|   | 80                                      | 85  | 90              |
| acc acc agc tac ggc tgg gca gcc gtt cgt atc gcc ggc agt acc gag   |   |     | 579             |
| Thr Thr Ser Tyr Gly Trp Ala Ala Val Arg Ile Ala Gly Ser Thr Glu   |   |     |                 |
|   | 95                                      | 100 | 105             |
| tcg gcc tgg tgc tgt gcc tgc tac gag ctc acc ttc acc agt ggg ccc   |   |     | 627             |
| Ser Ala Trp Cys Cys Ala Cys Tyr Glu Leu Thr Phe Thr Ser Gly Pro   |   |     |                 |
|   | 110                                     | 115 | 120             |
| gtc agt gga aag aag ctc ata gtc cag gcc acg aac act ggt gga gac   |   |     | 675             |
| Val Ser Gly Lys Lys Leu Ile Val Gln Ala Thr Asn Thr Gly Gly Asp   |   |     |                 |
|   | 125                                     | 130 | 135             |
| ctt ggg agc aac cac ttt gac ctt gcg gtatgtgggg tttttctttc         |   |     | 722             |
| Leu Gly Ser Asn His Phe Asp Leu Ala                               |   |     |                 |
| 140   | 145                                     |     |                 |
| ttcatcatcg ctctcaccat ggattcctcg ggcgaaggac caagattgag aagcgtcaat |   |     | 782             |
| gccgggttgg acacgggagc cgggatagga acacagaggc cgtttaagac cgtcagctga |   |     | 842             |
| cagcagagca attag att ccc gga ggt ggt gtt ggt cag tcc aat g        |   |     | 888             |
|   | Ile Pro Gly Gly Gly Val Gly Gln Ser Asn |     |                 |
|   | 150                                     | 155 |                 |
| gtaggttcct tccttgaagt accggcaaca gctgtgggt tgcgtgtatac cctttttaat |   |     | 948             |
| catagcatct tctgtctgga tacaagccaa cccattttct ag ct tgc acg aac     |   |     | 1001            |
|   |   |     | Ala Cys Thr Asn |
|   |   |     | 160             |
| cag tat ggt gcg ccc ccg aac ggc tgg ggc gac agg tat ggt gcc gtg   |   |     | 1049            |
| Gln Tyr Gly Ala Pro Pro Asn Gly Trp Gly Asp Arg Tyr Gly Gly Val   |   |     |                 |
|   | 165                                     | 170 | 175             |
| cac tcg cgg agc gac tgc gac agc ttc ccc gcg gcg ctc aag gcc ggc   |   |     | 1097            |
| His Ser Arg Ser Asp Cys Asp Ser Phe Pro Ala Ala Leu Lys Ala Gly   |   |     |                 |
|   | 180                                     | 185 | 190             |
| tgc tac tgg cga ttc gac tgg ttc cag ggc gcc gac aac ccg tcc gtg   |   |     | 1145            |
| Cys Tyr Trp Arg Phe Asp Trp Phe Gln Gly Ala Asp Asn Pro Ser Val   |   |     |                 |
|   | 195                                     | 200 | 205             |
| agc ttc aaa cag gta gcc tgc ccg gca gcc atc aca gct aag agc ggc   |   |     | 1193            |
| Ser Phe Lys Gln Val Ala Cys Pro Ala Ala Ile Thr Ala Lys Ser Gly   |   |     |                 |
|   | 215                                     | 220 | 225             |
| tgt act cgc cag aac gat gcc atc aac gag act ccg act ggg ccc agc   |   |     | 1241            |
| Cys Thr Arg Gln Asn Asp Ala Ile Asn Glu Thr Pro Thr Gly Pro Ser   |   |     |                 |
|   | 230                                     | 235 | 240             |
| act gtg cct acc tac acc gcg tca gcc tgaaagtccg ctggggcacc         |   |     | 1288            |

ES 2 637 008 T3

Thr Val Pro Thr Tyr Thr Ala Ser Gly  
 245 250

attgcccagg tgatggttgg gcatgtgtta gtctcactca ccagggacat ttgtcgcgac 1348  
 ctgatcatag gcgccagggg agttgaaagg ggttgccgta cgagaagaca ttttgcgcc 1408  
 gtcttactcc cagccacttc tgtacatatt caatgacatt acatagcccg caaatatggt 1468  
 catatatcgt ggccgccc aaacgccccg tttgcttagg ctggagctga agtggtctgc 1528  
 cgatggctgt caaaggcagt cggaatattc ctcgttgctt cggcaacacg gtagctgctt 1588  
 gaaccgtacc cagcattaga acacccccg ccgagggctt gctacgtcaa tggcggggtc 1648  
 tccaaccct gcgcggcaca aaaccaacca cgcctcgtc ttttatgatg tcctcgtc 1708  
 aacgtcccgt gacgacactc cgtcatggt ctggctctct gatgtagaag gggtaggtca 1768  
 gcgatggtc gtcaccgtcg tcaatgcttc cctcaagctt cttgcggcct ttatcctcca 1828  
 actcttccca catgagaact ccactttcc gccttttcac aaagccactg cctccttgt 1888  
 caagggccaa aaaccaacgc cgtgatgaa tgcttccgat cgtgtttgac gcgcccgggg 1948  
 tatgcatttg gttcggcgca ctttttcgt cctccagctc ccttaactcc cgttccatct 2008  
 gagaggggtga ctcgtctact cgact 2033

<210> 4

<211> 251

5 <212> PRT

<213> *Acremonium thermophilum*

<400> 4

Met Arg Leu Pro Leu Pro Thr Leu Leu Ala Leu Leu Pro Tyr Tyr Leu  
 1 5 10 15

Glu Val Ser Ala Gln Gly Ala Ser Gly Thr Gly Thr Thr Thr Arg Tyr  
 20 25 30

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

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

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

Cys Ser Ser Gln Ser Pro Trp Ala Val Asn Glu Thr Thr Ser Tyr Gly  
 85 90 95

10

ES 2 637 008 T3

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

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

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

Phe Asp Leu Ala Ile Pro Gly Gly Gly Val Gly Gln Ser Asn Ala Cys  
 145 150 155 160

Thr Asn Gln Tyr Gly Ala Pro Pro Asn Gly Trp Gly Asp Arg Tyr Gly  
 165 170 175

Gly Val His Ser Arg Ser Asp Cys Asp Ser Phe Pro Ala Ala Leu Lys  
 180 185 190

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

Ser Val Ser Phe Lys Gln Val Ala Cys Pro Ala Ala Ile Thr Ala Lys  
 210 215 220

Ser Gly Cys Thr Arg Gln Asn Asp Ala Ile Asn Glu Thr Pro Thr Gly  
 225 230 235 240

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

<210> 5

<211> 17

5 <212> PRT

<213> Acremonium thermophilum

<400> 5

Gln Ser Cys Ser Ser Phe Pro Ala Pro Leu Lys Pro Gly Cys Gln Trp  
 1 5 10 15

Arg

10

<210> 6

<211> 13

<212> PRT

<213> Acremonium thermophilum

15

<400> 6

Tyr Ala Leu Thr Phe Asn Ser Gly Pro Val Ala Gly Lys  
 1 5 10

<210> 7

20

<211> 10

<212> PRT

<213> Acremonium thermophilum

<400> 7  
Val Gln Cys Pro Ser Glu Leu Thr Ser Arg  
1 5 10

5 <210> 8  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Acremonium thermophilum

10 <400> 8  
Asn Gln Pro Val Phe Ser Cys Ser Ala Asp Trp Gln Arg  
1 5 10

15 <210> 9  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Acremonium thermophilum

20 <400> 9  
Tyr Trp Asp Cys Cys Lys Pro Ser Cys Gly Trp Pro Gly Lys  
1 5 10

<210> 10  
<211> 4  
<212> PRT  
25 <213> Acremonium thermophilum

<400> 10  
Pro Thr Phe Thr  
1

30 <210> 11  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Secuencia Artificial

35 <220>  
<223> cebador

<220>  
40 <221> característica miscelánea  
<222> (3)..(3)  
<223> y significa c o t

<220>  
45 <221> característica miscelánea  
<222> (9)..(9)  
<223> y significa c o t

<220>  
50 <221> característica miscelánea  
<222> (12)..(12)  
<223> y significa c o t

<220>  
55 <221> característica miscelánea  
<222> (15)..(15)  
<223> r significa a o g

<400> 11  
60 taytgggayt gytgyaarcc 20

<210> 12  
<211> 21

<212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 5 <223> cebador  
  
 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (1)..(1)  
 10 <223> r significa a o g  
  
 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (4)..(4)  
 15 <223> r significa a o g  
  
 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (7)..(7)  
 20 <223> n significa a, t, c o g  
  
 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (10)..(10)  
 25 <223> r significa a o g  
  
 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (13)..(13)  
 30 <223> y significa c o t  
  
 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (16)..(16)  
 35 <223> r significa a o g  
  
 <400> 12  
 rtrtrcngcr ttytgraacc a 21  
  
 40 <210> 13  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Melanocarpus albomyces  
  
 45 <400> 13  
 Trp Phe Gln Asn Ala Asp Asn  
 1 5  
  
 <210> 14  
 <211> 636  
 50 <212> DNA  
 <213> Acremonium thermophilum  
  
 <400> 14

ES 2 637 008 T3

tactgggatt gttgcaagcc gtctctgcgc tggccgggaa aggcctcggg gaaccagccc 60  
 gtcttctcgt gctcggccga ctggcagcgc atcagcgact tcaacgcgaa gtcgggctgc 120  
 gacggaggct ccgcctactc gtgcgcccgc cagacgccct gggcgggtaa cgacaacttc 180  
 tcgtacggct tcgcagccac ggccatcgcc ggcggctccg agtccagctg gtgctgcgcc 240  
 tgctatgcgt gagttctctg caagccgctt cccacccccg ctttctgtgc aggccgcttc 300  
 ccccctacc acccaacttc cccccccgc ctctgtgatc gggcatccga gctaagttagc 360  
 gtgtcgtcca gactcacctt caactcgggc cccgtcgcgg gcaagaccat ggtggtgcag 420  
 tcgaccagca ccggcggcga cctgggcagc aaccagttcg acctcgccat ccccggcggc 480  
 ggcgtgggca tcttcaacgg ctgcgcctcc cagttagcgg gcctccccgg cgcccagtac 540  
 ggcggcatca gcgaccgag ccagtgtctg tccttccccg cgcgctcca gccgggctgc 600  
 cagtggcgt tcgactggtt ccagaacgcg gataat 636

<210> 15

<211> 786

5 <212> DNA

<213> Acremonium thermophilum

<400> 15

tactgggatt gttgcaagcc gagctgcgcg tggcctctga agggcaattc gccagcccc 60  
 gtgcagactt gcgacaagaa tgacaggccg ctgaacgatg ggggaaacac caagtccggc 120  
 tgcgacaacg gtggcggggc cttcatgtgc tcatcccaga gtocctgggc cgtcaatgag 180  
 accaccagct acggctgggc agccgttcgt atcgccggca gtaccgagtc ggccctggtgc 240  
 tgtgcctgct acgagctcac cttcaccagt gggcccgtca gtggaaagaa gctcatagtc 300  
 caggccacga aactggttg agacctggg agcaaccact ttgaccttgc ggtatgtggg 360  
 10 gtttttcttt cttcatcacc gctctcacca tggattctc ggcgcaagga ccaagattga 420  
 gaagcgtcaa tgccggggtg gacacgggag ccgggatagg aacacagagg ccgtttaaga 480  
 ccgtcagctg acagcaggag caattagatt cccggagggt gtggttggtca gttcaatggt 540  
 aggttccttc cctgaagtac cggcaacagc ctgtgcgttg ctgtataccc cttttaatca 600  
 tagcatcttc ctgctggata caagccaacc cttttctag cttgcacgaa ccagtatggt 660  
 gcgccccga acggctgggg cgacaggtat ggtggcgtgc actcgcggag cgactgcgac 720  
 agcttccccg cgcgctcaa ggccggctgc tactggcgat tcgactggtt tcaaacgcc 780  
 gacaac 786

<210> 16

<211> 994

15 <212> DNA

<213> Acremonium thermophilum

<220>

<221> CDS

20 <222> (13)..(95)

<220>

<221> Intrón

<222> (96)..(154)

ES 2 637 008 T3

```

<220>
<221> CDS
<222> (155)..(403)
5
<220>
<221> Intrón
<222> (404)..(526)
10
<220>
<221> CDS
<222> (527)..(986)

<400> 16
ggactgcgca tc atg cgc tcc tca ccc ttt ctc cgc gca gct ctg gct gcc      51
          Met Arg Ser Ser Pro Phe Leu Arg Ala Ala Leu Ala Ala
          1              5              10

gct ctg cct ctg agc gcc cat gcc ctc gac gga aag tcg acg ag          95
Ala Leu Pro Leu Ser Ala His Ala Leu Asp Gly Lys Ser Thr Arg
  15              20              25

gtatgccaat cctcgtaacct ctgccctctg tagaaacaag tgaccgactg caaagacag      154

a tac tgg gac tgc tgc aag ccg tcc tgc ggc tgg gcc gga aag gcc tcg      203
  Tyr Trp Asp Cys Cys Lys Pro Ser Cys Gly Trp Ala Gly Lys Ala Ser
  30              35              40

gtg aac cag ccc gtc ttc tcg tgc tcg gcc gac tgg cag cgc atc agc      251
Val Asn Gln Pro Val Phe Ser Cys Ser Ala Asp Trp Gln Arg Ile Ser
  45              50              55              60
15

```

ES 2 637 008 T3

gac ttc aac gcg aag tcg ggc tgc gac gga ggc tcc gcc tac tcg tgc 299  
 Asp Phe Asn Ala Lys Ser Gly Cys Asp Gly Gly Ser Ala Tyr Ser Cys  
 65 70 75

gcc gac cag acg ccc tgg gcg gtc aac gac aac ttc tcg tac gcc ttc 347  
 Ala Asp Gln Thr Pro Trp Ala Val Asn Asp Asn Phe Ser Tyr Gly Phe  
 80 85 90

gca gcc acg gcc atc gcc ggc ggc tcc gag tcc agc tgg tgc tgc gcc 395  
 Ala Ala Thr Ala Ile Ala Gly Gly Ser Glu Ser Ser Trp Cys Cys Ala  
 95 100 105

tgc tat gc gtgagttctc tgcaagccgc ttcccacccc cgctttctgt 443  
 Cys Tyr Ala  
 110

gcaggccgct tccccctac ccaccaactt ccccccccc gcctctgtga tcgggcatcc 503

gagctaagtt gcgtgtcgtc cag a ctc acc ttc aac tcg ggc ccc gtc gcg 554  
 Leu Thr Phe Asn Ser Gly Pro Val Ala  
 115 120

ggc aag acc atg gtg gtg cag tcg acc agc acc ggc ggc gac ctg ggc 602  
 Gly Lys Thr Met Val Val Gln Ser Thr Ser Thr Gly Gly Asp Leu Gly  
 125 130 135

agc aac cag ttc gac ctc gcc atc ccc ggc ggc ggc gtg ggc atc ttc 650  
 Ser Asn Gln Phe Asp Leu Ala Ile Pro Gly Gly Gly Val Gly Ile Phe  
 140 145 150

aac ggc tgc gcc tcc cag ttc ggc ggc ctc ccc ggc gcc cag tac gcc 698  
 Asn Gly Cys Ala Ser Gln Phe Gly Gly Leu Pro Gly Ala Gln Tyr Gly  
 155 160 165

ggc atc agc gac cgc agc cag tgc tcg tcc ttc ccc gcg ccg ctc cag 746  
 Gly Ile Ser Asp Arg Ser Gln Cys Ser Ser Phe Pro Ala Pro Leu Gln  
 170 175 180

ccg ggc tgc cag tgg cgc ttc gac tgg ttc cag aac gcc gac aac ccc 794  
 Pro Gly Cys Gln Trp Arg Phe Asp Trp Phe Gln Asn Ala Asp Asn Pro  
 185 190 195 200

acc ttc acc ttc cag cgc gtg cag tgc ccg tcc gag ctc acg tcc cgc 842  
 Thr Phe Thr Phe Gln Arg Val Gln Cys Pro Ser Glu Leu Thr Ser Arg  
 205 210 215

acg ggc tgt aag cgc gac gac gac gcc agc tat ccc gtc ttc aac ccg 890  
 Thr Gly Cys Lys Arg Asp Asp Asp Ala Ser Tyr Pro Val Phe Asn Pro  
 220 225 230

cct agc ggt gcc tcc ccc agc acc acc agc acc acc acc agc tcc ccg 938  
 Pro Ser Gly Gly Ser Pro Ser Thr Thr Ser Thr Thr Thr Ser Ser Pro  
 235 240 245

tcc ggt ccc acg ggc aac cct cct gga ggc ggt gcc tgc act gcc cag 986  
 Ser Gly Pro Thr Gly Asn Pro Pro Gly Gly Gly Gly Cys Thr Ala Gln  
 250 255 260

tgactgca 994

<210> 17

<211> 264

5 <212> PRT

<213> Acremonium thermophilum

<400> 17

ES 2 637 008 T3

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

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

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

Val Phe Ser Cys Ser Ala Asp Trp Gln Arg Ile Ser Asp Phe Asn Ala  
50 55 60

Lys Ser Gly Cys Asp Gly Gly Ser Ala Tyr Ser Cys Ala Asp Gln Thr  
65 70 75 80

Pro Trp Ala Val Asn Asp Asn Phe Ser Tyr Gly Phe Ala Ala Thr Ala  
85 90 95

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

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

Thr Ser Thr Gly Gly Asp Leu Gly Ser Asn Gln Phe Asp Leu Ala Ile  
130 135 140

Pro Gly Gly Gly Val Gly Ile Phe Asn Gly Cys Ala Ser Gln Phe Gly  
145 150 155 160

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

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

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

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

Ala Ser Tyr Pro Val Phe Asn Pro Pro Ser Gly Gly Ser Pro Ser Thr  
225 230 235 240

Thr Ser Thr Thr Thr Ser Ser Pro Ser Gly Pro Thr Gly Asn Pro Pro  
245 250 255

Gly Gly Gly Gly Cys Thr Ala Gln  
260

ES 2 637 008 T3

```

<210> 18
<211> 907
<212> DNA
<213> Acremonium thermophilum
5
<220>
<221> CDS
<222> (13)..(95)
10
<220>
<221> Intrón
<222> (96)..(154)
15
<220>
<221> CDS
<222> (155)..(403)
20
<220>
<221> Intrón
<222> (404)..(526)
25
<220>
<221> CDS
<222> (527)..(899)
<400> 18
ggactgcgca tc atg cgc tcc tca ccc ttt ctc cgc gca gct ctg gct gcc 51
          Met Arg Ser Ser Pro Phe Leu Arg Ala Ala Leu Ala Ala
          1             5             10
gct ctg cct ctg agc gcc cat gcc ctc gac gga aag tcg acg ag 95
Ala Leu Pro Leu Ser Ala His Ala Leu Asp Gly Lys Ser Thr Arg
  15             20             25
gtatgccaat cctcgtacct ctgccctctg tagaacaag tgaccgactg caaagacag 154
a tac tgg gac tgc tgc aag ccg tcc tgc ggc tgg gcc gga aag gcc tcg 203
  Tyr Trp Asp Cys Cys Lys Pro Ser Cys Gly Trp Ala Gly Lys Ala Ser
  30             35             40
gtg aac cag ccc gtc ttc tcg tgc tcg gcc gac tgg cag cgc atc agc 251
Val Asn Gln Pro Val Phe Ser Cys Ser Ala Asp Trp Gln Arg Ile Ser
  45             50             55             60
gac ttc aac gcg aag tcg ggc tgc gac gga ggc tcc gcc tac tcg tgc 299

```

ES 2 637 008 T3

Asp Phe Asn Ala Lys Ser Gly Cys Asp Gly Gly Ser Ala Tyr Ser Cys  
65 70 75

gcc gac cag acg ccc tgg gcg gtc aac gac aac ttc tcg tac ggc ttc 347  
Ala Asp Gln Thr Pro Trp Ala Val Asn Asp Asn Phe Ser Tyr Gly Phe  
80 85 90

gca gcc acg gcc atc gcc ggc ggc tcc gag tcc agc tgg tgc tgc gcc 395  
Ala Ala Thr Ala Ile Ala Gly Gly Ser Glu Ser Ser Trp Cys Cys Ala  
95 100 105

tgc tat gc gtgagttctc tgcaagccgc ttcccacccc cgctttctgt 443  
Cys Tyr Ala  
110

gcaggccgct tccccctac ccaccactt ccccccccc gcctctgtga tcgggcatcc 503

gagctaagtt gcgtgtcgtc cag a ctc acc ttc aac tcg ggc ccc gtc gcg 554  
Leu Thr Phe Asn Ser Gly Pro Val Ala  
115 120

ggc aag acc atg gtg gtg cag tcg acc agc acc ggc ggc gac ctg ggc 602  
Gly Lys Thr Met Val Val Gln Ser Thr Ser Thr Gly Gly Asp Leu Gly  
125 130 135

agc aac cag ttc gac ctc gcc atc ccc ggc ggc ggc gtg ggc atc ttc 650  
Ser Asn Gln Phe Asp Leu Ala Ile Pro Gly Gly Gly Val Gly Ile Phe  
140 145 150

aac ggc tgc gcc tcc cag ttc ggc ggc ctc ccc ggc gcc cag tac ggc 698  
Asn Gly Cys Ala Ser Gln Phe Gly Gly Leu Pro Gly Ala Gln Tyr Gly  
155 160 165

ggc atc agc gac cgc agc cag tgc tcg tcc ttc ccc gcg ccg ctc cag 746  
Gly Ile Ser Asp Arg Ser Gln Cys Ser Ser Phe Pro Ala Pro Leu Gln  
170 175 180

ccg ggc tgc cag tgg cgc ttc gac tgg ttc cag aac gcc gac aac ccc 794  
Pro Gly Cys Gln Trp Arg Phe Asp Trp Phe Gln Asn Ala Asp Asn Pro  
185 190 195 200

acc ttc acc ttc cag cgc gtg cag tgc ccg tcc gag ctc acg tcc cgc 842  
Thr Phe Thr Phe Gln Arg Val Gln Cys Pro Ser Glu Leu Thr Ser Arg  
205 210 215

acg ggc tgt aag cgc gac gac gac gcc agc tat ccc gtc ttc aac ccg 890  
Thr Gly Cys Lys Arg Asp Asp Asp Ala Ser Tyr Pro Val Phe Asn Pro  
220 225 230

cct agc ggt tgactgca 907  
Pro Ser Gly  
235

<210> 19

<211> 235

5 <212> PRT

<213> Acremonium thermophilum

<400> 19

# ES 2 637 008 T3

```

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

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

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

Val Phe Ser Cys Ser Ala Asp Trp Gln Arg Ile Ser Asp Phe Asn Ala
50          55          60

Lys Ser Gly Cys Asp Gly Gly Ser Ala Tyr Ser Cys Ala Asp Gln Thr
65          70          75          80

Pro Trp Ala Val Asn Asp Asn Phe Ser Tyr Gly Phe Ala Ala Thr Ala
          85          90          95

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

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

Thr Ser Thr Gly Gly Asp Leu Gly Ser Asn Gln Phe Asp Leu Ala Ile
130          135          140

Pro Gly Gly Gly Val Gly Ile Phe Asn Gly Cys Ala Ser Gln Phe Gly
145          150          155          160

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

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

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

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

Ala Ser Tyr Pro Val Phe Asn Pro Pro Ser Gly
225          230          235

```

<210> 20

<211> 1175

5 <212> DNA

<213> Acremonium thermophilum

<220>

<221> CDS

10 <222> (1)..(444)

ES 2 637 008 T3

<220>  
 <221> Intrón  
 <222> (445)..(599)

5

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (600)..(630)

10

<220>  
 <221> Intrón  
 <222> (631)..(732)

15

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (733)..(1172)

<400> 20

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| atg | cgt | ctc | cca | cta | ccg | act | ctg | ctc | gcc | ctc | ttg | ccc | tac | tac | ctc | 48  |
| Met | Arg | Leu | Pro | Leu | Pro | Thr | Leu | Leu | Ala | Leu | Leu | Pro | Tyr | Tyr | Leu |     |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |     |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| gaa | gtg | tcc | gct | cag | ggg | gca | tcc | gga | acc | ggc | acg | aca | aca | cgt | tac | 96  |
| Glu | Val | Ser | Ala | Gln | Gly | Ala | Ser | Gly | Thr | Gly | Thr | Thr | Thr | Arg | Tyr |     |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |     |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| tgg | gat | tgc | tgc | aag | ccg | agc | tgc | gcg | tgg | cct | ctg | aag | ggc | aat | tcg | 144 |
| Trp | Asp | Cys | Cys | Lys | Pro | Ser | Cys | Ala | Trp | Pro | Leu | Lys | Gly | Asn | Ser |     |
|     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |     |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| ccc | agc | ccg | gtg | cag | act | tgc | gac | aag | aat | gac | agg | ccg | ctg | aac | gat | 192 |
| Pro | Ser | Pro | Val | Gln | Thr | Cys | Asp | Lys | Asn | Asp | Arg | Pro | Leu | Asn | Asp |     |
|     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |     |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| ggg | gga | aac | acc | aag | tcc | ggc | tgc | gac | aac | ggt | ggc | ggg | gcc | ttc | atg | 240 |
| Gly | Gly | Asn | Thr | Lys | Ser | Gly | Cys | Asp | Asn | Gly | Gly | Gly | Ala | Phe | Met |     |
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     | 80  |     |     |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| tgc | tca | tcc | cag | agt | ccc | tgg | gcc | gtc | aat | gag | acc | acc | agc | tac | ggc | 288 |
| Cys | Ser | Ser | Gln | Ser | Pro | Trp | Ala | Val | Asn | Glu | Thr | Thr | Ser | Tyr | Gly |     |
|     |     |     | 85  |     |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |     |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| tgg | gca | gcc | gtt | cgt | atc | gcc | ggc | agt | acc | gag | tcg | gcc | tgg | tgc | tgt | 336 |
| Trp | Ala | Ala | Val | Arg | Ile | Ala | Gly | Ser | Thr | Glu | Ser | Ala | Trp | Cys | Cys |     |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |     |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| gcc | tgc | tac | gag | ctc | acc | ttc | acc | agt | ggg | ccc | gtc | agt | gga | aag | aag | 384 |
| Ala | Cys | Tyr | Glu | Leu | Thr | Phe | Thr | Ser | Gly | Pro | Val | Ser | Gly | Lys | Lys |     |
|     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |     |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| ctc | ata | gtc | cag | gcc | acg | aac | act | ggt | gga | gac | ctt | ggg | agc | aac | cac | 432 |
| Leu | Ile | Val | Gln | Ala | Thr | Asn | Thr | Gly | Gly | Asp | Leu | Gly | Ser | Asn | His |     |
|     |     | 130 |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |     |

20

ES 2 637 008 T3

ttt gac ott gcg gtatgtgggg tttttctttc ttcatcatcg ctctcacat 484  
 Phe Asp Leu Ala  
 145  
 ggattcctcg gcgcaaggac caagattgag aagcgtcaat gccgggttg acacgggagc 544  
 cgggatagga acacagaggc cgtttaagac cgtcagctga cagcagagca attag att 602  
 Ile  
 ccc gga ggt ggt gtt ggt cag tcc aat g gtaggttct tcctgaagt 650  
 Pro Gly Gly Gly Val Gly Gln Ser Asn  
 150 155  
 accggcaaca gcctgtgcgt tgctgtatac cccttttaat catagcatct tcctgctgga 710  
 tacaagccaa cccattttct ag ct tgc acg aac cag tat ggt gcg ccc ccg 761  
 Ala Cys Thr Asn Gln Tyr Gly Ala Pro Pro  
 160 165  
 aac gcc tgg ggc gac agg tat ggt gcc gtg cac tcg ccg agc gac tgc 809  
 Asn Gly Trp Gly Asp Arg Tyr Gly Gly Val His Ser Arg Ser Asp Cys  
 170 175 180  
 gac agc ttc ccc gcg gcg ctc aag gcc gcc tgc tac tgg cga ttc gac 857  
 Asp Ser Phe Pro Ala Ala Leu Lys Ala Gly Cys Tyr Trp Arg Phe Asp  
 185 190 195 200  
 tgg ttc cag ggc gcc gac aac ccg tcc gtg agc ttc aaa cag gta gcc 905  
 Trp Phe Gln Gly Ala Asp Asn Pro Ser Val Ser Phe Lys Gln Val Ala  
 205 210 215  
 tgc ccg gca gcc atc aca gct aag agc gcc tgt act ccg cag aac gat 953  
 Cys Pro Ala Ala Ile Thr Ala Lys Ser Gly Cys Thr Arg Gln Asn Asp  
 220 225 230  
 gcc atc aac gag act ccg act ggg ccc agc ggt gcc tcc ccc agc acc 1001  
 Ala Ile Asn Glu Thr Pro Thr Gly Pro Ser Gly Gly Ser Pro Ser Thr  
 235 240 245  
 acc agc acc acc acc agc tcc ccg tcc ggt ccc acg gcc aac cct cct 1049  
 Thr Ser Thr Thr Thr Ser Ser Pro Ser Gly Pro Thr Gly Asn Pro Pro  
 250 255 260  
 gga gcc ggt gcc tgc act gcc cag aag tgg gcc cag tgc gcc gcc act 1097  
 Gly Gly Gly Gly Cys Thr Ala Gln Lys Trp Ala Gln Cys Gly Gly Thr  
 265 270 275 280  
 gcc ttc acg gcc tgc acc acc tgc gtc tcg gcc acc acc tgc cag gtg 1145  
 Gly Phe Thr Gly Cys Thr Thr Cys Val Ser Gly Thr Thr Cys Gln Val  
 285 290 295  
 cag aac cag tgg tat tcc cag tgt ctg tga 1175  
 Gln Asn Gln Trp Tyr Ser Gln Cys Leu  
 300 305

<210> 21

<211> 305

5 <212> PRT

<213> Acremonium thermophilum

<400> 21

# ES 2 637 008 T3

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

# ES 2 637 008 T3

|                 |                     |                 |                 |
|-----------------|---------------------|-----------------|-----------------|
| 225             | 230                 | 235             | 240             |
| Pro Ser Gly Gly | Ser Pro Ser Thr Thr | Ser Thr Thr Thr | Ser Ser Pro     |
|                 | 245                 | 250             | 255             |
| Ser Gly Pro Thr | Gly Asn Pro Pro     | Gly Gly Gly Gly | Cys Thr Ala Gln |
|                 | 260                 | 265             | 270             |
| Lys Trp Ala Gln | Cys Gly Gly Thr     | Gly Phe Thr Gly | Cys Thr Thr Cys |
|                 | 275                 | 280             | 285             |
| Val Ser Gly Thr | Thr Cys Gln Val     | Gln Asn Gln Trp | Tyr Ser Gln Cys |
|                 | 290                 | 295             | 300             |

Leu  
305

5 <210> 22  
 <211> 89  
 <212> DNA  
 <213> Acremonium thermophilum

<400> 22  
 attaaccgcg gactgcgcat catgtatcgg aagttggccg tcatctcggc cttcttgccc 60  
 acagctcgtg ccctcgacgg aaagtcgac 89

10 <210> 23  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Acremonium thermophilum

15 <400> 23  
 tcgactgcac caccatggc 20

20 <210> 24  
 <211> 68  
 <212> PRT  
 <213> Trichoderma reesei

<400> 24  
 Gly Asn Pro Ser Gly Gly Asn Pro Pro Gly Gly Asn Pro Pro Gly Thr  
 1 5 10 15

Thr Thr Thr Arg Arg Pro Ala Thr Thr Thr Gly Ser Ser Pro Gly Pro  
 20 25 30

25 Thr Gln Ser His Tyr Gly Gln Cys Gly Gly Ile Gly Tyr Ser Gly Pro  
 35 40 45

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

Ser Gln Cys Leu  
65

30 <210> 25  
 <211> 70  
 <212> PRT  
 <213> Acremonium thermophilum

ES 2 637 008 T3

<400> 25

Gly Gly Asn Pro Pro Pro Val Thr  
1 5 10 15

Ser Lys Pro Ser Gln Pro Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Ser Pro Gln  
20 25 30

Gly Pro Gln Gln Thr His Trp Gly Gln Cys Gly Gly Ile Gly Trp Thr  
35 40 45

Gly Pro Gln Ser Cys Gln Ser Pro Trp Thr Cys Gln Lys Gln Asn Asp  
50 55 60

Trp Tyr Ser Gln Cys Leu  
65 70

- 5 <210> 26
- <211> 81
- <212> PRT
- <213> Chaetomium thermophilum

10 <400> 26

Val Pro Gly Leu Asp Gly Ser Asn Pro Gly Asn Pro Thr Thr Thr Val  
1 5 10 15

Val Pro Pro Ala Ser Thr Ser Thr Ser Arg Pro Thr Ser Ser Thr Ser  
20 25 30

Ser Pro Val Ser Thr Pro Thr Gly Gln Pro Gly Gly Cys Thr Thr Gln  
35 40 45

Lys Trp Gly Gln Cys Gly Gly Ile Gly Tyr Thr Gly Cys Thr Asn Cys  
50 55 60

Val Ala Gly Thr Thr Cys Thr Gln Leu Asn Pro Trp Tyr Ser Gln Cys  
65 70 75 80

Leu

- 15 <210> 27
- <211> 1675
- <212> DNA
- <213> Trichoderma reesei

- 20 <220>
- <221> Intrón
- <222> (462)..(528)

- 25 <220>
- <221> Intrón
- <222> (1226)..(1288)

<400> 27

ES 2 637 008 T3

atgtatcggg agttggccgt catctcggcc ttcttggcca cagctcgtgc tcagtcggcc 60  
 tgcactctcc aatcggagac tcacccgcct ctgacatggc agaaatgctc gtctggtggc 120  
 acttgactc aacagacagg ctccgtggtc atcgacgcca actggcgctg gactcagct 180  
 acgaacagca gcacgaactg ctacgatggc aacacttggg gctcgaccct atgtcctgac 240  
 aacgagacct gcggaagaa ctgctgtctg gacggtgccc cctacgcgtc cacgtacgga 300  
 gttaccacga gcggaacag cctctccatt ggctttgtca cccagtctgc gcagaagaac 360  
 gttggcgctc gcctttacct tatgggcagc gacacgacct accaggaatt caccctgctt 420  
 ggcaacgagt tctcttttoga tgttgatggt tcgcagctgc cgtaagtgac ttaccatgaa 480  
 cccctgacgt atcttcttgt gggctcccag ctgactggcc aatttaaggt gcggttgaa 540  
 cggagctctc tacttctgtt ccatggacgc ggatggtggc gtgagcaagt atcccaccaa 600  
 caccgctggc gccaaagtac gcacggggta ctgtgacagc cagtgtcccc gcgatctgaa 660  
 gttcatcaat gccaggcca acgttgaggg ctgggagccc tcaccaaca acgcaaacac 720  
 gggcattgga ggacacggaa gctgctgctc tgagatggat atctgggagg ccaactccat 780  
 ctccgaggct cttaccccc acccttgac gactgtcggc caggagatct gcgaggggta 840  
 tgggtgcggc ggaacttact ccgataacag atatggcggc acttgcgatc ccgatggctg 900  
 cgactggaac ccataccgcc tgggcaaac cagcttctac ggcctggct caagctttac 960  
 cctcgatacc accaagaaat tgaccgttgt caccagctc gagacgtcgg gtgccatcaa 1020  
 ccgatactat gtccagaatg gcgtcacttt ccagcagccc aacgccgagc ttggtagtta 1080  
 ctctggcaac gagctcaacg atgattactg cacagctgag gaggcagaat tcggcggatc 1140  
 ctctttctca gacaagggcg gcctgactca gttcaagaag gctacctctg gcggcatggt 1200  
 tctggtcatg agtctgtggg atgatgtgag tttgatggac aaacatgcgc gttgacaaag 1260  
 agtcaagcag ctgactgaga tgttacagta ctacgccaac atgctgtggc tggactccac 1320  
 ctaccgaca aacgagacct cctccacacc cggtgccgtg cgcggaagct gctccaccag 1380  
 ctccggtgct cctgctcagg tcgaatctca gtctcccaac gccaaagtca ccttctccaa 1440  
 catcaagttc ggaccattg gcagcaccgg caaccctagc ggcggaacc ctcccggcg 1500  
 aaaccgcct ggcaccacca ccaccgcgg cccagccact accactggaa gctctcccgg 1560  
 acctaccoag tctcactacg gccagtgagg cggatttggc tacagcggcc ccacggtctg 1620  
 cgccagcggc acaacttgcc aggtctgaa cccttactac tctcagtgcc tgtaa 1675

5 <210> 28  
 <211> 1471  
 <212> DNA  
 <213> Acremonium thermophilum

10 <220>  
 <221> Intrón  
 <222> (338)..(472)

15 <220>  
 <221> Intrón  
 <222> (699)..(783)

ES 2 637 008 T3

<400> 28

atgcgcgcc a gcaactcct ggcggcggc ctgctggccc cgcgctcgt ctggcccag 60  
ctcaacagcc tcgccgtggc ggctggcctc aagtacttcg gcacggccgt gggggaggcc 120  
aacgtcaacg gcgacgccac ctacatgtcg tacgtcaaca acaagtccga gttcggccag 180  
gtgacgcccg agaacggcca gaagtgggat tccaccgagc ccagccaggg ccagttcagc 240  
tacagccagg gcgacatcgt ccccgggctc gcgaagaaga acggccaggg gctgcgctgc 300  
cacacctgg tgtggtacag ccagctcccc agctggggtc agtgactctc tctttctctc 360  
tgtctttctc tttgtctttc tctctttctc tctctctctc tctctctctc tctctctctc 420  
tctcccatcc agcatcgact gctgatcttg ctgaccagaa gctcgtgtgc agtgatcatcc 480  
ggaagtggga cccgcgcgac gcttcagtcg gtcacgaga cgcacatctc gaacgtgatg 540  
ggccactaca agggccagtg ctacgcctgg gacgtgggtc acgaggccat caacgacgac 600  
ggcacgtggc ggaccagcgt cttctacaac accttcaaca ccgactacct ggccattgcc 660  
ttcaacgccg cgaagaaggc cgatgcgggc gcgaagctgt aggtgtcggc ctttacgttg 720  
ccgcagcgca cctccgcgac atgagcccca gagcgcgtgg ctaatagttc ctcaocgacg 780  
caggactac aacgactaca atctcgagta caacggcgcc aagaccaaca cggccgtgca 840  
gctggtgcag atcgtgcagc aggccggcgc gcccatcgac ggggtgggct tccagggcca 900  
cctgatcgtg gggtaacgc cgtcgcgcag ctccctggcc acggcgtga agcgtttcac 960  
ggcgttggc ctggagggtg cgtacacgga gctggacatc cggcactcga gctgcccgc 1020  
gtcgtcggcg gcgctggcga cgcagggcaa cgacttcgcc agcgtggtgg gctcgtgcct 1080  
cgacgtggcg ggtcgcgtgg gcacacccat ctgggggttc acggacaagt acagctgggt 1140  
gcccacacg tccccggct cgggcgcggc gctgctgtac gacgcgaact acagcaagaa 1200  
gccggcgtgg acgtcggctc cgtcgggtct ggcggccaag gcgacgaacc cgcggggcg 1260  
cgggaaccca cccccgtca ccaccacgac cacgaccacg accacgtcga agccgtcga 1320  
gcccaccacc acgaccacga ccaccagccc gcaggggtccg cagcagacgc actggggcca 1380  
gtgcggcggg atcggctgga cggggcgcga gtcgtgccag agcccgtgga cgtgccagaa 1440  
gcagaacgac tggtaactctc agtgccctgtg a 1471

5

<210> 29

<211> 1663

<212> DNA

<213> Chaetomium thermophilum

10

<220>

<221> Intrón

<222> (1591)..(1654)

15

<400> 29

ES 2 637 008 T3

atgatgtata agaagttegc cgctctcgcc gccctcgtgg ctggcgccctc cgcccagcag 60  
gcttgetccc tcaccgctga gaaccaccct agcctcacct ggaagcgctg cacctctggc 120  
ggcagctgct cgaccgtgaa cggcgccgctc accatcgatg ccaactggcg ctggactcac 180  
accgtctccg gctcgaccaa ctgctacacc ggcaaccagt gggatacctc cctctgcact 240  
gatggcaaga gctgcgccca gacctgctgc gtogatggcg ctgactactc ttcgaacctat 300  
ggtatcacca ccagcgggtga ctccctgaac ctcaagtctg tcaccaagca ccagtacggc 360  
accaacgtcg gctcccgtgt ctatctgatg gagaacgaca ccaagtacca gatgttcgag 420  
ctctcggca acgagttcac ctctgatgtc gatgtctcca acctgggctg cggctctcaac 480  
ggcgccctct acttcgtttc catggatgct gatgggtggca tgagcaaata ctctggcaac 540  
aaggctggcg ccaagtacgg taccggttac tgcgatgctc agtgcccgcg cgacctcaag 600  
ttcatcaacg gcgaggccaa cgttgggaac tggaccccct cgaccaacga tgccaacgcc 660  
ggcttcggcc gctatggcag ctgctgctct gagatggatg tctgggaggc caacaacatg 720  
gctactgect tcaactctca cccttgcaac accgttggcc agagccgctg cgaggccgac 780  
acctgcggtg gcacctacag ctctgaccgc tatgctggtg tttgcgacce tgatggetgc 840  
gacttoacg cctaccgcca agggcacaag accttctacg gcaagggcat gactgtcgac 900  
accaacaaga agatgaccgt cgtcaccag ttccacaaga actcggctgg cgtcctcagc 960  
gagatcaacg gcttctacgt ccaggacggc aagatcattg ccaacgctga gtccaagatc 1020  
cccggcaacc ccgaaactc cattaccag gagtattgcg atgccagaa ggtcgccttc 1080  
agtaacaccg atgacttcaa ccgcaagggc ggtatggctc agatgagcaa ggcctcgc 1140  
ggccccatgg tcttggtcat gtccgtctgg gatgaccact acgccaacat gctctggctc 1200  
gactcgacct accccatcga ccaggccggc gccccggcg ccgagcgcgg tgcttgcccc 1260  
accacctcgg gtgtccctgc cgagatcgag gccagggtcc ccaacagcaa cgtcatcttc 1320  
tccaacatcc gtttcggccc catcgctcg accgtccctg gccttgacgg cagcaacccc 1380  
ggcaaccoga ccaccaccgt cgttctctcc gcttctacct ccacctccg tccgaccagc 1440  
agcactagct ctcccgtttc gaccccgact ggccagcccg gcggtgcac caccagaag 1500  
tggggccagt gcggcggat cggctacacc ggctgacta actgcgttgc tggcaccacc 1560  
tgcactcagc tcaaccctg gtacagccag gtatgtttct ctccccctt ctgactcgc 1620  
ttggatttga cagttgctaa catctgctca acagtgcctg taa 1663

5 <210> 30  
<211> 39  
<212> DNA  
<213> Trichoderma reesei

10 <400> 30  
ttggatccga gtcgcagcgg caaccctagc ggcggcaac 39

<210> 31  
<211> 30  
15 <212> DNA  
<213> Trichoderma reesei

<400> 31  
 taattctgca gttacaggca ctgagagtag 30

5 <210> 32  
 <211> 41  
 <212> DNA  
 <213> Acremonium thermophilum

10 <400> 32  
 ttggatccga gtcgcagcgg cgggaacca cccccgtca c 41

15 <210> 33  
 <211> 34  
 <212> DNA  
 <213> Acremonium thermophilum

<400> 33  
 taattctgca gtcacaggca ctgagagtac cagt 34

20 <210> 34  
 <211> 28  
 <212> DNA  
 <213> Chaetomium thermophilum

25 <400> 34  
 taatttacgt acctggcctt gacggcag 28

30 <210> 35  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> Chaetomium thermophilum

35 <400> 35  
 attaactgca gttacaggca ctgttgagca 30

40 <210> 36  
 <211> 1096  
 <212> DNA  
 <213> Acremonium thermophilum

45 <220>  
 <221> gen  
 <222> (13)..(1091)

50 <220>  
 <221> Intrón  
 <222> (84)..(142)

<220>  
 <221> Intrón  
 <222> (392)..(514)

<400> 36

## ES 2 637 008 T3

```

ggactgcgca tcatgtatcg gaagttggcc gtcactctgg ccttcttggc cacagctcgt      60
gccctcgacg gaaagtcgac gaggtatgcc aatcctcgta cctctgccct ctgtagaaac      120
aagtgaccga ctgcaaagac agatactggg actgctgcaa gccgtcctgc ggctgggccg      180
gaaaggcctc ggtgaaccag cccgtcttct cgtgctcggc cgactggcag cgcatacagcg      240
acttcaacgc gaagtcgggc tgcgacggag gctccgcta ctcgtgcgcc gaccagacgc      300
cctgggcggt caacgacaac ttctcgtacg gcttcgcagc cacggccatc gccggcggct      360
ccgagtcagc ctgggtcgtc gcctgctatg cgtgagttct ctgcaagccg cttcccaccc      420
ccgctttctg tgcaggccgc ttecccccta cccacccaet tcccccccc cgcctctgtg      480
atcgggcata cgagctaagt tgcgtgtcgt ccagactcac cttcaactcg ggccccgtcg      540
cgggcaagac catggtggtg cagtcgacca gcaccggcgg cgacctgggc agcaaccagt      600
tcgacctcgc catccccggc ggcggcgtgg gcactttcaa cggtgcgcc tcccagttcg      660
gcgccctccc cggcgcccag tacggcggca tcagcgaccg cagccagtgc tcgtccttcc      720
ccgcgcccgt ccagccgggc tgccagtggc gcttcgactg gttccagaac gccgacaacc      780
ccaccttcac cttccagcgc gtgcagtgcc cgtccgagct cacgtcccgc acgggctgta      840
agcgcgacga cgagccagc tatcccgctt tcaaccgcc ttcgggcaac cctagcggcg      900
gcaaccctcc cggcggaaac ccgcctggca ccaccaccac ccgcccacca gccactacca      960
ctggaagctc tcccgacact acccagctct actaoggccg gtgcggcgggt attggctaca     1020
gcgccccacg ggtctgcgcc agcggcacia cttgccaggt cctgaaccct tactactctc     1080
agtgcctgta actgca                                     1096

```

5 <210> 37  
 <211> 1102  
 <212> DNA  
 <213> *Acremonium thermophilum*

10 <220>  
 <221> gen  
 <222> (13)..(1097)

15 <220>  
 <221> Intrón  
 <222> (84)..(142)

20 <220>  
 <221> Intrón  
 <222> (392)..(514)

<400> 37

# ES 2 637 008 T3

```

ggactgcgca tcatgtatcg gaagttggcc gtcactctgg ccttcttggc cacagctcgt      60
gccctcgacg gaaagtcgac gaggtatgcc aatcctcgta cctctgccct ctgtagaaac      120
aagtgaccga ctgcaaagac agatactggg actgctgcaa gccgtcctgc ggctgggccg      180
gaaaggcctc ggtgaaccag cccgtcttct cgtgctcggc cgactggcag cgcatacagc      240
acttcaacgc gaagtcgggc tgcgacggag gctccgccta ctcgtgcgcc gaccagacgc      300
cctgggcggt caacgacaac ttctcgtacg gcttcgcagc cacggccatc gccggcggct      360
ccgagtccag ctggtgctgc gcctgctatg cgtgagttct ctgcaagccg cttcccaccc      420
ccgctttctg tgcaggccgc tcccccccta cccacccaact tccccccccc cgcctctgtg      480
atcgggcata cgagctaagt tgcgtgtcgt ccagactcac cttcaactcg ggccccgtcg      540
cgggcaagac catggtgggtg cagtcgacca gcaccggcgg cgacctgggc agcaaccagt      600
tcgacctcgc catccccggc ggcggcgtgg gcactctcaa cggtgcgcc tcccagttcg      660
gcggcctccc cggcgcccag tacggcggca tcagcgaccg cagccagtgc tcgtccttcc      720
ccgcgcccgt ccagccgggc tgccagtggc gcttcgactg gttccagaac gccgacaacc      780
ccaccttcac cttccagcgc gtgcagtgcc cgtccgagct cacgtcccgc acgggctgta      840
agcgcgacga cgagccagc tatcccgctt tcaaccgcc ttcgggcggg aaccacccc      900
ccgtcaccac cacgaccacg accacgacca cgtcgaagcc gtgcgagccc accaccacga      960
ccacgaccac cagcccgcag ggtccgcagc agacgcactg gggccagtgc ggcgggatcg     1020
gctggacggg gccgcagtcg tgccagagcc cgtggacgtg ccagaagcag aacgactggt     1080
actctcagtg cctgtgactg ca                                             1102

```

5 <210> 38  
 <211> 1199  
 <212> DNA  
 <213> Acremonium thermophilum

10 <220>  
 <221> gen  
 <222> (13)..(1194)

15 <220>  
 <221> Intrón  
 <222> (84)..(142)

20 <220>  
 <221> Intrón  
 <222> (392)..(514)

25 <220>  
 <221> Intrón  
 <222> (1122)..(1185)

<400> 38

# ES 2 637 008 T3

```

ggactgcgca tcatgtatcg gaagttggcc gtcactctgg ccttcttggc cacagctcgt      60
gccctcgacg gaaagtcgac gaggtatgcc aatcctcgta cctctgccct ctgtagaaac     120
aagtgaccga ctgcaaagac agatactggg actgctgcaa gccgtcctgc ggctgggccg     180
gaaaggcctc ggtgaaccag cccgtcttct cgtgctcggc cgactggcag cgcatacagcg     240
acttcaacgc gaagtcgggc tgcgacggag gctccgccta ctcgtgcgcc gaccagacgc     300
cctgggcggg caacgacaac ttctcgtacg gcttcgcagc cacggccatc gccggcggct     360
ccgagtccag ctgggtcgtc gcctgctatg cgtgagttct ctgcaagccg cttcccaccc     420
ccgctttctg tgcaggccgc ttecccccta cccacccaact tcccccccc cgcctctgtg     480
atcgggcate cgagctaagt tgcgtgtcgt ccagactcac ettcaactcg ggccccgtcg     540
cgggcaagac catggtggtg cagtcgacca gcaccggcgg cgacctgggc agcaaccagt     600
tcgacctcgc catccccggc ggcggcgtgg gcacttcaa cggtcgcgcc tcccagttcg     660
gcgccctccc cggcgcccag tacggcggca tcagcgaccg cagccagtgc tegtcttcc     720
ccgcgccgct ccagccgggc tgccagtggc gcttcgactg gttccagaac gccgacaacc     780
ccaccttcac ctccagcgc gtgcagtgcc cgtccgagct cacgtcccgc acgggctgta     840
agcgcgacga cgacgccagc tatcccgtct tcaaccgcc ttcggtacct ggccttgacg     900
gcagcaaccc cggcaaccgg accaccaccg tcgttctctc cgcttctacc tccacctccc     960
gtccgaccag cagcactagc tctcccgttt cgaccccgac tggccagccc ggcggctgca    1020
ccaccagaa gtggggccag tgcggcggta tcggctacac cggctgcact aactgcgttg    1080
ctggcaccac ctgcactcag ctcaaccctt ggtacagcca ggtatgttct tcttcccctt    1140
tctagactcg cttggatttg acagttgcta acatctgctc aacagtgcct gtaactgca    1199

```

5 <210> 39  
 <211> 298  
 <212> PRT  
 <213> *Acremonium thermophilum*

10 <400> 39

ES 2 637 008 T3

Met Tyr Arg Lys Leu Ala Val Ile Ser Ala Phe Leu Ala Thr Ala Arg  
1 5 10 15

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

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

Ser Ala Asp Trp Gln Arg Ile Ser Asp Phe Asn Ala Lys Ser Gly Cys  
50 55 60

Asp Gly Gly Ser Ala Tyr Ser Cys Ala Asp Gln Thr Pro Trp Ala Val  
65 70 75 80

Asn Asp Asn Phe Ser Tyr Gly Phe Ala Ala Thr Ala Ile Ala Gly Gly  
85 90 95

Ser Glu Ser Ser Trp Cys Cys Ala Cys Tyr Ala Leu Thr Phe Asn Ser  
100 105 110

Gly Pro Val Ala Gly Lys Thr Met Val Val Gln Ser Thr Ser Thr Gly  
115 120 125

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

ES 2 637 008 T3

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

Ala Gln Tyr Gly Gly Ile Ser Asp Arg Ser Gln Cys Ser Ser Phe Pro  
165 170 175

Ala Pro Leu Gln Pro Gly Cys Gln Trp Arg Phe Asp Trp Phe Gln Asn  
180 185 190

Ala Asp Asn Pro Thr Phe Thr Phe Gln Arg Val Gln Cys Pro Ser Glu  
195 200 205

Leu Thr Ser Arg Thr Gly Cys Lys Arg Asp Asp Asp Ala Ser Tyr Pro  
210 215 220

Val Phe Asn Pro Pro Ser Gly Asn Pro Ser Gly Gly Asn Pro Pro Gly  
225 230 235 240

Gly Asn Pro Pro Gly Thr Thr Thr Thr Arg Arg Pro Ala Thr Thr Thr  
245 250 255

Gly Ser Ser Pro Gly Pro Thr Gln Ser His Tyr Gly Gln Cys Gly Gly  
260 265 270

Ile Gly Tyr Ser Gly Pro Thr Val Cys Ala Ser Gly Thr Thr Cys Gln  
275 280 285

Val Leu Asn Pro Tyr Tyr Ser Gln Cys Leu  
290 295

<210> 40

<211> 300

5 <212> PRT

<213> Acremonium thermophilum

<400> 40

Met Tyr Arg Lys Leu Ala Val Ile Ser Ala Phe Leu Ala Thr Ala Arg  
1 5 10 15

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

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

Ser Ala Asp Trp Gln Arg Ile Ser Asp Phe Asn Ala Lys Ser Gly Cys

10



# ES 2 637 008 T3

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

ES 2 637 008 T3

Leu Thr Ser Arg Thr Gly Cys Lys Arg Asp Asp Asp Ala Ser Tyr Pro  
 210 215 220

Val Phe Asn Pro Pro Ser Val Pro Gly Leu Asp Gly Ser Asn Pro Gly  
 225 230 235 240

Asn Pro Thr Thr Thr Val Val Pro Pro Ala Ser Thr Ser Thr Ser Arg  
 245 250 255

Pro Thr Ser Ser Thr Ser Ser Pro Val Ser Thr Pro Thr Gly Gln Pro  
 260 265 270

Gly Gly Cys Thr Thr Gln Lys Trp Gly Gln Cys Gly Gly Ile Gly Tyr  
 275 280 285

Thr Gly Cys Thr Asn Cys Val Ala Gly Thr Thr Cys Thr Gln Leu Asn  
 290 295 300

Pro Trp Tyr Ser Gln Cys Leu  
 305 310

5 <210> 42  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Acremonium thermophilum

10 <400> 42  
 gcagcaacca gttcgacctc 20

<210> 43  
 <211> 36  
 <212> DNA  
 <213> Acremonium thermophilum

15 <400> 43  
 ttaactgcag tcaactgggca gtgcagccac cgcctc 36

20 <210> 44  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Acremonium thermophilum

25 <400> 44  
 actgctgcaa gccgtcctgc 20

30 <210> 45  
 <211> 41  
 <212> DNA  
 <213> Acremonium thermophilum

<400> 45  
 ttaactgcag tcaaccgcta ggcgggttga agacgggata g 41

35

**REIVINDICACIONES**

1. Un polipéptido endoglucanasa que comprende actividad celulolítica y que se selecciona del grupo que consiste en:
  - 5 a) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2; y
  - b) un polipéptido de a) que carece del dominio de unión de carbohidrato, o el dominio de unión de carbohidrato y la región conectora.
2. El polipéptido endoglucanasa de la reivindicación 1, en el que dicha secuencia de aminoácidos tiene al menos 98% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2.
- 10 3. El polipéptido endoglucanasa de la reivindicación 1, que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 19.
4. El polipéptido endoglucanasa de la reivindicación 1, que se puede obtener o se origina de *Acremonium sp.*, preferiblemente de *Acremonium thermophilum*, lo más preferiblemente de *Acremonium sp.* CBS 116240.
- 15 5. Una proteína de fusión de endoglucanasa que comprende el núcleo celulolíticamente activo de un polipéptido que tiene al menos 95% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2, unido a un dominio de unión de carbohidrato (CBD) heterólogo.
6. La proteína de fusión de endoglucanasa de la reivindicación 5, en el que dicho CBD y una región conectora opcional derivan de CBHI de *Trichoderma reesei*, CBHI de *Chaetomium thermophilum*, o xilanasa de *Acremonium sp.*
- 20 7. La proteína de fusión de endoglucanasa de la reivindicación 6, en el que la proteína de fusión tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 71% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 39, al menos 69% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 40, y al menos 69% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 41.
- 25 8. Un polinucleótido aislado que codifica el polipéptido endoglucanasa de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o una proteína de fusión de endoglucanasa de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7.
9. El polinucleótido aislado de la reivindicación 8, que tiene una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en:
  - a) una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, o SEQ ID NO: 38;
  - 30 b) una cadena complementaria de a); y
  - c) una secuencia que es degenerada como resultado del código genético a una cualquiera de las secuencias como se define en a) o b).
10. Un vector de expresión que comprende una secuencia de polinucleótido que codifica el polipéptido endoglucanasa de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o una proteína de fusión de endoglucanasa de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7.
- 35 11. Una célula huésped que comprende un vector de expresión de la reivindicación 10.
12. La célula huésped de la reivindicación 11, que es de origen fúngico.
13. La célula huésped de la reivindicación 12, que es *Trichoderma reesei*.
- 40 14. Un proceso para la producción de un polipéptido endoglucanasa de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o una proteína de fusión de endoglucanasa de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7 que comprende la etapa de cultivar la célula huésped de una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13.
15. Una preparación de enzima que comprende un polipéptido endoglucanasa de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o una proteína de fusión de endoglucanasa de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7.
- 45 16. Un proceso para biolavado a la piedra, que comprende la etapa de añadir un polipéptido endoglucanasa de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o una proteína de fusión de endoglucanasa de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7 o una preparación de la reivindicación 15 a tela o prendas que contienen algodón, tal como tela vaquera.

17. Un proceso para bioacabado, que comprende la etapa de añadir un polipéptido endoglucanasa de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o una proteína de fusión de endoglucanasa de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7 o una preparación de la reivindicación 15 a materiales textiles como telas o prendas o hilo.
- 5 18. Una composición de detergente que comprende un polipéptido endoglucanasa de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o una proteína de fusión de endoglucanasa de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7 o una preparación de la reivindicación 15 y auxiliares, tales como agentes tensioactivos, surfactantes, agentes blanqueantes o potenciadores.
19. Un método para tratar material textil que contiene fibra celulósica, en el que dicho método comprende poner en contacto dicho material textil con la composición de detergente de la reivindicación 18.
- 10 20. Un método para tratar pulpa o fibra derivada de madera, que comprende la etapa de añadir un polipéptido endoglucanasa de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o una proteína de fusión de endoglucanasa de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7 o una preparación de la reivindicación 15 a pulpa mecánica o química o fibra secundaria derivada de madera.
- 15 21. Un método para mejorar la calidad de alimento animal, que comprende tratar material de plantas con un polipéptido endoglucanasa de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o una proteína de fusión de endoglucanasa de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7 o una preparación de la reivindicación 15.
22. Una cepa de *Escherichia coli* que tiene el número de acceso DSM 17324, DSM 18813, DSM 18814, DSM 18815, DSM 18816 o DSM 18817.

Fig. 1

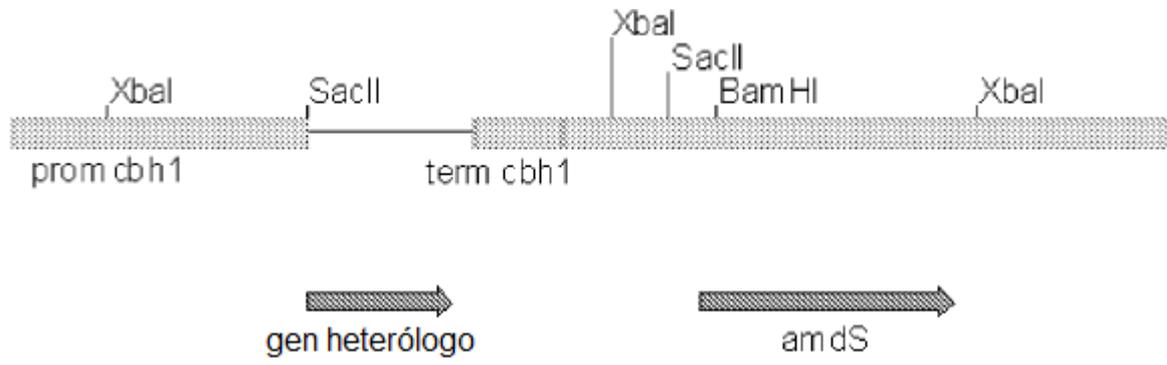
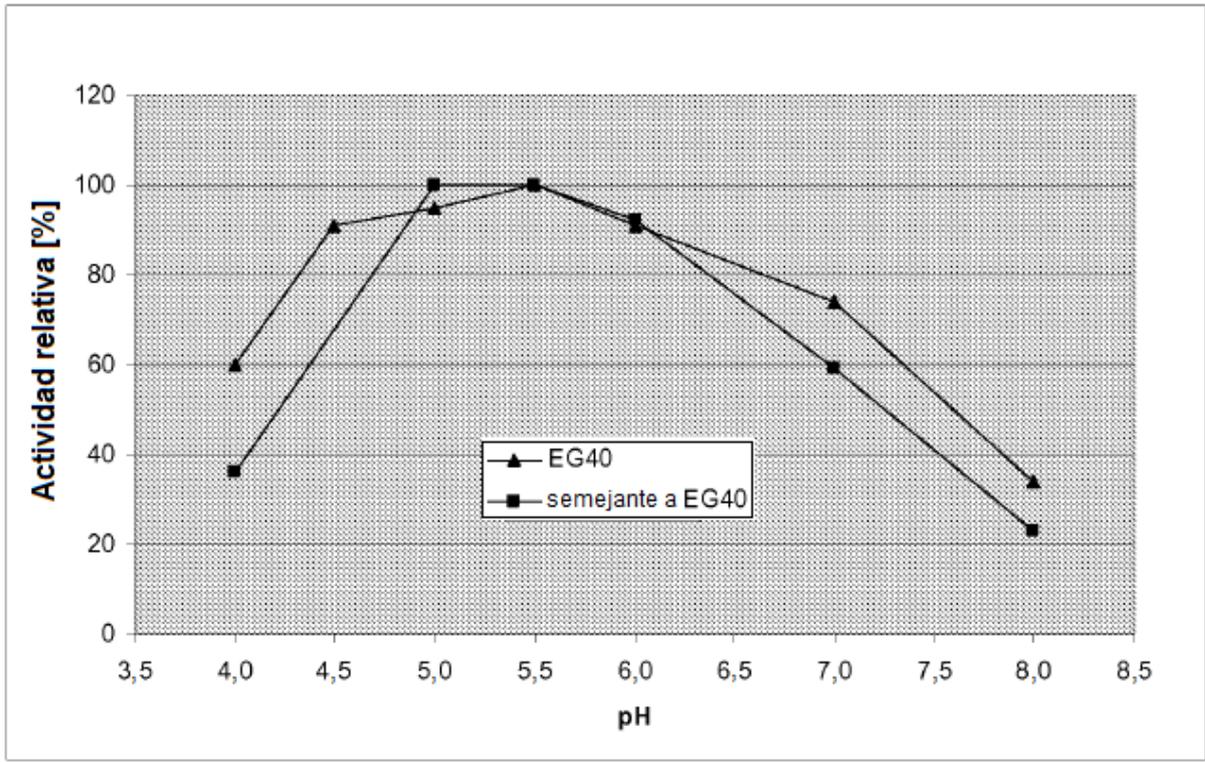


Fig. 2

**A**



**B**

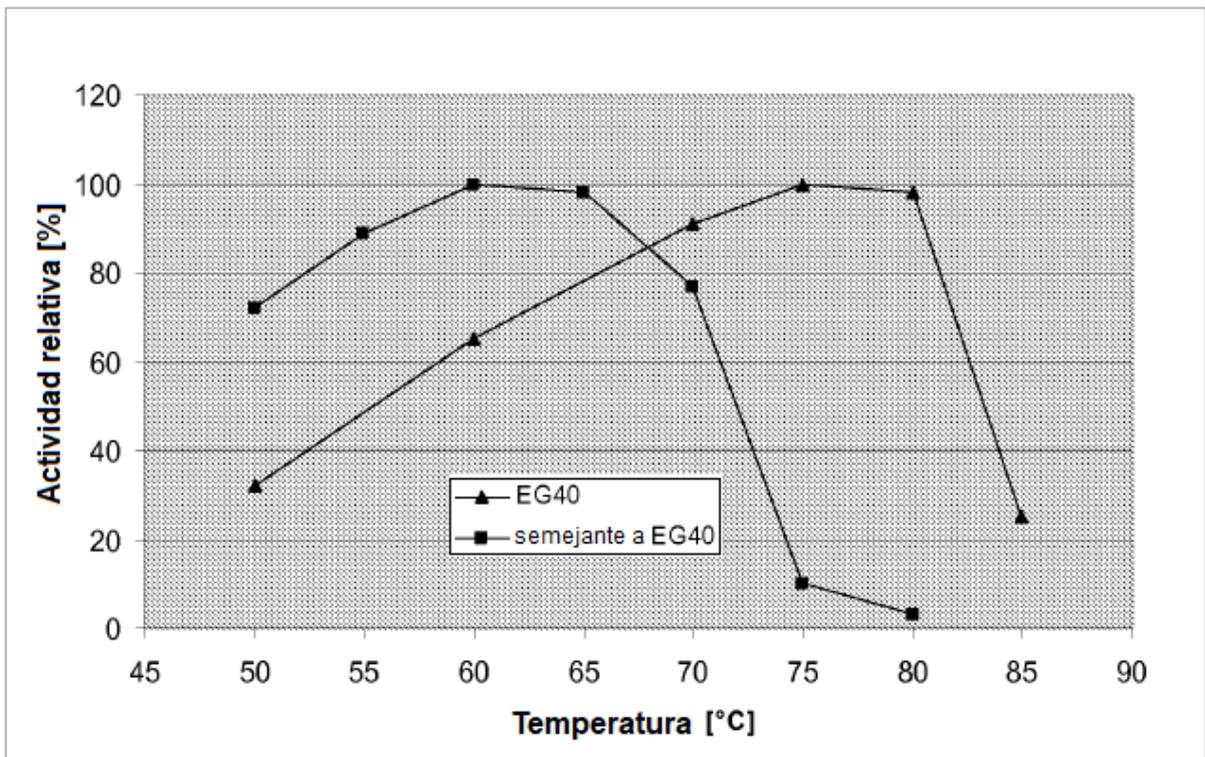


Fig. 3

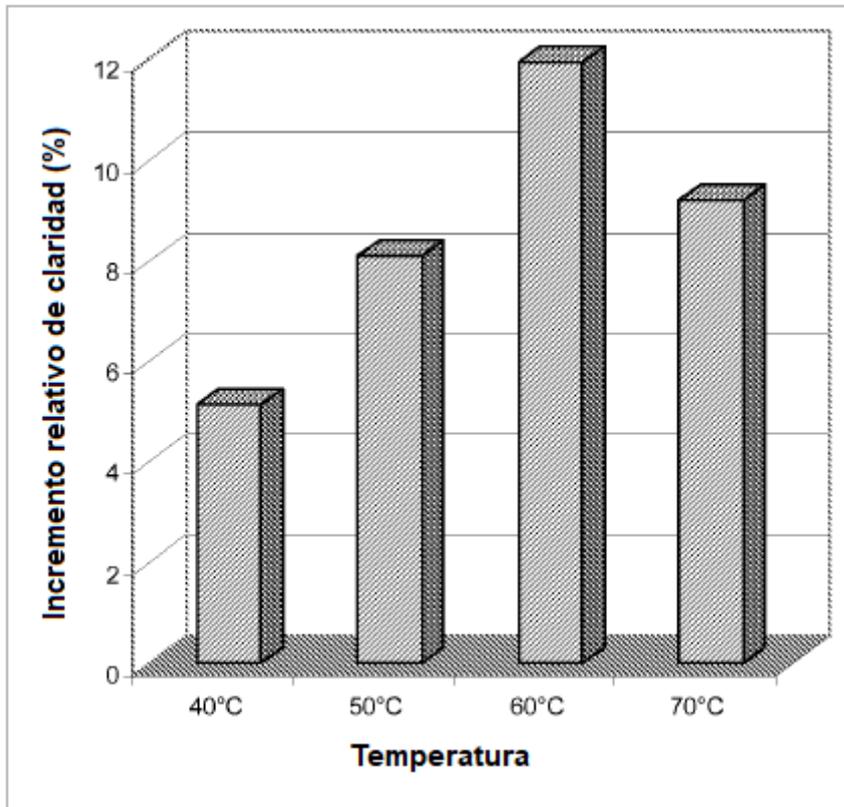


Fig. 4

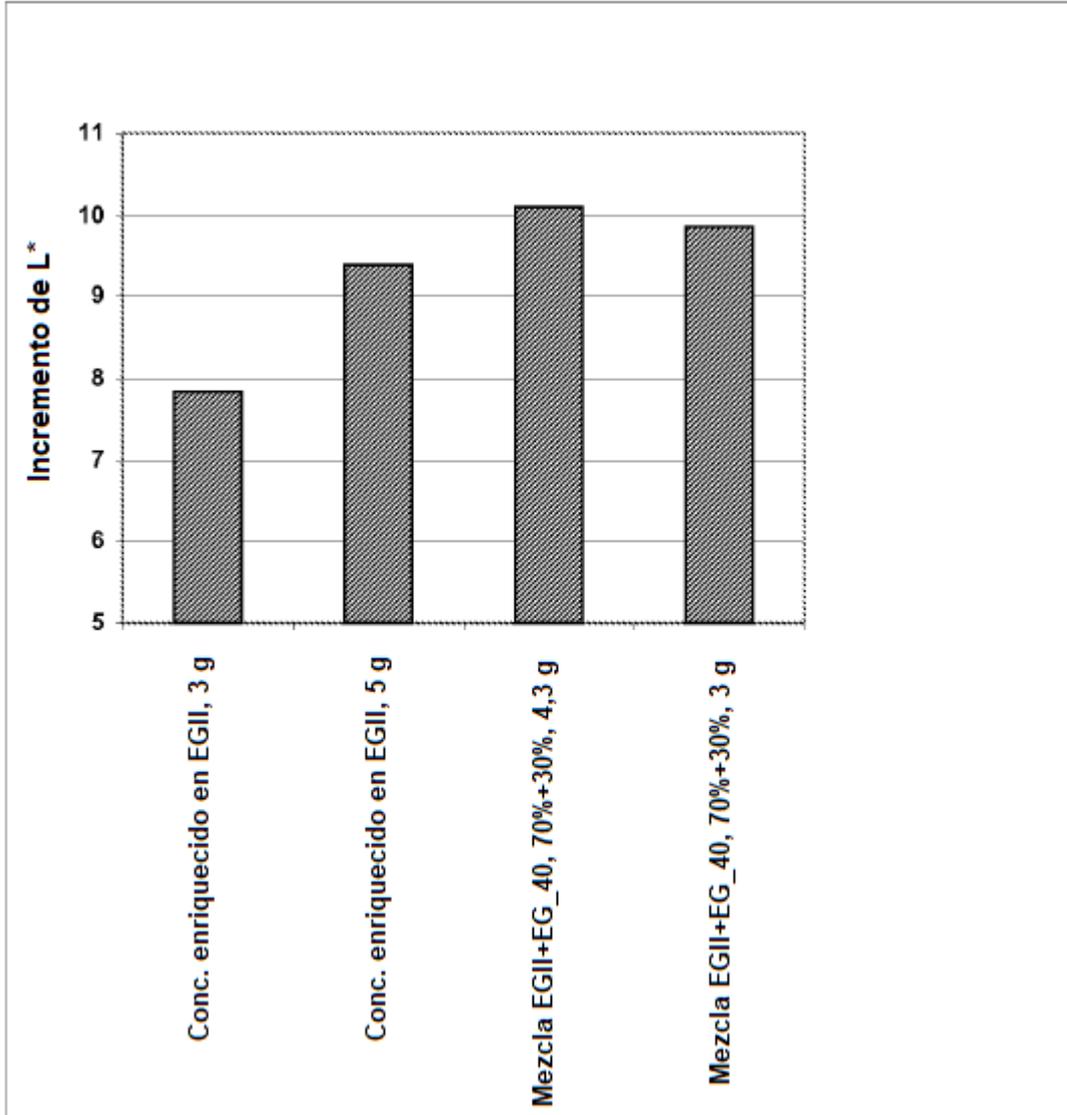


Fig. 5

