



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 278 743**

51 Int. Cl.:

C12N 9/42 (2006.01)

C11D 3/38 (2006.01)

C11D 3/386 (2006.01)

D06M 16/00 (2006.01)

D06P 5/02 (2006.01)

D21C 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **01932197 .5**

86 Fecha de presentación : **22.05.2001**

87 Número de publicación de la solicitud: **1291431**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **12.03.2003**

54

Título: **Proteína enzimática con actividad endoglucanasa, procedimiento para su producción y sus aplicaciones.**

30

Prioridad: **22.05.2000 JP 2000-150463**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.08.2007

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.08.2007

73

Titular/es: **Meiji Seika Kaisha, Ltd.**
4-16, Kyobashi 2-chome
Chuo-ku, Tokyo 104-8002, JP

72

Inventor/es: **Murashima, Koichiro;**
Sumida, Naomi;
Nakane, Akitaka;
Yanai, Koji;
Nishimura, Tomoko;
Koga, Jinichiro;
Murakami, Takeshi y
Kono, Toshiaki

74

Agente: **Gil Vega, Víctor**

ES 2 278 743 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

Proteína enzimática con actividad endoglucanasa, procedimiento para su producción y sus aplicaciones.

5 **Campo técnico**

Esta invención se refiere a una endoglucanasa, a la preparación que contiene la endoglucanasa y a un método para el tratamiento de un tejido que contiene celulosa por medio de la endoglucanasa.

10 **Antecedentes técnicos**

Con el fin de aportar las características deseadas a un tejido que contiene celulosa, los tejidos celulósicos se tratan con celulasa. Por ejemplo, se lleva a cabo el tratamiento con celulasa en el campo de la industria textil con el propósito de mejorar el tacto y aspecto de un tejido que contiene celulosa o de aportar un aspecto de “lavado a la piedra” que proporciona una variación localizada en el color de los tejidos de color (Patente Europea 307.564).

Actualmente, las preparaciones de celulasa que provienen de los hongos de la pudrición de la madera *Trichoderma* y *Humicola* se utilizan con el propósito de aportar un aspecto de lavado a la piedra a los tejidos de mezclilla (denim) teñida que contienen celulosa y mejorar el tacto de los mismos. Estas preparaciones de celulasa son mezclas de múltiples componentes de celulasa. Su uso en la práctica ha sido entorpecido por una dificultad que resulta de la necesidad de emplear gran cantidad de la preparación de celulasa para ejercer el efecto deseado sobre el tejido que contiene celulosa.

Se está mejorando este inconveniente de la preparación de celulasa mediante la utilización de una preparación que contiene gran cantidad de endoglucanasas. Por ejemplo, las preparaciones de celulasa que tienen una actividad enriquecida de endoglucanasa están publicadas en las publicaciones internacionales WO 89/09259, WO 91/17243, WO 98/03640 y WO 94/21801. En particular, la WO 91/17243 revela que un componente purificado 43 kD de endoglucanasa (EGV) procedente del *Humicola* tiene una actividad abrasiva sobre los vaqueros que es aproximadamente 100 veces más alta que la de una preparación convencionalmente conocida de celulasa como mezcla de una pluralidad de componentes de celulasa. Asimismo, la WO 98/03640 revela que un componente de endoglucanasa NCE4 procedente del *Humicola* tiene una actividad abrasiva 25 veces más alta sobre los vaqueros y una actividad de eliminación de borra de liocélulas 100 veces más alta en comparación con una preparación convencionalmente conocida de celulasa como mezcla de una pluralidad de componentes de celulasa.

Se ha llevado a cabo un tratamiento con celulasa con el objetivo de aportar un aspecto de lavado a la piedra a un tejido de mezclilla (denim) teñida que contiene celulosa y mejorar el tacto del mismo, pero en este caso, causa problemas como la redeposición o el reteñido de una parte de tinte al índigo en la ropa, a saber la recoloración, durante el proceso de tratamiento.

Existe un método para intentar bajar el grado de recoloración, en el cual se dispersa el tinte al índigo en una solución de tratamiento de celulasa mediante la adición de un reactivo tal como un agente tensioactivo. Sin embargo, este método presenta problemas ya que requiere un coste para la adición del producto químico y que incrementa la carga ambiental de agua residual.

En consecuencia, se ha centrado el interés en la provisión de una celulasa que tuviera una gran actividad pero un bajo grado de recoloración, que se utilice en el tratamiento de tejido de mezclilla (denim) teñida que contiene celulosa.

Descubrimiento de la invención

Esta vez, los presentes inventores han aislado una nueva enzima endoglucanasa NCE5 que tiene una gran actividad para desintegrar los tejidos de celulosa así como su gen procedente del moho *Humicola insolens* y mostraron que esta enzima posee una estructura que no tiene precedentes para una enzima que proviene del *Humicola* e hidroliza los tejidos de celulosa, a saber que tiene un peso molecular bajo de aproximadamente 25 kDa y que no está presente ningún dominio de unión a celulosa (CBD) en la estructura.

También se mostró que, en el tratamiento de un tejido de mezclilla (denim) teñida que contiene celulosa con una preparación obtenida mediante la expresión de la enzima NCE5 por medio del *Humicola insolens* como huésped, la enzima muestra una gran actividad similar a NCE4, al mismo tiempo que muestra sorprendentemente que el grado de recoloración es bajo en comparación con NCE4.

En consecuencia, la invención considera la provisión de una celulasa que tenga un bajo grado de recoloración en el tratamiento de un tejido de mezclilla teñida que contiene celulosa y su gen.

La invención considera también la provisión de una preparación de celulasa que tiene características excelentes.

Además, la invención considera la provisión de un método para el tratamiento eficaz y barato de un tejido que contiene celulosa, que utiliza esta enzima.

Mejor realización para llevar a cabo la invención

Lo que sigue describe la invención detalladamente.

5 *Celulasa*

La enzima endoglucanasa NCE5 proporcionada por la invención tiene una característica ventajosa en lo que el grado de recoloración es bajo en comparación con la NCE4 en el tratamiento de un tejido de mezclilla teñida que contiene celulosa. Así, según la enzima de la invención, la cantidad de producto químico que ha de ser añadida tal como un agente tensioactivo puede reducirse en el tratamiento de un tejido de mezclilla teñida que contiene celulosa y, como resultado, se puede realizar una reducción de coste y lograr una reducción de la carga sobre el medioambiente.

Esta enzima es una nueva proteína que muestra cierta homología con la secuencia *egl14* de *H. grisea* indicada por S. Takashima *et al.* (S. Takashima *et al.*, *Journal of Biotechnology*, 67, 85-97 (1999)). Las características de esta enzima consisten en que posee un bajo peso molecular de aproximadamente 25 kDa y que no existe en su estructura ningún dominio de unión a celulosa (CBD). En un estado de la naturaleza, todas las enzimas que han sido aislada del moho *Humicola*, que tienen una gran actividad para desintegrar los tejidos de celulosa contenían el dominio de unión a celulosa (CBD) (por ejemplo, se ha descubierto un componente de endoglucanasa purificada (EGV) 43 kD procedente del *Humicola* en la WO 91/17243, y un componente de endoglucanasa procedente del *Humicola* (NCE4) en la WO 98/03640). Sin embargo, no se ha conocido en el mundo natural una enzima procedente del *Humicola* que no contenga CBD pero que tenga una gran actividad para desintegrar la celulosa.

Como endoglucanasa que no contiene CBD entre las enzimas procedentes de un moho distinto del *Humicola*, la JP-W-8-507695 (el término “JP-W” tal como se utiliza aquí significa una “solicitud de patente internacional japonesa publicada no verificada”) revela que la EGIII aislada del *Trichoderma longibrachiatum* tiene un pH óptimo así como su actividad de CMCase (ensayo de carboxi-metil-celulosa con Azul Brillante de Remazol) de 5.5 a 6.0 y tiene una gran actividad aun a un rango neutro a alcalino en comparación con la celulosa convencionalmente conocida procedente del *Trichoderma*. Por otro lado, la actividad de CMCase de la enzima de la invención tiene un pH óptimo de 5.0 a 9.0 y muestra una gran actividad a un rango más alcalino en comparación con la EGIII.

Esta enzima es una proteína que tiene una secuencia de la posición 19 a 223 de la secuencia descrita en SEQ ID NO:1.

Se incluye también en la invención una proteína que contiene además parte o la totalidad de una secuencia de aminoácidos desde las posiciones 1 a 18 descrita en SEQ ID NO:1 en el lado de la proteína anteriormente mencionada. A este respecto, como se considera que la secuencia de aminoácidos desde las posiciones 1 a 18 descrita en SEQ ID NO:1 es el péptido señal, la parte de la secuencia significa una secuencia que queda en el terminal-N como resultado de la generación de una diferencia en una posición que debe ser procesada por el tipo de huésped de expresión, además de su secuencia parcial que mantiene la actividad del péptido señal.

La enzima de la invención puede obtenerse a partir de mohos, de forma ilustrativa un microorganismo que pertenece al género *Humicola* (por ejemplo, *H. insolens*).

De acuerdo con la invención, se proporciona una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos descrita en SEQ ID NO:1. Una vez dada la secuencia de aminoácidos de una proteína, se determina fácilmente una secuencia de ADN que codifica la misma, de modo que se pueden seleccionar varias secuencias de nucleótidos que codifican la secuencia de aminoácidos descrita en SEQ ID NO:1.

La secuencia de nucleótidos de la invención puede ser de origen natural o un producto de síntesis total, o puede ser un producto sintetizado al hacer uso de una parte del origen natural. Los ejemplos típicos del método para obtener la secuencia de nucleótidos de la invención incluyen un método en el cual está seleccionada a partir de una librería de cADN de *Humicola insolens* mediante una técnica convencionalmente utilizada en el campo de la ingeniería genética, por ejemplo mediante un ADN apropiado preparado por sonda basándose en la información de una secuencia parcial de aminoácidos.

Una secuencia típica que codifica la secuencia de aminoácidos de la endoglucanasa NCE5 de la invención posee parte o la totalidad de la secuencia de nucleótidos descrita en SEQ ID NO:2. La secuencia de nucleótidos descrita en SEQ ID NO:2 tiene un marco abierto de lectura que empieza con la posición 1 a 3 ATG y termina por la 670 a 672 TAA. Asimismo, la secuencia de nucleótidos desde la 55 hasta la 57 corresponde al aminoácido N-terminal de la proteína madura compuesta de 205 residuos.

Actividad de la endoglucanasa

La actividad de la endoglucanasa significa la “actividad de CMCase”, que es una actividad para hidrolizar generalmente la carboxi-metil-celulosa. Una unidad de “actividad de CMCase” es definida como una cantidad de la enzima que forma los azúcares reductores que corresponden a 1 μ mol de glucosa, que es determinada por un método que comprende la incubación de una proteína que ha de ser sometida a prueba y la solución de CMC durante un tiempo fijo y luego la determinación de los azúcares reductores liberados. Además, la “actividad de CMCase” es determinada

asimismo por un método que utiliza como estándar un cambio en la viscosidad de la solución de CMC a la cual se añade una proteína que ha de ser sometida a prueba.

En la presente invención, de acuerdo con el método de Neena Din *et al.* (Neena Din *et al.*, *Biotechnology*, 9 (1991), 1096-1099), se determina la actividad de la endoglucanasa mediante la utilización, como estándar, de la actividad de liberación de fibrillas de algodón absorbente. Es decir, la cantidad de fibrillas liberadas del algodón absorbente cuando se añaden una proteína que ha de ser sometida a prueba, perlas de acero y algodón absorbente a 50 mM de una solución tampón de fosfato (pH 7), sometida a reacción en un Medidor de Lavado (L-12, Daiei Kagaku Seiki MFG., Japón) a 55°C durante 120 minutos y luego se mide la cantidad de fibrillas liberadas del algodón absorbente a una absorbancia de 600 nm.

Vector de expresión y microorganismo transformado

La invención proporciona asimismo un vector de expresión que puede replicar la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos descrita en SEQ ID NO:1 en un microorganismo huésped (el siguiente describe simplemente "la secuencia de ADN de la invención") y contiene una secuencia de ADN en un estado tal que la proteína codificada por este medio puede expresarse. El vector de expresión de la invención puede construirse basándose en un vector de autorreplicación tal como un plásmido que existe en una forma independiente fuera del cromosoma y cuya replicación no depende de la replicación del cromosoma. Asimismo, el vector de expresión de la invención puede ser un vector que está integrado en un genoma de un microorganismo huésped cuando se introduce en el microorganismo huésped y se replica junto con el cromosoma en el cual está integrado. Con respecto al procedimiento y método para la construcción del vector de la invención, se pueden emplear los que se utilizan generalmente en el campo de la ingeniería genética.

Con el fin de efectuar la expresión de una proteína que tiene una actividad deseada mediante la introducción prácticamente del vector de expresión de la invención en un microorganismo huésped, es deseable que el vector contenga no sólo la secuencia de ADN de la invención sino también otros elementos tal como una secuencia de ADN que controle la expresión y un marcador genético para seleccionar un microorganismo. Como la secuencia de ADN que controla la expresión, se incluyen aquí un promotor, un terminador y una secuencia de ADN que codifica para un péptido señal. El promotor no está particularmente limitado, con la condición de que pueda mostrar su actividad de transcripción en un microorganismo huésped, y puede ser obtenido como una secuencia de ADN que controla la expresión de un gen que codifica para una proteína idéntica o distinta de la proteína del microorganismo huésped. Asimismo, el péptido señal no está particularmente limitado, con la condición de que pueda contribuir a la secreción de la proteína en un microorganismo huésped, y puede obtenerse a partir de una secuencia de ADN procedente de un gen que codifica para una proteína idéntica o distinta de la proteína del microorganismo huésped. Además, el marcador genético de acuerdo con la invención puede seleccionarse opcionalmente en respuesta al método de selección de los transformantes, por ejemplo, se puede utilizar un gen que codifica la resistencia a un medicamento o un gen que complementa la auxotrofia.

Además, de acuerdo con la invención, se proporciona un microorganismo transformado con este vector de expresión. Este sistema de vector-huésped no está particularmente limitado, por ejemplo, un sistema en el cual se utiliza el *Escherichia coli*, un actinomiceto, una levadura o un moho y se puede utilizar un sistema de expresión de proteínas de fusión con otra proteína que utiliza el mismo.

Asimismo, la transformación de un microorganismo con este vector de expresión puede llevarse a cabo de acuerdo con las técnicas generalmente utilizadas en este campo.

Además, al cultivar el transformante resultante mediante un medio adecuado, la proteína de la invención puede obtenerse por medio de su aislamiento de la mezcla de cultivo. Así, de acuerdo con otra realización de la invención, se proporciona un método para la producción de la nueva proteína de la invención. El cultivo del transformante y sus condiciones pueden ser básicamente las mismas que las del microorganismo empleado. Después del cultivo del transformante, la proteína en cuestión puede ser recuperada por medio de un método generalmente utilizado en este campo.

Asimismo, de acuerdo con una realización preferida de la invención, se proporciona una célula de levadura capaz de expresar la enzima endoglucanasa codificada por la secuencia de ADN de la invención. Los ejemplos de célula de levadura de la invención incluyen microorganismos que pertenecen al género *Saccharomyces*, el género *Hansenula* o el género *Pichia*, por ejemplo *Saccharomyces cerevisiae*.

El moho huésped de acuerdo con la invención puede ser un moho que pertenece al género *Humicola*, el género *Aspergillus*, el género *Trichoderma*, el género *Fusarium* o el género *Acremonium*. Sus ejemplos preferidos incluyen el *Humicola insolens*, *Aspergillus niger* o *Aspergillus oryzae*, *Trichoderma viride*, *Fusarium oxysporum* y *Acremonium cellulolyticus*.

Deposición del microorganismo

El *Humicola insolens* MN200-1 ha sido depositado en el National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, una Institución Administrativa Independiente bajo el Ministerio de Economía, Comercio e Industria,

AIST Tsukuba Central 6, Higashi 1-1-1, Tsukuba, Ibaraki, Japón con número de referencia FERM BP-5977 (depósito original: FERM P-15736, fecha de depósito original: 15 de julio de 1996). Una cepa de *Escherichia coli* JM109 transformada con un plásmido pNCE5Bam que contenía el gen de celulasa de la invención (véase el Ejemplo 4) ha sido depositada a 18 de abril de 2000 en el National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, una Institución Administrativa Independiente bajo el Ministerio de Economía, Comercio e Industria, AIST Tsukuba Central 6, Higashi 1-1-1, Tsukuba, Ibaraki, Japón con número de referencia FERM BP-7138.

Una cepa de *Escherichia coli* (*Escherichia coli*/pEGD01) transformada con un plásmido pEGD01 ha sido depositada en el National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, una Institución Administrativa Independiente bajo el Ministerio de Economía, Comercio e Industria, AIST Tsukuba Central 6, Higashi 1-1-1, Tsukuba, Ibaraki, Japón con número de referencia FERM BP-5973 (depósito original: FERM P-15729, fecha de depósito original: 12 de julio de 1996).

Utilización de la celulasa/preparación de la celulasa

La enzima endoglucanasa de la presente invención puede ser proporcionada asimismo como preparación de celulosa.

La preparación de celulasa puede contener otros tipos de celulasa, tales como la celobiohidrasa, β -glucosidasa y endoglucanasa distintos de los de la invención, además de la enzima endoglucanasa de la invención, y pueden ser producidos por la mezcla además de la preparación de celulasa con los componentes generalmente empleados tales como los rellenos (por ejemplo, lactosa, cloruro sódico y sorbitol), agentes tensioactivos y antisépticos. Asimismo, la preparación de celulasa de la invención puede ser elaborada en cualquier forma adecuada tal como en forma de polvo o de líquido.

La invención proporciona también un método para quitar el color de un tejido que contiene celulosa de color, que comprende un paso de tratamiento del tejido que contiene celulosa de color con una enzima endoglucanasa y un método para proporcionar una variación localizada en el color de un tejido que contiene celulosa de color, a saber un método para dar un aspecto de lavado a la piedra al tejido que contiene celulosa de color. Este método comprende un paso para tratar el tejido que contiene celulosa de color con la enzima endoglucanasa de la invención.

Estos métodos de la invención pueden llevarse a cabo mediante el tratamiento del tejido que contiene celulosa durante el lavado. En algunos casos, sin embargo, el tratamiento del tejido puede llevarse a cabo mediante la adición de la enzima endoglucanasa de la invención al agua en la cual se remoja o se vaya a remojar el tejido durante el remojo o aclarado.

La invención proporciona además un método para reducir la velocidad a la cual un tejido que contiene celulosa empieza a soltar pelusas o para reducir la formación de borra en este tejido; o un método para reducir la velocidad a la cual un tejido que contiene celulosa se vuelve rígido o para reducir la rigidez en este tejido. Cada uno de estos métodos comprende un paso para tratar el tejido que contiene celulosa con la enzima endoglucanasa de la invención.

Sus condiciones tal como la temperatura de contacto o la cantidad de enzima endoglucanasa pueden decidirse adecuadamente considerando distintas otras condiciones. Por ejemplo, en el caso de un tratamiento de pérdida en peso de un tejido que contiene celulosa para mejorar su tacto y aspecto, se puede tratar el tejido a una temperatura de aproximadamente 50 a 60°C mediante la utilización de endoglucanasa que tenga una concentración proteica de 1 a 100 mg/L. Asimismo, cuando se desea una variación localizada en el color de un tejido que contiene celulosa de color, se le puede tratar a una temperatura de aproximadamente 50 a 60°C mediante la utilización de endoglucanasa que tenga una concentración proteica de 2 a 50 mg/L.

Asimismo, cuando se reduce la velocidad a la cual un tejido que contiene celulosa empieza a soltar pelusas o se reduce la formación de borra en un tejido como éste, puede tratarse a una temperatura de aproximadamente 50 a 60°C mediante la utilización de la enzima endoglucanasa que tiene una concentración proteica de 0,05 a 10 mg/L.

También, al utilizar la enzima de endoglucanasa de la invención en una composición detergente, se pueden mejorar la eliminación de manchas granulares, clarificación del color, eliminación de borra, despildeo y reducción de la rigidez. La composición detergente definida por la invención puede contener un agente tensioactivo (un agente iónico anfótero, catiónico, noniónico, aniónico o una mezcla de los mismos).

La composición detergente de la invención puede contener también otros componentes detergentes bien conocidos en este campo, tal como un aditivo, un agente blanqueador, un agente activo de blanqueo, un inhibidor de la corrosión, un agente acomplexante, un polímero de disociación de cepas, un perfume, otra enzima (tal como una proteasa, lipasa o amilasa), un estabilizador de enzimas, un agente asistente en formulación, un abrillantador óptico y un agente acelerador de espuma. Los ejemplos típicos del agente tensioactivo aniónico incluyen el alquil-benceno- sulfonato lineal (LAS), alquil-sulfato (AS), α -olefín-sulfonato (AOS), alcohol-etoxi-sulfato (AES) y las sales metálicas alcalinas de los ácidos grasos naturales. Los ejemplos del agente tensioactivo noniónico incluyen el polioxietilén-alquil-éter (AE), alquil-polietilén-glicol, nonil-fenol-polietilén-glicol éter, ésteres de ácidos grasos de sucrosa y glucosa, y los ésteres de polietoxi-alquil-glucósido.

Se ha descubierto que se puede realizar un destinte al dejar que la enzima de endoglucanasa de la invención reaccione con papel residual. Así, se puede mejorar notablemente un proceso para elaborar papel reciclado a partir de papel residual mediante su tratamiento con la enzima de endoglucanasa de la invención. Todo el papel generalmente denominado residual puede ser utilizado como papel residual para su utilización en la invención, y sus ejemplos incluyen los papeles de periódicos, revistas y papel impreso de primera y segunda calidad, producido mediante doblado de pulpa mecánica y pulpa química, residuos de papel sin madera compuesto de pulpa química y residuos de papel impreso tal como papel de revestimiento del mismo.

Asimismo, el término “agente de destinte” tal como se utiliza aquí significa un agente generalmente empleado para destintar el papel residual, y sus ejemplos incluyen los compuestos alcalinos como el NaOH y Na₂CO₃, silicato sódico, peróxido de hidrógeno y fosfatos, así como los agentes tensioactivos aniónicos y noniónicos, depuradores como el ácido oleico y auxiliares tal como un estabilizador de pH, un agente quelante y una agente dispersante.

También, de acuerdo con la invención, se considera que el tratamiento de la pulpa de papel con la enzima de endoglucanasa de la invención posibilita una mejora notable de su refinado sin provocar una reducción considerable de la resistencia del papel. Así, de acuerdo con la invención, se proporciona un método para mejorar el refinado de la pulpa de papel, que comprende un paso para tratar la pulpa de papel con la enzima de endoglucanasa de la invención. Los ejemplos de pulpa que puede ser tratada mediante la invención incluyen la pulpa residual, la pulpa de cartón reciclado, pasta kraft, pulpa de sulfito y tratamiento termomecánico y demás pulpas de alto rendimiento.

Además, la capacidad para digerir el glucán en la alimentación animal puede ser mejorada por la adición de la endoglucanasa de la invención en los alimentos. Así, de acuerdo con la invención, se proporciona un método para mejorar la capacidad de digestión de la alimentación animal, que comprende un paso para tratar la alimentación animal con la enzima de endoglucanasa de la invención.

Breve explicación de las figuras

La Figura 1 representa una constitución del plásmido pNCE5Bam.

La Figura 2 representa una constitución del plásmido pJND-c5.

Ejemplos

Se describe la invención de forma más ilustrativa con referencia a los ejemplos, pero la invención no se limita a los siguientes ejemplos sin sobrepasar su alcance.

Ejemplo 1

aislamiento y purificación de un componente que posee la actividad de liberación de fibrillas de algodón absorbente a partir del Humicola insolens

Se inoculó el *Humicola insolens* MN200-1 (FERM BP-5977) en un medio (N) (5,0% de Avicel, 2,0% de extracto de levadura, 0,1% de peptona, 0,03% de cloruro cálcico, 0,03% de cloruro magnésico, pH de 6.8) y se cultivó a 37°C en un batidor. A los 7 días de cultivo, el caldo de cultivo así obtenido se centrifugó a 7.000 rpm durante 20 minutos para eliminar las células, y se utilizó el filtrado de cultivo resultante como solución bruta de preparación de celulasa.

Una parte de 200 ml de esta solución bruta de preparación de celulasa fue ajustada a una solución de 1 M en concentración final de sulfato amónico y luego fue aplicada a un caudal de 20 ml/min. a una columna de Fuente PHE (volumen de gel de 150 ml, fabricada por Amersham Pharmacia Biotech) que había sido equilibrada de antemano con 1 M de solución de sulfato amónico. Luego, esto fue eluido y fraccionado por una elución de gradiente lineal de 1,0 M a 0 M de concentración de sulfato amónico en 50 mM de tampón de fosfato (pH de 7.0) a un caudal de 20 ml/min. Entre estas fracciones, se encontró una fuerte actividad de liberación de fibrillas de algodón en una parte de las fracciones obtenidas cuando la concentración de sulfato amónico era de 0,3 M. Así, se recogieron 200 ml de esta fracción. Se llevó a cabo este paso dos veces.

Una parte de 400 ml de la fracción activa así obtenida se ajustó a 1,5 M de concentración de sulfato amónico en 50 mM de tampón de fosfato (pH de 7.0) y luego se aplicó a un caudal de 20 ml/min. a una columna de Fuente ISO (volumen de gel de 125 ml, fabricada por Amersham Pharmacia Biotech) que había sido equilibrada de antemano con 1,5 M de solución de sulfato amónico en 50 mM de tampón de fosfato (pH de 7.0). Luego, esto fue eluido y fraccionado por una elución de gradiente lineal desde 1,5 M de concentración de sulfato amónico en 50 mM de tampón de fosfato (pH de 7.0) hasta agua ultrapura a un caudal de 20 ml/min. Entre estas fracciones, se encontró una fuerte actividad de liberación de fibrillas de algodón absorbente en una parte de las fracciones obtenidas cuando la concentración de sulfato amónico era de 1,05 M. Así, se recogieron 200 ml de esta fracción.

Luego, se añadió sulfato amónico hasta un nivel del 65% de saturación a 200 ml de la fracción activa así obtenida, y se agitó la mezcla a 4°C durante 60 minutos y luego se centrifugó a 15.000 rpm para recuperar el precipitado. Se disolvió este precipitado en 20 ml de agua destilada y se sometió a desalación mediante la utilización de Ultrafree/Biomax-5K (Millipore) para recuperar 40 ml de solución.

Una parte de 30 ml de la fracción activa así obtenida fue ajustada a 50 mM de tampón de acetato (pH de 4.0) y aplicada luego a un caudal de 5 ml/min. a una columna FF de Sefarosa SP (volumen de gel de 16 ml, fabricada por Amersham Pharmacia Biotech) que había sido equilibrada de antemano con 50 mM de tampón de acetato (pH de 4.0). Luego, esto fue eluido y fraccionado por una elución de gradiente lineal desde 50 mM de tampón de acetato (pH de 4.0) hasta 1 M de NaCl en 50 mM de tampón de acetato (pH 5.0) a un caudal de 4 ml/min. Entre estas fracciones, se encontró una fuerte actividad de liberación de fibrillas de algodón absorbente en una parte de las fracciones obtenidas cuando la concentración de NaCl era de aproximadamente 0,12 M. Así, se recogieron 12 ml de esta fracción.

A continuación, se ajustó una parte de 6 ml de la fracción activa así obtenida a 50 mM de tampón de acetato (pH de 4.0) y luego se aplicó a un caudal de 1 ml/min. a una columna Mono S 5/5HR (fabricada por Amersham Pharmacia Biotech) que había sido equilibrada de antemano con 50 mM de tampón de acetato (pH de 4.0). Luego, esto fue eluido y fraccionado por una elución de gradiente lineal desde 50 mM de tampón de acetato (pH de 4.0) hasta 1 M de NaCl en 50 mM de tampón de acetato (pH de 5.0) a un caudal de 1 ml/min. Entre estas fracciones, se encontró una fuerte actividad de liberación de fibrillas de algodón absorbente en una parte de las fracciones obtenidas cuando la concentración de NaCl era de aproximadamente 0,1 M. En consecuencia, se recogieron de 1 a 3 ml de esta fracción. Se aisló esta fracción como NCE5. Esta NCE5 mostró una sola banda de 25 kD por una SDS-PAGE. Al repetir 50 veces los pasos anteriores de purificación de NCE5, se obtuvo una muestra purificada en gran cantidad.

La SDS-PAGE se llevó a cabo mediante un sistema proporcionado por Tefco. Es decir que se utilizaron un recipiente de electroforesis (No. 03-101), una fuente de energía (Modelo 3540), un gel al 8% (01-015) y un kit de tampones para la utilización de SDS-PAGE (06-0301). Las condiciones de electroforesis fueron de 18 mA/10 minutos y luego 20 mA/90 minutos. Para la detección de la proteína después de la electroforesis, el manchado con plata se llevó a cabo por medio de un 2D-Silver Staining Reagent II "Daiichi" para Uso en Electroforesis (fabricada por Daiichi Pure Chemicals). Como proteína marcadora estándar, se utilizó un Rango Bajo de proteína estándar de peso molecular para SDS-PAGE (161-0304) fabricada por Bio-Rad.

La actividad de liberación de fibrillas de algodón absorbente fue medida por medio de un método modificado del método de Neena Din *et al.* (Neena Din *et al.*, *Biotechnology*, 9 (1991), 1096-1099). Es decir que la cantidad de fibrillas liberadas procedentes del algodón absorbente cuando se somete a reacción en las siguientes condiciones mediante la utilización de un medidor de lavado fue medida a una absorbancia de 600 nm.

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

Temperatura: 55°C

Tiempo: 120 minutos

pH de reacción: pH 7 (50 mM de tampón de fosfato)

Se añadieron a la solución de tratamiento las cantidades adecuadas de perlas de acero y algodón absorbente junto con una solución de endoglucanasa.

Ejemplo 2

Secuencia parcial de aminoácidos de la NCE5 celulasa

(1) Identificación de la secuencia de aminoácidos N-terminales

Con el fin de determinar la secuencia de aminoácidos N-terminales de la proteína purificada en el Ejemplo 1, la fracción de NCE5 fue tratada con SDS-PAGE mini (fabricada por Tefco), transferida en una membrana de PVDF mediante electroblotting, teñida con Azul Brillante Coomassie R250 (fabricado por Nakalai Tesque), decolorada, lavada con agua y luego secada al aire. Cuando la parte en la cual una proteína de 25 kDa fue secada, fue separada de la misma y aplicada a un secuenciador de proteínas Modelo 492 (fabricado por PE Applied Biosystems) en un intento de analizar la secuencia de aminoácidos N-terminales, no se obtuvo ninguna señal por degradación Edman, de modo que se descubrió que el aminoácido N-terminal estaba modificado y protegido. En consecuencia, la membrana fue remojada en una solución de polivinil-pirrolidona al 0,5% (peso molecular de 40.000, fabricada por Sigma)/100 mM de ácido acético a 37°C durante 30 minutos para realizar el bloqueo de la parte no-ligante de la proteína sobre la membrana, se eliminó el residuo N-terminal modificado mediante su tratamiento con Piroglutamato Aminopeptidasa Pfu (fabricada por Takara Shuzo) a 50°C durante 5 horas, y luego se llevó a cabo de nuevo la secuenciación. La secuencia así obtenida era como sigue.

Secuencia de aminoácidos N-terminales de NCE5

Ser-Gly-Ser-Gly-Arg-Thr-Thr-Arg-Tyr-Trp-Asp-(Cys)-(Cys)-Lys-Pro-Ser-(Cys)-Ala-Trp-Pro (20 residuos) (SEQ ID NO:3)

ES 2 278 743 T3

(2) Configuración de los péptidos

Con el fin de determinar la secuencia interna de aminoácidos de la proteína purificada en el Ejemplo 1, la proteína fue sometida a alquilación reductiva y luego se llevó a cabo su configuración del péptido.

Es decir que se disolvieron 300 μ g de la proteína purificada en 500 μ l de un tampón de alquilación reductiva (0,5 M de tris, 7 M de clorohidrato de guanidina, 10 mM de EDTA . 2Na₂) en un tubo, y luego se añadió al mismo 1 mg de DTT. El aire en el tubo fue sustituido por nitrógeno, y se mantuvo el contenido a temperatura ambiente durante 5 horas para llevar a cabo la reducción de la proteína. Después de la reacción de reducción, se añadieron al mismo 2,5 mg de ácido monoyodo-acético para llevar a cabo la reacción de alquilación a temperatura ambiente durante 30 minutos a la sombra. Después de la reacción, la mezcla de reacción fue dializada contra agua destilada para efectuar la desalación y luego fue liofilizada, y se utilizó el polvo así obtenido como NCE5 reductivamente alquilada.

Se disolvió este polvo en 0,1 M de tampón de bicarbonato amónico (pH de 8.0). Se mezcló la solución con aproximadamente una cantidad de 1/50 mol de tripsina (fabricada por Promega) basándose en la proteína y sometida a la reacción a 37°C durante toda la noche. Al someter el producto de digestión a una cromatografía en columna (columna: C18 220 x 2,1 mm, 0,1% de TFA en 5% de aceto-nitrilo hasta 0,085% de TFA en un 35% de gradiente de aceto-nitrilo) mediante la utilización del Sistema HPLC Preparativo Modelo 172 μ (fabricado por PE Applied Biosystems), se separaron 5 péptidos. La secuencia de aminoácidos de cada uno de los fragmentos peptídicos así obtenidos fue determinada por un secuenciador de proteínas Modelo 492 (fabricado por PE Applied Biosystems). Los resultados son como sigue.

T-28.8: Leu-Lys-Pro-Gly-Cys-Tyr-Trp-Arg (8 residuos) (SEQ ID NO: 4)

T-32.6: Tyr-Trp-Asp-Cys-Cys-Lys (6 residuos) (SEQ ID NO: 5)

T-35.9: Trp-Asp-Asn-Pro-Leu-Phe-Asp-Gly-Gly-Asn-Thr-Arg (12 residuos) (SEQ ID NO: 6)

T-39.8: Gln-Trp-Cys-Cys-Ala-Cys-Tyr-Glu-Leu-Thr-Phe-Thr (12 residuos) (SEQ ID NO: 7)

T-43.0: Phe-Asp-Trp-Phe-Leu-Asn-Ala-Asp-Asn-Pro-Ser-Val-Asn-Trp-Arg (15 residuos) (SEQ ID NO: 8)

Entre la secuencia de aminoácidos N-terminales y las secuencias de aminoácidos obtenidas por la configuración de los péptidos, 4 péptidos eran idénticos a la secuencia del *Humicola grisea* *eg14* indicada por S. Takashima *et al.* (S. Takashima *et al.*, *Journal of Biotechnology*, 67, 85-97 (1999)). Sin embargo, no se descubrió la misma secuencia en T-43.0. En consecuencia, se sugirió que, aunque la secuencia muestre homología, no es la misma sino una nueva proteína.

Ejemplo 3

Clonación del cADN de la NCE5 celulasa

(1) Aislamiento del cADN y preparación de la librería

Para el rastreo del gen de una componente de celulasa NCE5, se preparó mARN a partir del *Humicola insolens* MN200-1 y se preparó una librería mediante la sintetización del cADN por transcriptasa inversa.

(i) Preparación de ARN total

Se cultivó el *Humicola insolens* MN200-1 en un medio inductor de celulasa, preferentemente el medio (N) descrito en el Ejemplo 1, durante 2 días y se recuperaron las células resultantes mediante centrifugación (3.500 rpm, 10 minutos). Una parte de 3 g de las células fue lavada con agua estéril, fue congelada con nitrógeno líquido y luego fue pulverizada por medio de un mortero y una maja en nitrógeno líquido. Se aisló el ARN total de las células así pulverizadas por medio de ISOGEN (fabricado por Nippon Gene) de acuerdo con el manual adjunto, y el ARN total fue confirmado como imagen teñida por una electroforesis en gel de agarosa-formaldehído.

(ii) Preparación de cola poli(A) + ARN (= mARN)

Una parte de 1 mg del ARN total preparado en el paso (i) fue aplicada a una columna de oligo(dT) celulosa por medio del Kit de Purificación mARN (fabricado por Amersham Pharmacia Biotech) de acuerdo con el manual adjunto, y se eluyó y aisló el mARN. Luego el mARN fue confirmado como imagen de mancha teñida por una electroforesis en gel de agarosa-formaldehído.

(iii) *Síntesis del cADN*

Mediante la utilización del Kit de Síntesis cADN Time Saver (fabricado por Amersham Pharmacia Biotech) y de acuerdo con el manual adjunto, el cADN fue sintetizado a partir de 5 µg del mRNA preparado en el paso (ii).

(iv) *Preparación de la librería de cADN*

Un adaptador de *EcoRI-NotI* contenido en el Kit de Síntesis cADN Time Saver mencionado anteriormente fue conectado a los extremos truncados del cADN total así sintetizado de acuerdo con el manual adjunto. La parte entera de los fragmentos de ADN fue conectada al brazo de *EcoRI* de un Kit de Clonación en vector del fago λ ZAP (fabricado por Stratagene) mediante la utilización del Kit de Ligación de ADN Ver. 2 (fabricado por Takara Shuzo), fue sometida a la precipitación de etanol y luego disuelta en tampón TE (10 mM Tris-HCl, pH de 8.0, 1 mM de EDTA). El vector del fago recombinante así obtenido fue sometido a empaquetamiento *in vitro* por medio de Gigapack III Plus Packaging Extract (fabricado por Stratagene) de acuerdo con el manual adjunto. A continuación, el *Escherichia coli* XL1-Azul MRF' fue infectado con el fago recombinante y cultivado en un medio de placas, y las placas así formadas fueron utilizadas como librería de fagos. Por medio de esta librería, se clonó el gen en cuestión.

(2) *Amplificación del ADN por PCR y su análisis*

Mediante la utilización del cADN preparado en el paso (1)-(iii) como molde y basándose en la información de la secuencia parcial de aminoácidos del Ejemplo 2, el ADN fue amplificado por PCR.

Como iniciadores, se prepararon los siguientes oligonucleótidos sintéticos correspondientes a los N-terminales y a una parte de la secuencia de aminoácidos del péptido T-43.0 indicado con *.

N-terminal: 5'-TAY TGG GAY TGY TGY AAR CC-3' (20 mer) (SEQ ID NO: 9)

T-43.0: 5'-TCI GCR TTI ARR AAC CAR TC-3' (20 mer) (SEQ ID NO: 10)

El PCR se llevó a cabo mediante la utilización de 1 µg de cADN como molde en las siguientes condiciones en 50 µl de una solución de reacción que contenía 1,25 unidades de LA Taq ADN polimerasa (fabricado por Takara Shuzo) y la solución tampón unida a la misma, 0,2 mM de dNTP, 10% de DMSO y 1 µM de cada iniciador. A 94°C durante 1 minuto, (94,0°C, 30 segundos, 55,0°C, 30 segundos, 72,0°C, 1 minuto) x 25 veces y luego a 72,0°C durante 5 minutos.

Un fragmento de ADN de aproximadamente 500 bp fue amplificado por esta reacción, y se llevó a cabo su secuenciación por medio de un Kit premix de secuenciación DYEnamic ET terminator cycle (fabricado por Amersham Pharmacia Biotech) y el Analizador Genético ABI PRISM 310 (fabricado por PE Applied Biosystems) de acuerdo con el protocolo adjunto. Como resultado, la secuencia de aminoácidos deducida de la secuencia de nucleótidos así determinada contenía la totalidad de la secuencia parcial de aminoácidos obtenida en el Ejemplo 2. En consecuencia, esto se utilizó como sonda en el siguiente rastreo.

(3) *Clonación del gen del componente de celulasas NCE5*(i) *Rastreo por hibridación en placas*

Una parte de 100 ng del fragmento de 500 bp de ADN amplificado por PCR fue marcado de antemano mediante la utilización del DNA/RNA Labeling Detecting System (fabricado por Amersham Pharmacia Biotech).

Las placas de fagos preparadas en (1)-(iv) fueron transferidas sobre Hybond-N+Nylon Transfer Membrane (fabricada por Amersham Pharmacia Biotech), tratada con álcali con 0,4 N de hidróxido sódico para desnaturalizar el ADN del fago recombinante sobre la membrana en un filamento único, lavado con 5 x SSC (1 x SSC: 15 mM de citrato trisódico, 150 mM de cloruro sódico) y luego secado al aire para fijar el ADN. A continuación, las reacciones de hibridación y detección se llevaron a cabo de acuerdo con el manual del kit y luego se realizó la sensibilización en FUJI MEDICAL X-RAY FILM (fabricado por Fuji Photo Film) para obtener 6 clones positivos.

(ii) *Preparación del ADN del fago*

Se preparó el ADN como ADN plásmido a partir de los clones positivos de acuerdo con el manual adjunto al kit.

Un plásmido en el cual el fragmento de ADN estaba clonado en pBluescript SK(-) fue preparado a partir de una cepa de *E. coli* SOLRTM resistente a la ampicilina, y se llevó a cabo el PCR en las mismas condiciones descritas en lo anteriormente mencionado, utilizándolo como molde y empleando los iniciadores N-terminales y T-43.0 utilizados en el paso (2). Como resultado, se obtuvo a partir de un plásmido un producto amplificado de 500 bp. Así, como se supuso que el ADN en cuestión estaba clonado en este plásmido, éste fue digerido con *EcoRI* y sometido a una electroforesis en gel de agarosa.

Como resultado, contenía un fragmento de *EcoRI* de aproximadamente 1 kbp.

ES 2 278 743 T3

(4) Determinación de la secuencia de nucleótidos del cADN

La secuencia de nucleótidos del fragmento de *EcoRI* de aproximadamente 1 kbp insertado en el plásmido pBluescript SK(-) recombinante positivo, obtenido en el paso (3)-(ii), fue determinado por el mismo método utilizando los iniciadores T3 y T7. Como consecuencia, esta secuencia de nucleótidos contenía un ORF de 672 bp, con la secuencia de nucleótidos y una secuencia de aminoácidos deducida del ORF mostrados respectivamente en la SEQ ID NO:2 y SEQ ID NO:1 del LISTADO DE SECUENCIAS.

Asimismo, como la secuencia después del aminoácido en posición 18 contando a partir de N-terminal de esta proteína deducida coincidía con la secuencia N- terminal de la proteína de 25 kDa determinada en el paso (1) del Ejemplo 2, se reveló que este gen codificaba para la proteína de 25 kDa.

Además, se consideró que la secuencia desde los aminoácidos en 1 a 18 de este ORF es una secuencia señal para secretar la proteína en la parte extracelular.

Ejemplo 4

Expresión del gen de NCE5 en *Humicola insolens*

Se construyó un vector de expresión para su utilización en *Humicola insolens* MN200-1 de la siguiente manera haciendo uso de un plásmido pJD01 obtenido de acuerdo con el método descrito en la Publicación Internacional WO 00/24879.

(1) Construcción del plásmido pJND-c5 de expresión de NCE5

(i) Introducción de la mutación sitio-dirigida en el gen de NCE5

El gen de NCE5 fue amplificado por PCR mediante el diseño de iniciadores de forma tal que la secuencia justo aguas arriba del codón de iniciación y justo aguas abajo del codón de terminación contuviera *BamHI* de antemano, para que puedan estar conectados al sitio de *BamHI* del plásmido pJD01. Los iniciadores para uso de la mutagénesis fueron diseñados como sigue.

NCE5-N-*BamHI* 5'-GGGGATCCTGGGACAAGATGCAGCTCCCCCTGACCACG-3' (38 mer) (SEQ ID NO:11)

NCE5-C-*BamHI* 5'-GGGGATCCTGCATTTAACGCGAGCAGCCGCTCTTGCC-3' (38 mer) (SEQ ID NO:12)

La reacción por PCR se llevó a cabo en las mismas condiciones mediante la utilización del plásmido pBluescript SK(-) recombinante positivo obtenido en el Ejemplo 3 como molde. En consecuencia, un producto amplificado de un fragmento de ADN de aproximadamente 670 bp fue confirmado por una electroforesis en gel de agarosa al 1,0%. Así, se eliminaron las sustancias no sometidas a reacción por Micro Spin S-400 HR Columns (fabricado por Amersham Pharmacia Biotech), y el producto fue sometido a la precipitación de etanol y digerido con *BamHI*. Luego, su parte entera fue sometida a electroforesis en gel de agarosa al 1,0%, el fragmento de ADN de 670 bp fue recuperado mediante la utilización del Kit de Sephaglas BandPrep (fabricado por Amersham Pharmacia Biotech) de acuerdo con el manual adjunto y su fragmento de *BamHI* fue subclonado en el sitio de *BamHI* de un plásmido pUC118, obteniendo por este medio un plásmido pNCE5Bam mostrado en la Fig. 1. La secuencia de nucleótidos del fragmento insertado entonces fue determinada y confirmada por el método descrito en lo anteriormente mencionado.

(ii) Preparación del plásmido pJND-c5

El plásmido pJD01 descrito en la Publicación Internacional WO 00/24879 fue digerido con *BamHI* y separado por una electroforesis en gel de agarosa al 0,8%, y un fragmento de ADN de aproximadamente 8,0 Kbp fue recuperado mediante el Kit de Sephaglas BandPrep y sometido a desfosforilación por medio de una fosfatasa alcalina de *E. coli* (fabricada por Takara Shuzo) de acuerdo con el manual adjunto. Asimismo, el plásmido pNCE5Bam obtenido en el paso anterior (i) fue digerido con *BamHI* de la misma manera, y un fragmento de ADN de 670 bp fue recuperado y conectado mediante el Kit de Ligación de ADN Ver. 2 para obtener un plásmido de expresión pJND-c5 mostrado en la Fig. 2.

(2) Transformación del *Humicola insolens* con el plásmido pJND-c5

Se cultivó el *Humicola insolens* MN200-1 en un medio (S) a 37°C durante 24 horas y luego se recogieron las células mediante centrifugación de 10 minutos a 3.000 rpm. El medio (S) tiene una composición en la cual se añade glucosa (3,0%) al medio (N) descrito en el Ejemplo 1 y se elimina el Avicel del mismo. Se lavaron las células así obtenidas con 0,5 M de sucrosa y se suspendieron en 10 ml de una solución enzimática de formación de protoplastos (3 mg/ml de β -glucuronidasa, 1 mg/ml de quitinasa, 1 mg/ml de zimoliasa, 0,5 M de sucrosa) que había sido filtrada a través de un filtro de 0,45 μ m. Al agitarla a 30°C durante 60 a 90 minutos, las hifas se convirtieron en protoplastos. Se filtró esta suspensión y luego se centrifugó a 2.500 rpm durante 10 minutos para recuperar los protoplastos que se lavaron entonces con tampón de SUTC (0,5 M de sucrosa, 10 mM de cloruro cálcico, 10 mM de Tris-HCl (pH de 7.5)).

ES 2 278 743 T3

Los protoplastos así preparados fueron suspendidos en 1 ml del tampón de SUTC, y una parte de 100 μ l de la suspensión se mezcló con 10 μ g de solución (10 μ l) de ADN (TE) y se dejó reposar en hielo durante 5 minutos. Luego, esto se mezcló con 400 μ L de una solución de PEG (60% de PEG 4000, 10 mM de cloruro cálcico, 10 mM de Tris-HCl (pH de 7.5)), y se dejó reposar la mezcla en hielo durante 20 minutos, se mezcló con 10 ml de tampón de SUTC y luego se centrifugó a 2.500 rpm durante 10 minutos. Los protoplastos así recogidos fueron suspendidos en 1 ml de tampón de SUTC, se centrifugaron a 4.000 rpm durante 5 minutos y luego se suspendieron finalmente en 100 μ l de tampón de SUTC.

Los protoplastos así tratados recubrieron un medio YMG (1% de glucosa, 0,4% de extracto de levadura, 0,2% de extracto de malta, 1% de agar (pH de 6.8)) que contenía higromicina (200 μ g/ml), junto con agar suave YMG y se cultivaron a 37°C durante 5 días, y se utilizaron las colonias así formadas como transformantes.

Ejemplo 5

Cultivo e identificación de los transformantes de pJND-c5

(1) Evaluación por SDS-PAGE

Se introdujo el plásmido pJND-c5 en el *Humicola insolens* MN200-1 tal como se ha descrito anteriormente, y se seleccionaron 40 cepas que indicaban la resistencia a la higromicina. Se cultivaron a 37°C durante 5 días en el medio (N), y los sobrenadantes del cultivo así obtenidos fueron analizados por electroforesis de SDS-PAGE mini al 12% (fabricado por Tefco) para descubrir que una proteína de 25 kDa considerada como siendo NCE5 había aumentado particularmente en 12 clones.

(2) Identificación de los residuos de aminoácidos N-terminales de NCE5 recombinante

Con el fin de confirmar que la proteína expresada en gran cantidad en el paso anterior (1) es originada a partir del gen de NCE5, se determinó su secuencia de aminoácidos N-terminales. En primer lugar, el sobrenadante del cultivo fue separado por electroforesis de SDS-PAGE mini al 12%, las proteínas resultantes fueron transferidas eléctricamente sobre una membrana de PVDF de acuerdo con el método del Ejemplo 2, y la proteína que tenía un peso molecular de 25 kDa fue tratada para eliminar su residuo N-terminal modificado y luego fue sometida a un secuenciador de proteínas. En consecuencia, coincidió con la secuencia de aminoácidos N-terminales de NCE5 de celulasa deducida de la secuencia de nucleótidos del plásmido pJND-c5.

Ejemplo 6

Evaluación de la actividad de NCE5 expresada en el *Humicola insolens* para desgastar por abrasión el tejido de mezclilla teñida (denim) que contiene celulosa

Con la utilización del caldo de cultivo del *Humicola insolens* expresado con el gen de NCE5 obtenido en el Ejemplo 5 y un caldo de cultivo de *Humicola insolens*, se llevó a cabo el tratamiento abrasivo de un par de pantalones vaqueros azules desapretados de 12 onzas en las siguientes condiciones. El caldo de cultivo del *Humicola insolens* expresado con el gen de NCE4 fue obtenido mediante la agitación del cultivo de un transformante obtenido por medio de la introducción de un plásmido de expresión pEGD01 en el *Humicola insolens* MN200-1 de acuerdo con la descripción de la Publicación Internacional WO 98/03640. El transformante fue cultivado por agitación a 37°C durante 5 días en el cultivo (N). Se obtuvo el caldo de cultivo del *Humicola insolens* mediante la agitación del cultivo de *Humicola insolens* MN200-1 a 37°C durante 5 días.

Máquina de prueba: Lavadora de 20 kg (fabricada por Sanyo Electric, lavadora totalmente automática SCW 5101)

Temperatura: 65°C

Tiempo: 60 minutos

pH: 6.2 (6.7 mM de tampón de fosfato)

A la solución de tratamiento se añadió una cantidad apropiada de bolitas de caucho junto con cada solución de preparación de celulasa.

Como grado de desgaste por abrasión, se midió un valor L del sistema de visualización Lab (luminosidad) mediante un espectrofotómetro (fabricado por Minolta, CM-525i). Al calcular el valor L incrementado (luminosidad aumentada) basado en el control (tejido no-tratado), a saber el valor ΔL , el grado de desgaste fue evaluado por este valor ΔL . Es decir, se midieron 10 puntos del valor ΔL (n = 10) por cada mezclilla teñida (denim) de prueba y se calculó su valor promedio. Sobre esta base, se calculó la concentración de endoglucanasa como proteína necesaria para obtener un valor ΔL de aproximadamente 6.

ES 2 278 743 T3

La concentración proteica fue determinada por la preparación de una curva estándar con albúmina de suero bovino por medio del Kit de Ensayos de Proteína (fabricado por Bio-Rad Laboratories).

Los resultados son tales como se muestran en el Cuadro 1.

CUADRO 1

Muestra	Concentración Proteica
Caldo de cultivo de <i>Humicola insolens</i>	80,0 mg / litro
Caldo de cultivo de <i>H. insolens</i> expresado por NCE4	6,0 mg / litro
Caldo de cultivo de <i>H. insolens</i> expresado por NCE5	6,0 mg / litro

Ejemplo 7

Evaluación de la recoloración en el desgaste por abrasión del tejido de mezclilla teñida (denim) que contiene celulosa por el NCE5 expresado en el Humicola insolens

Por medio de los caldos de cultivo del *Humicola insolens* expresado por el gen de NCE5 y del *Humicola insolens* expresado por el gen de NCE4 obtenidos en el Ejemplo 5, se llevó a cabo el desgaste por abrasión del tejido de mezclilla teñida (denim) que contiene celulosa a varias temperaturas. La concentración de la enzima que ha de ser añadida fue definida como cantidad necesaria para obtener un valor ΔL de aproximadamente 6 a 65°C.

Para la evaluación de la recoloración, se midió la blancura de un paño de tela de algodón blanco cosida en la textura de mezclilla teñida (denim) que contiene celulosa después de la prueba como valor L del sistema de visualización Lab (luminosidad) mediante un espectrofotómetro (fabricado por Minolta, CM-525i). Un valor L más grande significa una tela blanca más blanca y un grado más bajo de recoloración.

Se muestran los resultados en el Cuadro 2. En comparación con el NCE4, el NCE5 mostró un grado más alto de desgaste por abrasión y un grado más bajo de recoloración a cada temperatura de reacción, de modo que se evidencia a partir de este resultado un grado más bajo de recoloración por el NCE5.

CUADRO 2

Enzima	Temperatura de reacción	Grado de desgaste por abrasión (ΔL)	Grado de recoloración (L)
NCE5	65° C	6,00	74,99
	55° C	8,32	75,10
	45° C	7,74	75,33
NCE4	65° C	5,88	74,53
	55° C	7,29	74,17
	45° C	6,30	74,56

ES 2 278 743 T3

Ejemplo 8

Evaluación de la acción del NCE5 expresado en el Humicola insolens para eliminar la borra de un tejido de celulosa regenerada por un medidor de lavado

La actividad del NCE5 expresado en el *Humicola insolens*, obtenido en el Ejemplo 5, para eliminar la borra de un ejemplo típico de tejido de celulosa regenerada, la liocélula, fue evaluada de la siguiente manera.

Se consiguió borra sobre un paño previamente teñido de tela de punto de liocélula (fabricada por Toyoshima, Japón) en una lavadora grande junto con un agente tensioactivo y bolitas de caucho. A continuación, la tela de punto de liocélula así obtenida con borra (fabricada por Toyoshima, Japón, de 10 cm x 10 cm) fue sometida a un tratamiento de eliminación de borra de liocélula en las siguientes condiciones para calcular la concentración proteica del NCE5 expresado en el *Humicola insolens* necesario para eliminar completamente la borra formada.

Máquina de prueba: Medidor de Lavado L-12 (Daiei Kagaku Seiki MFG., Japón)

Temperatura: 55°C

Tiempo: 60 minutos

Solución de reacción: 40 ml

pH de reacción: pH 5 (10 mM de tampón de acetato)

A la solución de tratamiento se añadió una cantidad apropiada de bolitas de caucho junto con la solución endoglucanasa.

El resultado reveló que la borra estaba completamente eliminada mediante la adición de la enzima en una concentración proteica de 6 mg/L.

Ejemplo 9

Evaluación de la acción de NCE5 expresado en el Humicola insolens para eliminar la borra de algodón cuando es formulado como detergente

La actividad de NCE5 expresado en el *Humicola insolens*, obtenido en el Ejemplo 5, para eliminar la borra de algodón, fue evaluada de la siguiente manera. Es decir que se consiguió borra sobre un paño de tela de punto de algodón (2 cm x 15 cm) en una lavadora grande mediante la utilización del sobrenadante de cultivo de NCE5 expresado en el *Humicola insolens*, preparado en el Ejemplo 5, junto con un agente tensioactivo y bolitas de caucho, y la tela resultante fue sometida a un tratamiento de eliminación de borra en las siguientes condiciones. Se calculó la concentración proteica necesaria para eliminar completamente la borra formada.

Máquina de prueba: Medidor de Lavado L-12 (Daiei Kagaku Seiki MFG., Japón)

Temperatura: 40°C

Tiempo: 120 minutos

Solución de reacción: 40 ml

pH de reacción: pH 9.3 (5 mM de tampón de bicarbonato sódico - carbonato sódico) (agente tensioactivo noniónico)

Persoft NK-100 (fabricado por Nippon Oil & Fats): 0,20 g/L (agente tensioactivo aniónico)

LAS (fabricado por Wako Pure Chemical Industries): 0,10 g/L.

A la solución de tratamiento se añadió una cantidad apropiada de bolitas de caucho junto con la solución de endoglucanasa.

En consecuencia, la borra fue completamente eliminada con una concentración proteica de 45 mg/L y se hizo posible la clarificación del color de la tela.

Además, la resistencia a la flexión del punto de algodón fue medida de acuerdo con el método Cantilever a 45° de JIS L1096. En consecuencia, la longitud de migración de un trozo de prueba de punto de algodón tratado sin añadir la enzima fue de 127 mm, pero la longitud de migración de un trozo de prueba de punto de algodón tratado mediante la adición de 15 mg/L (concentración proteica) de NCE5 fue de 81 mm lo que mostró desde luego su ablandamiento.

Ejemplo 10

Evaluación del efecto del NCE5 expresado en el Humicola insolens para mejorar el refino de la pulpa de papel

- 5 Se añadió un caldo de cultivo del *Humicola insolens* expresado por el NCE5 como cantidad proteica de 60 μ g a 6 g en peso seco de pasta kraft no-blanqueada procedente de un árbol de hoja ancha y se sometió a 1 hora de la reacción a 50°C en 270 ml de 50 mM de tampón de citrato (pH de 6.0). La enzima fue inactivada mediante ebullición de la mezcla durante 10 minutos, y luego se midió el refino (CSF) de acuerdo con JIS P-8121. Los resultados se muestran en el Cuadro 3.

CUADRO 3

Muestra	CSF (ml)
Sin plan de adición de enzima	492
Caldo de cultivo de <i>Humicola insolens</i> expresado por NCE5	519

Aplicabilidad industrial

25 La enzima de endoglucanasa NCE5 de la invención puede ser utilizada en composiciones de detergentes y también es útil en el destinte de papel residual, mejorando el refino de la pulpa de papel y mejorando las propiedades de los tejidos que contienen celulosa, como la eliminación de la borra, la mejora del tacto y aspecto, clarificación del color, variación localizada en el color y reducción de la rigidez.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una proteína que tiene la actividad endoglucanasa, que comprende una secuencia desde la posición 19 hasta la posición 223 de la secuencia de aminoácidos descrita en SEQ ID NO:1.
2. La proteína según la Reivindicación 1, **caracterizada** porque contiene además parte o una parte entera de una secuencia de aminoácidos desde las posiciones 1 a 18 descrita en la SEQ ID NO:1 en el lado N-terminal.
- 10 3. La enzima según la Reivindicación 1 ó 2, **caracterizada** porque procede de un moho.
4. La enzima según la Reivindicación 3, **caracterizada** porque el moho pertenece al género *Humicola*.
5. La enzima según la Reivindicación 4, **caracterizada** porque el moho pertenece al *Humicola insolens*.
- 15 6. Un ADN que comprende una secuencia de ADN que codifica para la proteína o enzima descrita en cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 5.
7. Un ADN que comprende la secuencia de ADN descrita en la SEQ ID NO:2.
- 20 8. Un vector de expresión que comprende la secuencia de ADN descrita en la Reivindicación 6 ó 7.
9. Una célula huésped transformada con el vector de expresión descrito en la Reivindicación 8.
- 25 10. La célula huésped según la Reivindicación 9, **caracterizada** porque es una levadura o un moho.
11. La célula huésped según la Reivindicación 10, **caracterizada** porque la levadura pertenece al género *Saccharomyces*, el género *Hansenula* o el género *Pichia*.
- 30 12. La célula huésped según la Reivindicación 11, **caracterizada** porque la levadura es *Saccharomyces cerevisiae*.
13. La célula huésped según la Reivindicación 10, **caracterizada** porque el moho pertenece al género *Humicola*, el género *Aspergillus*, el género *Trichoderma*, el género *Fusarium* o el género *Acremonium*.
- 35 14. La célula huésped según la Reivindicación 10, **caracterizada** porque el moho es *Humicola insolens*, *Aspergillus niger* o *Aspergillus oryzae*, *Trichoderma viride*, *Fusarium oxysporum* o *Acremonium cellulolyticus*.
- 40 15. Un método para producir la proteína o enzima descrita en cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 5, que comprende los pasos de cultivar la célula huésped descrita en cualquiera de las Reivindicaciones 9 a 14 y posteriormente recoger la enzima o proteína descrita en cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 5 procedente de la célula huésped y/o su mezcla de cultivos.
- 45 16. Un método para tratar un tejido que contiene celulosa, que comprende un paso que permite que el tejido que contiene celulosa entre en contacto con la proteína o enzima descrita en cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 5.
17. Un método para reducir la velocidad a la cual un tejido que contiene celulosa empieza a soltar pelusas o para reducir la formación de borra en un tejido que contiene celulosa, que comprende un paso que permite que el tejido que contiene celulosa entre en contacto con la proteína o enzima descrita en cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 5.
- 50 18. Un método para tratar la pérdida de peso de un tejido que contiene celulosa para mejorar su tacto y aspecto, que comprende un paso que permite que el tejido que contiene celulosa entre en contacto con la proteína o enzima descrita en cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 5.
- 55 19. Un método para proporcionar la clarificación del color del tejido de color que contiene celulosa, que comprende un paso que trata el tejido de color que contiene celulosa con la proteína o enzima descrita en cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 5.
- 60 20. Un método para proporcionar una variación localizada en el color de un tejido de color que contiene celulosa, que comprende un paso que trata el tejido de color que contiene celulosa con la proteína o enzima descrita en cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 5.
21. Un método para reducir la velocidad a la cual un tejido que contiene celulosa se vuelve rígido o para reducir la rigidez en un tejido que contiene celulosa, que comprende un paso que trata el tejido que contiene celulosa con la proteína o enzima descrita en cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 5.
- 65 22. El método según cualquiera de las Reivindicaciones 16 a 21, **caracterizado** porque se lleva a cabo el tratamiento del tejido mediante remojo, lavado y aclarado del tejido.

ES 2 278 743 T3

23. Un agente detergente aditivo que comprende la proteína o enzima descrita en cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 5, en una forma granular no-dispersante o una forma líquida estabilizada.

5 24. Una composición detergente que comprende la proteína o enzima descrita en cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 5.

10 25. Un método para desteñir papel residual, que comprende la utilización de la proteína o enzima descrita en cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 5, en un paso que lleva a cabo el destinte mediante el tratamiento del papel residual con un agente de destinte.

26. Un método para mejorar el refino de la pulpa de papel, que comprende un paso que trata la pulpa de papel con la proteína o enzima descrita en cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 5.

15 27. Un método para mejorar la capacidad de digestión de la alimentación animal, que comprende un paso que trata una fibra que contiene celulosa con la proteína o enzima descrita en cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 5.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

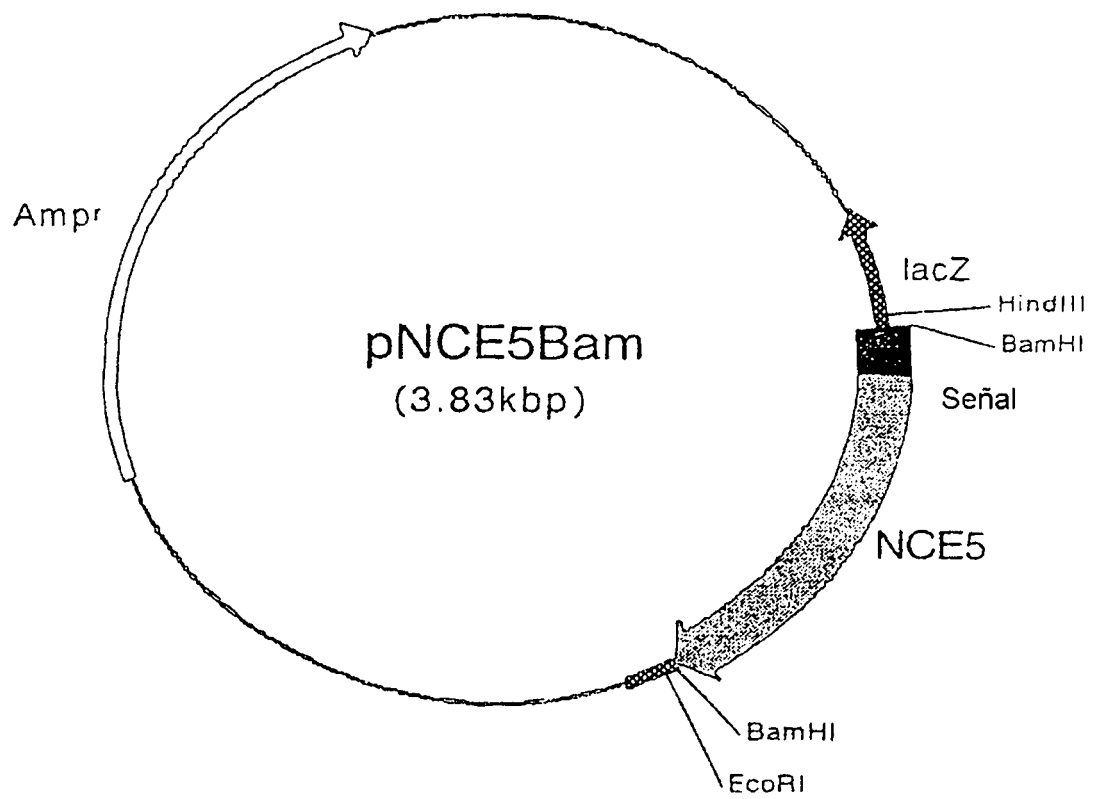


FIGURA 1

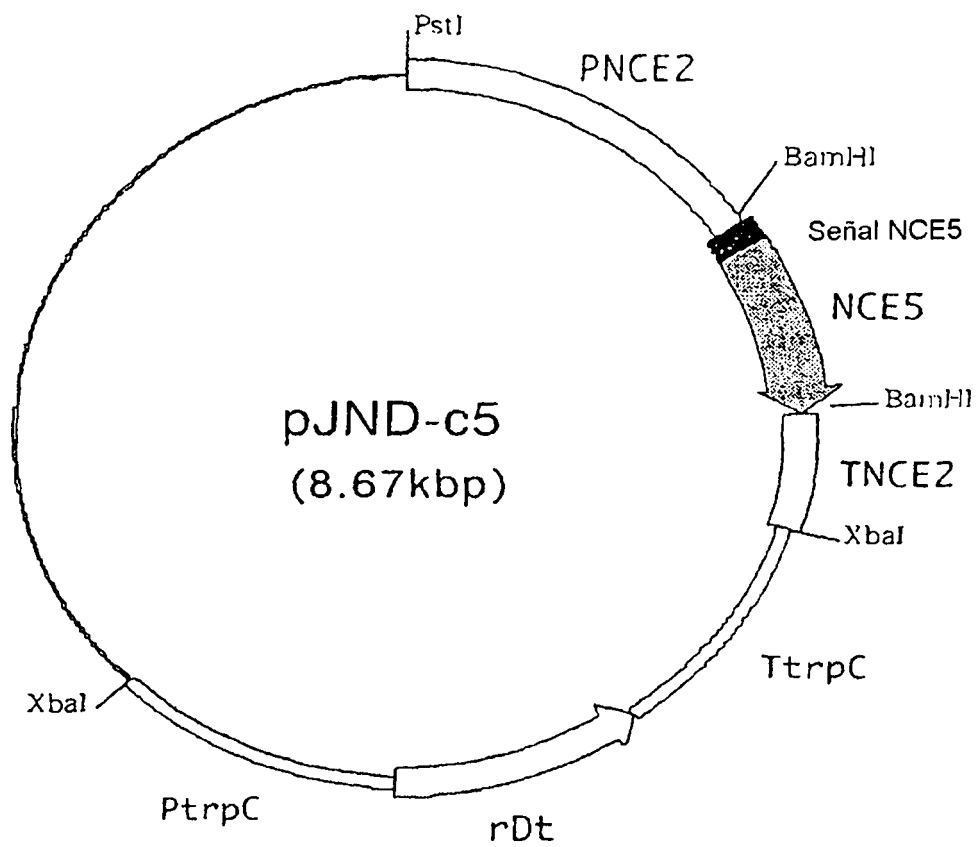


FIGURA 2

ES 2 278 743 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Meiji Seika Kaisha, Ltd.

5 <120> Cellulase Preparation Containing Endoglucanase Enzyme NCE5.

<130> PH-1228-PCT

10 <160> 12

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

15 <211> 223

<212> PRT

<213> *Humicola insolens*

20 <400> 1

Met Gln Leu Pro Leu Thr Thr Leu Leu Thr Leu Leu Pro Ala Leu Ala

25 1 5 10 15

Ala Ala Gln Ser Gly Ser Gly Arg Thr Thr Arg Tyr Trp Asp Cys Cys

30 20 25 30

Lys Pro Ser Cys Ala Trp Pro Gly Lys Gly Pro Ala Pro Val Arg Thr

35 35 40 45

Cys Asp Arg Trp Asp Asn Pro Leu Phe Asp Gly Gly Asn Thr Arg Ser

40 50 55 60

Gly Cys Asp Ala Gly Gly Gly Ala Tyr Met Cys Ser Asp Gln Ser Pro

45 65 70 75 80

Trp Ala Val Ser Asp Asp Leu Ala Tyr Gly Trp Ala Ala Val Asn Ile

50 85 90 95

Ala Gly Ser Asn Glu Arg Gln Trp Cys Cys Ala Cys Tyr Glu Leu Thr

55 100 105 110

60

65

ES 2 278 743 T3

Phe Thr Ser Gly Pro Val Ala Gly Lis Arg Me Ile Val Gln Ala Ser
 115 120 125

5

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

10

Gly Gly Gly Val Gly Ile Phe Asn Ala Cys Thr Asp Gln Tyr Gly Ala
 145 150 155 160

15

Pro Pro Asn Gly Trp Gly Gln Arg Tyr Gly Gly Ile Ser Gln Arg His
 165 170 175

20

Glu Cys Asp Ala Phe Pro Glu Lys Leu Lys Pro Gly Cys Tyr Trp Arg
 180 185 190

25

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

30

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

35

<210> 2
 <211> 672
 <212> DNA

40

<213> *Humicola insolens*
 <400> 2

45

atgcagctcc ccttgaccac gctcctcacc ctctctccccg cctctgcggc ggcccagtc 60
 ggcagcggcc gcaccacgcg ctactgggac tgcctgcaagc cgtcgtgcgc gtggcccggc 120
 aagggcccgg cgcccggtgcg gacgtgcgac cgggtgggaca acccgctgtt cgacggcggc 180
 aacacgcgca gcggtgca ggcgggcggc ggcgcctaca tgtgctcgga ccagagccc 240
 tgggcgggtca ggcacgacct ggcgtacggc tgggcggccg tcaacattgc cggtccaac 300
 gagaggcagt ggtgctgcgc ctgctacgag ctgaccttca ccagcgggccc ggtggcgggc 360
 aagaggatga ttgtgcaggc gagcaacacg ggaggcgatt tggggaacaa ccactttgat 420
 attgctatgc cggcggttg cgtcgggtatc ttcaacgcct gcaccgacca gtacggcgcg 480
 ccccccaacg gctggggcca gcgctacggc ggcctcagcc aacgccacga gtgcgacgcc 540
 tccccgaga agctcaagcc aggtctgatac tggcgttttg actggttctt caacgcgcgac 600
 aacccgagcg tcaactggcg gcaggtcagc tgcccggccg agattgtggc caagagcggc 660
 tgctcgcgtt aa 672

65

<210> 3
 <211> 20

ES 2 278 743 T3

<212> PRT

<213> *Humicola insolens*

5 <400> 3

Ser	Gly	Ser	Gly	Arg	Thr	Thr	Arg	Tyr	Trp	Asp	Cys	Cys	Lys	Pro	Ser
1				5					10					15	
Cys	Ala	Trp	Pro												
			20												

10

<210> 4

<211> 8

15

<212> PRT

<213> *Humicola insolens*

20 <400> 4

Leu	Lys	Pro	Gly	Cys	Tyr	Trp	Arg
1				5			

25 <210> 5

<211> 6

<212> PRT

<213> *Humicola insolens*

30

<400> 5

Tyr	Trp	Asp	Cys	Cys	Lys
1				5	

35

<210> 6

<211> 12

40 <212> PRT

<213> *Humicola insolens*

<400> 6

45

Trp	Asp	Asn	pro	Leu	Phe	Asp	Gly	Gly	Asn	Thr	Arg
1				5					10		

50 <210> 7

<211> 12

<212> PRT

<213> *Humicola insolens*

55

<400> 7

Gln	Trp	Cys	Cys	Ala	Cys	Tyr	Glu	Leu	Thr	Phe	Thr
1				5					10		

60

<210> 8

<211> 15

65 <212> PRT

<213> *Humicola insolens*

ES 2 278 743 T3

<400> 8

Phe Asp Trp Phe Leu asn Ala Asp Asn Pro Ser Val Asn Trp Arg
1 5 10 15

5 <210> 9
<211> 20
10 <212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
15 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 9

20 taytgggayt gytgyaarcc 20

<210> 10
<211> 20
25 <212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
30 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<220>
<221> n
35 <222> 3
<223> inosine

<220>
40 <221> n
<222> 9
<223> inosine

45 <400> 10

tcngcrttna rraaccartc 20

50 <210> 11
<211> 38
<212> DNA
55 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

60 <400> 11

ggggatcctg ggacaagatg cagctcccc tgaccacg 38

65 <210> 12
<211> 38

ES 2 278 743 T3

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

5 <220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 12

10

ggggatcctg cattacgc gagcagccgc tctggcc

38

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65