

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 907 702**

51 Int. Cl.:

C12N 9/42 (2006.01)

C12N 1/15 (2006.01)

C12N 15/56 (2006.01)

C12N 15/62 (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: **23.10.2015** **PCT/FI2015/050727**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.05.2016** **WO16066896**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.10.2015** **E 15854668 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.12.2021** **EP 3212777**

54 Título: **Variantes de endoglucanasa fúngicas, su producción y uso**

30 Prioridad:

27.10.2014 FI 20145941

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

26.04.2022

73 Titular/es:

**AB ENZYMES OY (100.0%)
Tykkimäentie 15b
05200 Rajamäki, FI**

72 Inventor/es:

**JUNTUNEN, KARI;
ALAPURANEN, MARIKA;
VALTAKARI, LEENA;
MERILÄINEN, HANNA-MARI y
PURANEN, TERHI**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 907 702 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

Variantes de endoglucanasa fúngicas, su producción y uso

Campo de la invención

- 5 La invención se refiere a nuevas variantes de endoglucanasas fúngicas, a su producción y a medios para su producción. La invención también se refiere a preparaciones de enzima que comprenden al menos una de las variantes nuevas de endoglucanasa así como a procedimientos para tratar material celulósico con los mismos. Las nuevas variantes de endoglucanasa son especialmente útiles en el tratamiento de materiales textiles y aplicaciones detergentes.

Antecedentes de la invención

- 10 La celulosa es un polisacárido lineal de restos de glucosa conectados mediante enlaces β -1,4. Es el componente principal de las paredes de las células vegetales, y el bloque de construcción básico para muchos materiales textiles y para el papel. Proporciona a las células vegetales resistencia remarcable ayudándolas a resistir la tensión mecánica y la presión osmótica. El algodón es la forma natural más pura de la celulosa.

- 15 Las celulasas o enzimas celulolíticas son un grupo de enzimas glucósido hidrolasa que cataliza la hidrólisis de los enlaces glucosídicos β -1,4 en el polímero celulosa. Se sabe que las celulasas son producidas por un gran número de bacterias, levaduras, y hongos. Las celulasas comprenden un dominio/núcleo catalítico (CD) que expresa la actividad de la celulasa. Además del dominio catalítico, la molécula de celulasa puede comprender uno o más dominios de unión a celulosa (CBDs), también llamados módulos/dominios de unión a carbohidrato (CBD/CBM). El CBD potencia la unión de la enzima a una fibra que contiene celulosa e incrementa la eficacia del dominio catalítico.

- 20 Las celulasas se utilizan, tomando como base sus propiedades, en diversos campos industriales. En la industria textil, las celulasas se utilizan en el acabado denim para crear una apariencia de lavado a la piedra a la moda en ropa denim en un procedimiento de biodesgaste (biostoning, en inglés), y también se utilizan, por ejemplo, para limpiar la pelusa y evitar la formación de bolitas sobre la superficie de las prendas de algodón. En la industria de detergentes, las celulasas se utilizan para abrillantar los colores, para evitar que se pongan grises y la formación de bolitas de las prendas y para mejorar la limpieza. Las celulasas también se utilizan en la industria de los alimentos, incluyendo panadería, y en la fabricación de alimentos para animales, y tienen un potencial enorme en la industria de la pulpa y papel, por ejemplo, en el destañado para liberar la tinta de las superficies de la fibra, para mejorar el drenaje de la pulpa y la modificación de la fibra, en la reducción de energía, en las etapas de refinado y secado de la producción de papel, cartón y pulpa. Las celulasas también se utilizan en la hidrólisis de material lignocelulósico, p. ej., en la producción de bioetanol.

- 35 El uso práctico de las celulasas está obstaculizado por la naturaleza de las composiciones de celulasa, que a menudo son mezclas de enzimas que tienen una variedad de actividades y especificidades de sustrato. Las propiedades únicas de cada celulasa hacen a algunas más apropiadas para ciertos propósitos que otras. El amplio espectro de usos industriales para la celulasas ha establecido una necesidad de productos de celulasa comerciales que contengan diferentes componentes de celulasa y que funcionen a intervalos de pH y temperatura diferentes. Los costes de producción de enzimas producidas microbiológicamente están estrechamente conectados con la productividad de la cepa productora de la enzima y el rendimiento de actividad final en el caldo de fermentación. Existe una necesidad en la técnica de identificar variantes de enzima y composiciones enzimáticas que tengan eficacia y capacidad mejoradas para actuar sobre una mayor variedad de materiales celulósicos.

- 40 El documento US2011250674 (A1) proporciona un método para mejorar las propiedades de una enzima celulolítica, es decir, una endo-1,4-glucanasa, mediante sustitución, delección o inserción de aminoácidos. La invención divulga variantes de celulasa de *Hemicella insolens*, que han sido mejoradas con respecto a la actividad; y/o sensibilidad a tensidos aniónicos; y/o pH óptimo y perfil de pH así como estabilidad. El documento US20130244292 se refiere a una variante de glucósido hidrolasa de la familia 5 que tiene actividad de endoglucanasa y a los polinucleótidos que codifican los polipéptidos.

- 45 El documento WO2007118935 divulga proteínas de fusión de celulasa que tienen una región de núcleo de endoglucanasa y un dominio de unión a celulosa heterólogo.

- Aunque las enzimas celulolíticas han sido utilizadas satisfactoriamente en aplicaciones comerciales durante muchos años, sigue existiendo una necesidad respecto a enzimas celulolíticas nuevas con propiedades alteradas, tal como rendimiento mejorado, en aplicaciones industriales variables.

Breve descripción de la invención

Un objeto de la presente invención es por lo tanto proporcionar nuevas variantes de enzimas celulolíticas, que muestran rendimiento mejorado, cuando se comparan con la enzima progenitora.

Los objetos de la invención se logran mediante un polipéptido de endoglucanasa variante que comprende una

secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95% de identidad de secuencia con los aminoácidos 1 a 214 de SEQ ID NO: 1 y una sustitución de aminoácido en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 51, 75, 77, 82, 109, 116, 118, 135, 150 y 205, estando las posiciones numeradas con referencia a SEQ ID NO: 1, en donde el polipéptido variante tiene actividad de endoglucanasa.

5 La invención también está dirigida a un polinucleótido aislado seleccionado del grupo que consiste en:

a) un polinucleótido o ADN complementario que codifica una variante de polipéptido de endoglucanasa de la reivindicación 1;

b) un polinucleótido o ADN complementario que codifica una variante de polipéptido de endoglucanasa de la reivindicación 8;

10 c) un polinucleótido que codifica un fragmento de un polipéptido codificado por un polinucleótido de a) o b) en donde dicho fragmento tiene actividad de endoglucanasa;

d) un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótido que se degenera a la secuencia de nucleótido de una secuencia de polinucleótido de a), b) o c); o la hebra complementaria de tal polinucleótido.

15 La invención se dirige incluso a un vector de expresión que comprende dicho polinucleótido y una célula hospedante que comprende dicho vector de expresión.

Incluso además la invención se dirige a un método para la producción de la variante de polipéptido de endoglucanasa, que comprende las etapas de transformar una célula hospedante con un vector de expresión que codifica dicho polipéptido, y cultivar dicha célula hospedante bajo condiciones que permitan la expresión de dicho polipéptido, y opcionalmente recuperar y purificar dicho polipéptido.

20 La invención también se dirige a una preparación de enzima que comprende al menos una variante nueva de polipéptido de endoglucanasa de la invención y al uso de dicha preparación de enzima especialmente en la industria de textiles y detergentes, aunque también en el procesamiento de biomasa, preferiblemente en las industrias de biocombustibles, almidón, pulpa y papel, comida, panadería, alimentación o bebidas.

25 En un aspecto, la presente invención se refiere a una composición de detergente que comprende una variante de polipéptido de endoglucanasa o una preparación de enzima de la invención y opcionalmente auxiliares, tales como agentes activos de superficie, tensoactivos, agentes blanqueadores, coadyuvantes, estabilizantes, amortiguadores, mediadores de una oxidasa, agentes anti-corrosión, polímeros/agentes anti-redeposición, abrillantadores ópticos, colorantes, pigmentos, cáusticos, abrasivos y conservantes, perfumes, etc.

30 La invención también se refiere a un procedimiento para tratar el material celulósico, en donde dicho procedimiento comprende poner en contacto el material celulósico con la variante de polipéptido de endoglucanasa o preparación de enzima de la invención. El tratamiento del material celulósico implica aplicaciones detergentes, biodesgaste o bioacabado.

35 Las realizaciones específicas de la invención se indican en las reivindicaciones dependientes. Otros objetos, detalles y ventajas de la presente invención serán evidentes a partir de las siguientes figuras, descripción detallada y ejemplos. Sin embargo, se debería entender que las realizaciones dadas en la descripción, figuras y en los ejemplos son solamente para propósitos ilustrativos, y que son posibles diversos cambios y modificaciones dentro del alcance de las reivindicaciones.

40 La presente invención describe celulasas mejoradas, de rendimiento más alto para ser utilizadas en diversos procedimientos industriales. La invención divulga un número de posiciones de restos de aminoácido importantes para las propiedades de una enzima endoglucanasa y por tanto para el rendimiento de la misma. Particularmente, la presente invención divulga polipéptidos de endoglucanasa variantes que tienen rendimiento mejorado en aplicaciones textiles, especialmente en bioacabado y biodesgaste, y en aplicaciones detergentes, en el cuidado de la fibra y mantenimiento del color, especialmente en la prevención y eliminación de pelusa y bolitas, en el cuidado y reavivado del color. Las endoglucanasas variantes de la invención se comportan bien a un intervalo de pH amplio y notablemente a pH neutro y alcalino. Esto permite el tratamiento de bioacabado simultáneamente con el teñido, lo que conduce a un ahorro de costes considerable. La solidez del color con frecuencia es mejor en condiciones neutras. Estas endoglucanasas nuevas también son efectivas a dosificaciones de enzima más pequeñas que las enzimas de referencia.

Breve descripción de las figuras

50 A continuación la invención se describirá con mayor detalle por medio de realizaciones preferidas con referencia a las figuras anejas, en las que

La figura 1 ilustra una imagen esquemática de los casetes de expresión utilizados en la transformación de *Trichoderma reesei* A152 para la producción de celulasas de *Acremonium thermophilum* de la invención. Los genes recombinantes estaban bajo el control del promotor *cel7A* de *T. reesei* y la terminación de la transcripción se

aseguraba con la adición del terminador *cel7A* de *T. reesei*. El gen *amdS* (*amdS*) se incluyó para selección de los transformantes.

La figura 2 muestra el rendimiento de las variantes de ACM0 de *A. thermophilum* en aplicación detergente como un incremento del oscurecimiento (suma de $-\Delta L^*$ de 4 tiras) después de 10 ciclos de lavado y secado de los monitores de ensayo. Se utiliza la preparación comercial Carezyme® y la celulasa ACM0 para comparación. Las condiciones de lavado en el aparato Launder-Ometer fueron: 40°C, 60 min, 16°dH, detergente líquido comercial 5 g/l, pH aproximado 8,5, dosificación de enzima 0,2 mg AEP/l.

La figura 2A muestra los resultados del monitor de ensayo previo a la formación de bolitas E-253. Efecto de eliminación de bolitas/reavivado del color.

La figura 2B muestra los resultados del monitor de ensayo sin bolitas (E-252). Efecto de cuidado del color/antiformación de bolitas.

La figura 3 muestra el rendimiento de las variantes ACM72 y ACM88 de ACM0 de *A. thermophilum* en aplicación detergente como un incremento del oscurecimiento (suma de $-\Delta L^*$ de 4 tiras) después de 10 ciclos de lavado y secado de los monitores de ensayo. Se utiliza la preparación comercial Carezyme® y la celulasa ACM0 para comparación. Las condiciones de lavado en el aparato Launder-Ometer fueron: 40°C, 60 min, 16°dH, detergente líquido comercial 5 g/l, pH aproximado 8,5, dosificación de enzima 0,1 mg AEP/l.

La figura 3A muestra los resultados del monitor de ensayo previo a la formación de bolitas E-253. Efecto de eliminación de bolitas/reavivado del color.

La figura 3B muestra los resultados del monitor de ensayo sin bolitas (E-252). Efecto de cuidado del color/antiformación de bolitas.

La figura 4 muestra el rendimiento de la variante ACM88 de ACM0 de *A. thermophilum* en el tratamiento de bioacabado (eliminación de pelusa) en lavadora a 50°C, pH 6 o sin ajuste (pH aproximado 8), 60 minutos, dosificación de enzima de 0,025 o 0,05 mg AEP por peso (g) de la tela. La celulasa ACM0 se utilizó para comparación.

La figura 5 muestra el rendimiento de las variantes ACM90 y ACM91 de celulasa de Cel45A de *A. thermophilum* en aplicación detergente como un incremento del oscurecimiento (suma de $-\Delta L^*$ de 4 tiras) después de 10 ciclos de lavado y secado de los monitores de ensayo. Se utilizó la celulasa At_Cel45A para comparación. Las condiciones de lavado en el aparato Launder-Ometer fueron: 40°C, 60 minutos, 16°dH, detergente líquido comercial 5 g/l, pH aproximado 8,5, dosificación de enzima 0-0,2 o 0-0,4 mg AEP/l.

La figura 5A muestra los resultados del monitor de ensayo previo a la formación de bolitas E-253. Efecto de eliminación de bolitas/reavivado del color.

La figura 5B muestra los resultados del monitor de ensayo sin bolitas (E-252). Efecto de cuidado del color/antiformación de bolitas.

Descripción detallada de la invención

Las enzimas celulolíticas o celulasas son enzimas que tienen actividad celulolítica, lo que significa que son capaces de hidrolizar sustratos celulósicos o derivados de los mismos a sacáridos más pequeños. Por lo tanto las enzimas celulolíticas incluyen tanto celulasas como hemicelulasas. Las celulasas incluyen (1) endoglucanasas (EG, EC 3.2.1.4) que cortan los enlaces beta-1,4-glucosídicos internos; (2) exoglucanasas o celobiohidrolasas (CBH, EC 3.2.1.176, EC 3.2.1.91) que cortan el disacárido celobios del extremo reductor o no reductor de la cadena polimérica de celulosa cristalina y (3) beta-1,4-glucosidasas (BG, EC 3.2.1.21) que hidrolizan la celobiosa y otros celo-oligosacáridos cortos a glucosa.

La presente invención se refiere en particular a endoglucanasas. Específicamente, la presente invención se refiere a endoglucanasas fúngicas que pertenecen a la familia 45 de glucosil hidrolasa, especialmente a variantes de estas endoglucanasas. Más específicamente, la invención se refiere a variantes del polipéptido de endoglucanasa Cel45A de *Acremonium thermophilum*. "Familia 45 de glucosil hidrolasa" se refiere a la familia de glucosil hidrolasa como ha sido definida por Henrissat 1991, y Henrissat y Bairoch 1993, 1996.

Las variantes de la invención se diseñaron mediante técnicas de ingeniería de proteínas tomando como base la comparación de secuencias de aminoácido entre los dominios del núcleo catalítico de Cel45A de *Acremonium thermophilum* y Cel45A de *Geomyces pannorum* (SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2, respectivamente) y sus estructuras tridimensionales. Las secuencias de aminoácido y de nucleótido de Cel45A de *Acremonium thermophilum* y Cel45A de *Geomyces pannorum* y su aislamiento se divulgan en las solicitudes de patente FI20055692 and FI20086253 (AB Enzymes Oy, FI).

La invención se refiere a un polipéptido de endoglucanasa variante o un fragmento enzimáticamente activo del mismo, que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95% de identidad de secuencia con los aminoácidos

1 a 214 de SEQ ID NO: 1 y una sustitución de aminoácidos en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste de 51, 75, 77, 82, 109, 116, 118, 135, 150 y 205, estando las posiciones numeradas con referencia a SEQ ID NO: 1, en donde el polipéptido variante tiene actividad de endoglucanasa. Especialmente, el polipéptido de endoglucanasa variante tiene al menos 96, 97, 98 ó 99% de identidad con los aminoácidos 1 a 214 of SEQ ID NO: 1. El polipéptido de endoglucanasa variante puede contener cualquier combinación de dichas sustituciones.

Con el término "identidad" se quiere decir en el presente documento la identidad entre dos secuencias de aminoácido. El grado de identidad se determina utilizando el programa de alineación de secuencias por pares EMBOSS Water en el EBI (Instituto de Bioinformática Europeo) http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_water/ con los siguientes parámetros: BLOSUM62, Abertura de Hueco 10, Extensión de Hueco 0,5. El algoritmo se describe en Smith y Waterman (1981).

En una realización de la invención la variante de polipéptido comprende una sustitución en una posición que corresponde a una o más de S51N, A75S, A77S, S82Q, S109N, S116Q, S116E, Q118H, A135Q, S150Q y S205N.

En otra realización la variante de polipéptido tiene una sustitución en las posiciones que corresponden a S51N, S82Q, S109N, S116E, Q118H, A135Q, S150Q y S205N.

Incluso en otra realización la variante de polipéptido tiene una sustitución en las posiciones que corresponden a S51N, S82Q, S116E, Q118H, A135Q, S150Q y S205N.

Según una realización el polipéptido de endoglucanasa variante tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 ó 13 y una sustitución de aminoácidos en una o más posiciones que se seleccionan del grupo que consiste en 51, 75, 77, 82, 109, 116, 118, 135, 150 y 205, estando las posiciones numeradas con referencia a SEQ ID NO: 1.

Según una realización el polipéptido de endoglucanasa variante tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 y una sustitución en las posiciones que corresponden a S51N, S82Q, S109N, S116E, Q118H, A135Q, S150Q y S205N.

Según otra realización el polipéptido de endoglucanasa variante tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 y una sustitución en las posiciones que corresponden a S51N, S82Q, S116E, Q118H, A135Q, S150Q y S205N.

Según una realización el polipéptido de endoglucanasa variante tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 y una sustitución en las posiciones que corresponden a S51N, S82Q, S109N, S116E, Q118H, A135Q, S150Q y S205N.

Según otra realización el polipéptido de endoglucanasa variante tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 y una sustitución en las posiciones que corresponden a S51N, S82Q, S116E, Q118H, A135Q, S150Q y S205N.

En la presente invención las variantes de polipéptido se derivan a partir de una molécula progenitora cel45A-ACMO (SEQ ID NO: 3), que es un polinucleótido que contiene una región que codifica el dominio del núcleo catalítico de Cel45A de *A. thermophilum* unida al enlazador y a la región CBM de Cel7A de *T. reesei*, o a partir de una molécula progenitora cel45A (SEQ ID NO: 9), que es un polinucleótido que contiene una región que codifica el dominio del núcleo catalítico de la endoglucanasa Cel45A de *A. thermophilum* y que tiene el enlazador natural y la región CBM.

Sin embargo, se puede utilizar cualquier secuencia de polinucleótido que codifica el dominio del núcleo catalítico de Cel45A de *A. thermophilum* para crear las variantes de polipéptido de la invención.

Tal como se utiliza en el presente documento, una "variante" es un polipéptido que tiene una sustitución, delección o inserción de aminoácido en una o más posiciones. Preferiblemente, las variantes tienen una sustitución. Las variantes se generan mediante mutagénesis es decir introduciendo deliberadamente cambios en el ADN para producir productos de gen mutante es decir, proteínas. Los cambios o modificaciones de la secuencia de nucleótido progenitora se pueden introducir mediante varios métodos incluyendo por ejemplo mutagénesis dirigida al sitio y mutagénesis aleatoria. Para la mutagénesis dirigida al sitio es beneficiosa una estructura de proteína y un buen entendimiento de la relación de estructura-función. En ausencia de dicho entendimiento profundo, se pueden utilizar métodos basados en mutagénesis aleatoria.

Una variante se puede obtener, por ejemplo, alterando los contactos de enlace de hidrógeno, alterando la distribución de carga, introduciendo un puente salino, introduciendo sitios de unión a metal, llenando una cavidad estructural interna con uno o más aminoácidos que tengan grupos laterales más voluminosos (por ejemplo en regiones que sean estructuralmente móviles), sustituyendo restos de histidina con otros aminoácidos, eliminando un sitio de desaminación, o mediante cierre de la hélice. La estabilidad de la proteína se puede mejorar mediante sustitución de al menos un aminoácido con resto cisteína o inserción de uno o más restos cisteína lo que crea al menos un puente de disulfuro.

Las variantes de polipéptido de endoglucanasa de la invención son preferiblemente proteínas de fusión que se producen de manera recombinante. Estas se preparan de manera conveniente utilizando la tecnología de ADN recombinante generalmente conocida. En resumen, el polinucleótido que codifica la endoglucanasa se clona e inserta en un vector de expresión, se transforma en una célula hospedante y se expresa. Los métodos para la

producción de proteína mediante tecnología recombinante en diferentes sistemas hospedantes son conocidos en la técnica (Sambrook y Russel, 2001; Coen, 2001; Gellissen, 2005). Preferiblemente, las variantes de polipéptido se producen como proteínas extracelulares que son secretadas en el medio de cultivo, del que se pueden recuperar y aislar fácilmente.

Las variantes de polipéptido de endoglucanasa pueden comprender además del dominio de núcleo catalítico, el cual forma el sitio activo o funcional de la enzima, uno o más "dominios de unión a celulosa" ("CBDs"), también llamados dominios/módulos de unión a carbohidrato (CBD/CBM) localizados ya sea en el extremo N-terminal o C-terminal del dominio catalítico. Los CBM tienen actividad de unión a carbohidrato y éstos median la unión de celulosa a celulosa cristalina pero tienen poco o ningún efecto sobre la actividad hidrolítica de la enzima en sustratos solubles. Las variantes de endoglucanasa de la invención pueden también contener opcionalmente una secuencia de señal y un enlazador que conecta el CBM y el dominio catalítico a través de una región flexible y altamente glucosilada. La estructura modular de las celulasas que contienen módulo de unión a carbohidrato y/o la región enlazadora es bien conocida en la técnica. El módulo de unión a carbohidrato y la región enlazadora pueden ser heterólogas u homólogas. "Heterólogo" tal como se utiliza en el presente contexto significa que el CBM y/o la posible parte enlazadora del polipéptido de endoglucanasa variante se obtiene a partir de un organismo diferente que el del dominio de núcleo celololíticamente activo. "Homólogo" tal como se utiliza en el presente documento significa que el CBM y/o la posible parte enlazadora de la variante provienen del mismo organismo que el núcleo celololíticamente activo. La invención divulga que cualquier enlazador o CBM se puede utilizar en el polipéptido de endoglucanasa variante. El rendimiento de las variantes de polipéptido de endoglucanasa de la invención está mejorado en comparación con la enzima progenitora independientemente del origen del enlazador o la región de CBM (Ejemplos 3 y 6).

"Fragmento enzimáticamente activo" se refiere a la parte de una secuencia de aminoácidos específica que es lo suficientemente larga para que tenga la actividad enzimática deseada. En otras palabras un fragmento puede ser por ejemplo sólo la parte madura del polipéptido o incluso una subsecuencia de la parte madura. Este podría contener o no un enlazador y dominio CBM. La actividad enzimática se refiere en el presente documento a la actividad celololítica que significa la capacidad catalítica del polipéptido para hidrolizar celulosa o derivados de la misma. La actividad enzimática se puede determinar como se describe en el Ejemplo 1.

La presente invención se refiere también a nuevos polinucleótidos que comprenden secuencias de nucleótido que tienen SEQ ID NO: 4 a 8 (Tabla 1), o fragmentos de las mismas lo suficientemente largas para codificar variantes de endoglucanasa enzimáticamente activas, o una secuencia que codifica una variante nueva de polipéptido como se definió anteriormente, incluyendo cadenas complementarias de las mismas. Los polinucleótidos de la invención son moléculas recombinantes que contienen secuencias que no ocurren de manera natural diseñadas genéticamente. "Polinucleótido" tal como se utiliza en el presente documento se refiere tanto a ARN como a ADN, y éste puede ser de cadena individual o de cadena doble. Este puede ser también ADN complementario (ADNc). Con ADNc se quiere decir una molécula de ADN sintetizada a partir de una plantilla de ARN mensajero obtenido a partir de un organismo eucariota o procariota. Además, el polinucleótido se puede degenerar como resultado del código genético a cualquiera de las secuencias como se definieron anteriormente. Esto significa que codones diferentes pueden codificar el mismo aminoácido.

La presente invención se refiere a un "vector" de expresión recombinante que comprende un polinucleótido que codifica las variantes de polipéptido de endoglucanasa como se caracterizaron anteriormente, ligado de manera operable a secuencias reguladoras, que son capaces de dirigir la expresión de un gen que codifica dichas variantes de polipéptido de endoglucanasa en un hospedante apropiado. Dichas secuencias reguladoras se pueden originar a partir del organismo hospedante o de otro organismo. El vector de expresión también puede comprender genes marcadores para selección de las cepas transformantes o el marcador para selección se puede introducir al hospedante en otra construcción de vector mediante co-transformación.

Incluso la presente invención se refiere a un "hospedante" de producción, que puede ser cualquier organismo capaz de expresar el polipéptido deseado. Preferiblemente el hospedante es una célula microbiana, más preferiblemente un hongo. Lo más preferiblemente el hospedante es un hongo filamentoso tal como *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Humicola*, *Chrysosporium*, *Neurospora*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Myceliophthora*, *Sporotrichum*, y *Mortierella*. Las variantes de polipéptido de endoglucanasa se pueden producir en un hospedante heterólogo u homólogo. El hospedante puede o puede no estar genéticamente modificado. Los hospedantes preferidos para producir los polipéptidos de la invención son en particular cepas provenientes del género *Trichoderma*. Preferiblemente el hospedante recombinante se modifica para que exprese y secrete las variantes de polipéptido de endoglucanasa de la invención como su principal actividad o una de sus actividades principales. Esto se puede hacer eliminando genes que codifican enzimas secretadas endógenas principales, por ejemplo las cuatro celulasas principales de *Trichoderma* e integrando genes heterólogos en un locus con niveles altos de expresión y producción.

La presente invención se refiere también a un método para producir polipéptidos de endoglucanasa variantes de la invención, comprendiendo dicho método las etapas de transformar una célula hospedante con un vector de expresión que codifica dicho polipéptido, y cultivar dicha célula hospedante bajo condiciones que permitan la producción de dicho polipéptido, y opcionalmente recuperar y purificar dicho polipéptido. El medio de producción puede ser un medio apropiado para cultivar el organismo hospedante y para contener inductores para la expresión eficiente del gen.

La presente invención se refiere a una preparación de enzima que comprende los polipéptidos de endoglucanasa variantes de la invención. Tal como se utiliza en el presente contexto la "preparación de enzima" se refiere a cualquier producto o composición de enzima, que comprende al menos uno de los polipéptidos de endoglucanasa variantes nuevos descritos en el presente documento. Dicha preparación de enzima puede ser un medio de cultivo agotado o filtrado que contenga uno o más polipéptidos de endoglucanasas variantes, o uno o más polipéptidos de endoglucanasa variantes y una o más de otras enzimas. Medio de cultivo agotado significa el medio de cultivo del hospedante que comprende las enzimas producidas. Preferiblemente las células hospedantes se separan de dicho medio después de la producción. La preparación o composición de enzima puede ser un "caldo de cultivo entero" obtenido, opcionalmente después de inactivar el o los hospedantes o microorganismos de producción sin ninguna separación de biomasa, procesamiento corriente abajo o purificación de la enzima o enzimas celulolíticas deseadas, debido a que los polipéptidos de endoglucanasas variantes pueden ser secretados en el medio de cultivo, y estos muestran actividad en las condiciones ambientales del medio de cultivo agotado.

La preparación de enzima puede contener las enzimas en forma al menos parcialmente purificada y aislada. Esta puede incluso consistir esencialmente en la enzima o enzimas deseadas. Si se desea, las preparaciones de enzima pueden estar secadas, secadas por pulverización o liofilizadas, granuladas o la actividad enzimática se puede concentrar y/o estabilizar de alguna otra manera para almacenamiento. Si se requiere, una enzima deseada se puede cristalizar o aislar o purificar según métodos convencionales, tales como filtración, extracción, precipitación, cromatografía, cromatografía de afinidad, electroforesis, o similares.

Además de uno o más polipéptidos de endoglucanasa variantes, la preparación de enzima puede comprender una o más de otras enzimas, que pueden ser por ejemplo otras celulasas, amilasas, lipasas, proteasas, hemicelulasas, ligninasas, enzimas pectinolíticas y/o enzimas oxidativas. De manera más específica, la preparación de enzima puede comprender al menos una enzima adicional que se selecciona a partir de un grupo de celobiohidrolasa, endoglucanasa, beta-glucanasa, beta-glucosidasa, serina proteasa, xilanasas, beta-xilosidasa, mananasa, beta-manosidasa, endopectinilasa, pectato liasa, pectinesterasa, lacasa, cutinasa, peroxidasa y polisacárido monooxigenasa lítica dependiente de cobre es decir las enzimas de la familia 61 de glucosil hidrolasa. La preparación de enzima puede contener cualquier combinación de estas enzimas y los polipéptidos de endoglucanasa variantes de la invención, pero las enzimas no están limitadas a aquellas descritas en el presente documento. Estas por ejemplo, también pueden ser preparaciones de enzima comercialmente disponibles. Depende de la aplicación qué otras enzimas estén incluidas en la preparación de enzima o utilizadas en el tratamiento de enzima.

Además de los polipéptidos de endoglucanasas variantes, la preparación de enzima de la invención puede comprender uno o más aditivos apropiados seleccionados del grupo que consiste en agentes tensoactivos o agentes activos en superficie, amortiguadores, agentes anti-corrosión, estabilizadores, agentes blanqueadores, mediadores, mejoradores de detergencia, cáusticos, abrasivos y conservantes, abrillantadores ópticos, agentes anti-redeposición, tintes, pigmentos, perfumes etc.

Las preparaciones de enzima se pueden proporcionar como un líquido o como un sólido, por ejemplo, como un polvo seco o granular, en especial gránulos sin polvo, un líquido estabilizado, pastilla, cristal suspensión de cristal. Se contempla que las preparaciones de enzima se puedan enriquecer adicionalmente para satisfacer los requerimientos de una utilidad específica en diversas aplicaciones por ejemplo en la industria textil. Una mezcla de enzimas secretadas por un hospedante puede ser conveniente en una aplicación industrial particular, por ejemplo en bioacabado y biodesgaste.

La presente invención se refiere también a una composición detergente que comprende al menos uno de los polipéptidos de endoglucanasas variantes nuevos o una preparación de enzima de los mismos, un agente tensoactivo y opcionalmente uno o más aditivos seleccionados del grupo que consiste en estabilizantes, amortiguadores, agentes activos en superficie, mejoradores de detergencia, co-mejoradores de detergencia, agentes blanqueadores, activadores de blanqueo, otras enzimas detergentes, mediadores de enzimas (por ejemplo para oxidasas, peroxidasas, lacasas), agentes anti-corrosión, agentes antiredeposición y polímeros para liberación de suciedad, cáusticos, abrasivos, abrillantadores ópticos, tintes, pigmentos, perfumes y conservantes. Tal como se utiliza en el presente contexto, la expresión "detergente" significa una sustancia o material pretendido para ayudar en la limpieza o que tenga propiedades limpiadoras. Una lista apropiada de los contenidos de detergentes se da en la patente de EE.UU. No. 5,443,750 o en el documento WO2013/131964 y una lista adecuada de agentes tensoactivos se da en la patente de EE.UU. No. 3,664,961.

Los agentes tensoactivos son útiles para emulsificar grasa y humectar superficies. El agente tensoactivo puede ser un no iónico incluyendo semipolar y/o aniónico y/o catiónico y/o zwitteriónico. Se pueden añadir amortiguadores a la preparación o composición de enzima para modificar el pH o ejercer efecto sobre el rendimiento o estabilidad de otros ingredientes. Los estabilizadores apropiados incluyen polioles tales como propilenglicol o glicerol, un azúcar o alcohol de azúcar, ácido láctico, ácido bórico, o derivados de ácido bórico, péptidos, etc. El agente blanqueador se utiliza para oxidar y degradar compuestos orgánicos. Los ejemplos de sistemas de blanqueo químico apropiados son fuentes de H₂O₂, tales como perborato o o percarbonato con o sin activadores de blanqueo formadores de perácido tales como tetraacetiletilendiamina, o de manera alternativa peroxiácidos, por ejemplo de tipo amida, imida o sulfona. Los oxidantes químicos pueden ser reemplazados parcial o completamente utilizando enzimas oxidantes, tales como lacasas o peroxidasas. Muchas lacasas no funcionan de manera efectiva en ausencia de mediadores. Los

mejoradores de detergencia o agentes formadores de complejos incluyen sustancias, tales como zeolita, difosfato, trifosfato, carbonato, citrato, etc. La composición detergente también puede comprender uno o más polímeros tales como carboximetilcelulosa, poli(etilenglicol), poli(alcohol vinílico), poli(vinilpirrolidona), etc. Además, se pueden añadir ablandadores, cáusticos, conservantes para prevenir el deterioro de otros ingredientes, abrasivos y sustancias que modifiquen las propiedades de formación de espuma y viscosidad.

La composición detergente de la invención puede comprender uno o más componentes adicionales seleccionados del grupo que consiste en agentes tensoactivos aniónicos (0 - 40% en peso), agentes tensoactivos no iónicos (0 - 40% en peso), y fosfonatos (0 - 15% en peso) además de la cantidad efectiva del polipéptido de endoglucanasa variante o una preparación de enzima del mismo.

El término "cantidad efectiva" de una variante de polipéptido de endoglucanasa se refiere a la cantidad de la enzima necesaria para que realice su función de manera suficiente en la aplicación detergente específica. La cantidad de preparación de enzima en una composición detergente puede variar dependiendo del tipo y concentración del detergente. Preferiblemente la composición detergente comprende desde aproximadamente 0,00001% hasta aproximadamente 10% en peso de la composición detergente de variante de polipéptido de endoglucanasa de la invención, más preferiblemente de 0,0001% a aproximadamente 1%, aún más preferiblemente de 0,0001% a 0,5%, incluso más preferiblemente de 0,0005% a 0,1%. Un experto en la técnica es capaz de definir dosificaciones adecuadas.

Una variante de polipéptido de endoglucanasa o una preparación de enzima de la misma se puede añadir directamente en un detergente o se puede aplicar por separado encima del detergente durante o antes del lavado, o, por ejemplo, en bolsitas líquido/líquido o líquido/polvo o bolsitas o botellas multicompartimento, en las que puede estar separado de algunos de los componentes detergentes o de otras enzimas, como la proteasa, para maximizar la estabilidad en almacenamiento. Una variante de polipéptido de endoglucanasa o una preparación de enzima de la misma también se puede utilizar en agentes de limpieza o reforzadores que se añaden encima del detergente durante o antes del lavado y que están por ejemplo en forma de líquido, gel, polvo, gránulos o pastillas. La preparación de enzima y los componentes del detergente también pueden ser empapados en un portador tal como materiales textiles.

Los polipéptidos de endoglucanasa variantes y las preparaciones de enzima de los mismos se pueden utilizar para tratar cualquier material celulósico. En el presente contexto, "material celulósico" se refiere a cualquier material que comprende celulosa o derivados de la misma como un componente significativo. Dicho material puede ser material textil, plantas o material de origen vegetal utilizado en alimentos o alimentos para animales, material vegetal para extracción de aceite, o pulpa mecánica o química o fibra secundaria derivadas de la madera.

Los polipéptidos de endoglucanasa variantes son especialmente útiles en el tratamiento de materiales textiles. El material textil que se va a tratar puede ser cualquier material textil incluyendo hilos, productos intermedios de hilo, fibras, materiales no tejidos, materiales naturales, materiales sintéticos, y cualquier otro material textil, telas elaboradas de dichos materiales y productos elaborados a partir de las telas (por ejemplo, ropa y otros artículos). El material textil o tela puede estar en forma de tejidos de punto, tejidos, denim, no tejidos, fieltros, hilados, y toallas. El material textil puede estar basado en celulosa tal como los celulósicos naturales, incluyendo algodón, planta de lino/lino, yute, ramio, sisal o fibra de coco o celulósicos artificiales (por ejemplo que se originan de pulpa de madera) incluyendo viscosa/rayón, modal, fibras de acetato de celulosa (trichel), liocel, cupro o mezclas de los mismos. La tela puede ser prendas de colada lavables convencionales, por ejemplo, prendas domésticas manchadas. Cuando se utiliza el término tela o ropa se pretende incluir también el término más amplio materiales textiles. Con "denim" se quiere decir, en conexión con esta invención, tela de denim, usualmente ropa de denim, particularmente pantalones vaqueros. Ventajosamente, el denim es denim teñido de índigo. El denim también se puede tratar con derivados de índigo o con índigo junto con algún otro tinte, por ejemplo, denim teñido con índigo con parte inferior de azufre.

El material celulósico se hace reaccionar con los polipéptidos de endoglucanasa variantes de la invención o la preparación de enzima que comprende dichos polipéptidos de endoglucanasa variantes bajo condiciones apropiadas, tales como pH y temperatura apropiados, y la reacción se deja continuar durante un tiempo suficiente para que la reacción enzimática se lleve a cabo, con lo que se obtiene material celulósico al menos parcialmente hidrolizado. Las enzimas se añaden en una cantidad enzimáticamente efectiva ya sea simultáneamente por ejemplo en forma de una mezcla de enzimas, o secuencialmente.

Los polipéptidos de endoglucanasa variantes también se pueden añadir a las composiciones detergentes para mejorar las propiedades de cuidado de la fibra y color mediante prevención y eliminación de la pelusa y bolitas lo que da como resultado el abrillantamiento o restauración de colores y el ablandamiento, y para mejorar la limpieza de materiales textiles, por ejemplo eliminando la suciedad del pigmento y la antiredeposición y antiagrisado. Los términos eliminación de bolitas y reavivado del color se utilizan típicamente para describir los efectos de la celulasa en materiales textiles de algodón, usados, viejos. Los términos antifonnación de bolitas (prevención de formación de bolitas), mantenimiento del color o cuidado del color típicamente se utilizan para describir los efectos de la celulasa sobre ropa nueva.

Tal como se utiliza en el presente contexto la expresión "rendimiento de celulasa" en aplicación detergente se refiere

al efecto de la celulasa en las propiedades de cuidado de la fibra y del color del detergente, que se pueden medir como un descenso visible y medible de la luminosidad (es decir incremento del oscurecimiento) o cambio del color de los materiales textiles de algodón coloreados. Cuando las fibras y fibrillas de la superficie que sobresalen del hilo forman bolitas y le dan a la tela un aspecto grisáceo son eliminadas por la celulasa, la luminosidad de la tela disminuye, y la superficie de la tela parece más oscura y los colores se hacen más brillantes. La luminosidad o cambio en los valores del color se puede medir, por ejemplo midiendo el color como valores de reflectancia con un espectrofotómetro utilizando las coordenadas espacio color $L^*a^*b^*$ como se describe en los Ejemplos 4 y 6. El rendimiento de la celulasa se calcula por ejemplo como ΔL^* (delta L^*), que significa el valor de luminosidad L^* de la tela tratada con enzima menos el valor de luminosidad L^* de tela tratada con licor de lavado sin enzima (blanco enzimático, control). Cuando el material de ensayo consiste en materiales textiles con diferentes colores (por ejemplo monitores para formación de bolitas comercialmente disponibles que contienen 4 tiras), el rendimiento de celulosa total se calcula como una suma de ΔL^* de cada color después de varios ciclos de lavado y los resultados finales se muestran como incremento del oscurecimiento (suma de $-\Delta L^*$).

Los polipéptidos de endoglucanasa variantes y las preparaciones de enzima que los contienen son especialmente útiles en procesos de acabado de la industria textil, tal como el bioacabado de telas, ropa o hilo. Tal como se utiliza en el presente contexto, la expresión "bioacabado" (también llamado eliminación de bolitas, eliminación de pelusa, eliminación de pelo o biopulido) se refiere al uso de enzimas variantes en una hidrólisis controlada de las fibras celulósicas para modificar la superficie de la tela o hilo de una manera que evite permanentemente la tendencia a la formación de bolitas, mejore el manejo de la tela como suavidad y uniformidad, limpie la estructura de la superficie reduciendo las pelusas. El bioacabado da como resultado la clarificación de los colores, mejora la caída de la tela, y mejora la capacidad de absorción de humedad, lo cual también puede mejorar la capacidad de teñido. El bioacabado se puede realizar antes, después o al mismo tiempo que el teñido.

La eliminación enzimática de las bolitas se puede llevar a cabo en cualquier etapa durante el procesamiento en húmedo del material textil, preferiblemente después del desengomado y/o blanqueado opcional, y se pueden utilizar condiciones similares a las de biodesgaste. Además se pueden tratar materiales textiles en forma de ropa.

Los polipéptidos de endoglucanasa variantes y las preparaciones de enzima que los contienen se pueden utilizar en el biodesgaste del denim. Tal como se utiliza en el presente contexto, la expresión "biodesgaste" de tela o ropa significa el uso de enzimas en lugar de, o además de, piedra pómez para el tratamiento de la tela o ropa, en especial denim para obtener una apariencia envejecida o gastada. El término "apariencia envejecida o gastada" significa que como resultado de la eliminación no uniforme del tinte, hay contrastes entre las áreas teñidas y las áreas en las que se ha eliminado el tinte.

La relación de licor (la relación del volumen de líquido por peso de tela) tanto en biodesgaste como en bioacabado puede variar de aproximadamente 3:1 a 20:1, preferiblemente 5:1 a 10:1. El tiempo de tratamiento puede variar de 15 minutos a 90 minutos y preferiblemente de 30 minutos a 60 minutos. Se debería enfatizar que la dosificación de enzima depende en gran medida del tipo de las telas, maquinaria, condiciones de proceso (pH, temperatura, relación de licor, tiempo de tratamiento, carga de denim, escala del proceso) y del tipo de la preparación o composición de enzima. Los parámetros de proceso típicos para, por ejemplo, bioacabado industrial son pH 4,5 - 8 a temperatura de 40 - 65°C. Los polipéptidos de endoglucanasa variantes de la invención muestran rendimiento a un amplio intervalo de condiciones de pH y temperatura. Un experto en la técnica es capaz de definir dosificaciones y condiciones apropiadas.

Los polipéptidos de endoglucanasa variantes de la invención y las preparaciones de enzima o composiciones detergentes que las contienen proporcionan ventajas inesperadas cuando se utilizan en las industrias detergentes y de materiales textiles. Las variantes nuevas son considerablemente más eficientes que las celulasas de la técnica anterior. En aplicaciones detergentes, los polipéptidos de endoglucanasa variantes nuevos tienen rendimiento considerablemente mejor de reavivamiento de color (eliminación de bolitas) y cuidado del color (anti-formación de bolitas) a intervalo de dosificación más bajo. En el bioacabado, el alto rendimiento se logra utilizando los polipéptidos de endoglucanasa variantes de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1

Producción de variantes de celulasa ACM0 de *Acremonium thermophilum* en *Trichoderma reesei*

Se utilizan métodos de biología molecular estándar en el aislamiento y tratamiento enzimático de ADN (plásmidos, fragmentos de ADN), en transformaciones de *E. coli*, etc. Los métodos básicos utilizados se describen en manuales de biología molecular, por ejemplo Sambrook J. y Russell, D.W., 2001.

Las variantes de celulasa se derivaron de una molécula progenitora, designada en el presente documento como ce/45A-ACM0 (secuencia de ácido nucleico SEQ ID NO: 3, que corresponde a la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 12), que contiene el núcleo catalítico de Cel45A de *A. thermophilum* unido al enlazador y la región CBM de Cel7A de *T. reesei*. Se construyeron plásmidos de expresión para la producción de variantes de ACM0 recombinantes. Las construcciones contienen el promotor y terminador de *ce/7A* de *T. reesei* y el gen marcador *amdS* como se describe en Paloheimo *et al*, 2003. Los genes sintéticos (tabla 1), que incluyen mutaciones

introducidas en la región de núcleo de la molécula progenitora, se fusionan de manera exacta como fragmentos *SacII-BamHI* al promotor de *cel7A* de *T. reesei* mediante ligación. Para la construcción del plásmido de expresión para la variante de ACM88 se aisló un fragmento de *SgrAI* de 222 pb de pALK3923 y se ligó dentro de un fragmento de *SgrAI* de 8859 pb de pALK3928. Los plásmidos de expresión se listan en la tabla 1.

5 Tabla 1 Genes sintéticos utilizados en la construcción de los casetes de expresión para la producción de variantes de celulasa ACM0 en *T. reesei*

Designación de gen	Mutación	Plásmido de expresión	SEQ ID NO:
<i>cel45A</i> -ACM30	S109N, S116Q, Q118H	pALK3675	4
<i>cel45A</i> -ACM44	S51N, S82Q, A135Q, S150Q, S205N	pALK3779	5
<i>cel45A</i> -ACM72	S51N, S82Q, S109N, S116E, Q118H, A135Q, S150Q, S205N	pALK3928	6
<i>cel45A</i> -ACM86	S51N, A75S, A77S, S82Q, S109N, Q118H, A135Q, S150Q, S205N	pALK3942	7
<i>cel45A</i> -ACM88	S51N, S82Q, S116E, Q118H, A135Q, S150Q, S205N	pALK3967	8

El casete de expresión lineal (figura 1) se aisló a partir de la estructura base del vector mediante digestión con *EcoRI*, se transformó e A152 de *T. reesei*, y los transformantes se seleccionaron con acetamida como única fuente de nitrógeno. La cepa hospedante carece de cuatro celulasas endógenas principales: CBHI/Cel7A, CBHII/Cel6A, EGI/Cel7B y EGII/Cel5A. Las transformaciones se efectuaron 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 individual antes de su esporulación en agar de patata y dextrosa.

La producción de endoglucanasa de los transformantes se analizó a partir de los sobrenadantes del cultivo de cultivos en matraz de agitación (50 ml). Los transformantes se cultivaron durante 7 días en un medio inductor de celulasa complejo (Joutsjoki et al, 1993) amortiguado con KH_2PO_4 al 5% 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 a partir de carboximetilcelulosa (CMC al 3%) a 50°C en solución amortiguadora de citrato 50 mM pH 4,8 esencialmente como se describe en 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 mediante electroforesis en gel de dodecilsulfato de sodio-poliacrilamida (SDS-PAGE).

Los transformantes elegidos (tabla 2) y la cepa de referencia que producen celulasa ACM0 se cultivaron en biorreactores a escala laboratorio en medio inductor de celulasa complejo para obtener material para los ensayos de aplicación (ejemplos 4 a 6).

25 Tabla 2. Transformantes elegidos para cultivo en biorreactores a escala de laboratorio

Variante de celulasa	Transformante
ACM30	RF10612
ACM44	RF10834
ACM72	RF11193
ACM86	RF11081
ACM88	RF11217

Ejemplo 2

Producción de variantes de celulasa Cel45A de *A. thermophilum* en *T. reesei*

Se utilizan métodos de biología molecular estándar como se describió en el ejemplo 1. Se construyen dos variantes de celulasa, obtenidas a partir de una molécula progenitora SEQ ID NO: 9 (que corresponde a la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 13). Los plásmidos de expresión (tabla 3) se construyeron clonando genes sintéticos y las proteínas recombinantes se produjeron como se describió en el ejemplo 1.

Tabla 3 Los genes sintéticos utilizados en la construcción de los casetes de expresión para la producción de variantes de celulasa At_Cel45A en *T. reesei*

Designación de gen	Mutación	Plásmido de expresión	SEQ ID NO:
ce45A-ACM90	S51N, S82Q, S109N, S116E, Q118H, A135Q, S150Q, S205N	pALK3972	10
ce45A-ACM91	S51N, S82Q, S116E, Q118H, A135Q, S150Q, S205N	pALK3973	11

- 5 La producción de endoglucanasa de los transformantes se analizó a partir de los sobrenadantes del cultivo de cultivos en matraz de agitación (50 ml) como se describió en el ejemplo 1. Los transformantes elegidos (tabla 4) y la cepa de referencia correspondiente que producen celulasa At_Cel45A se cultivaron en biorreactores a escala laboratorio en medio inductor de celulasa complejo para obtener material para los ensayos de aplicación (ejemplos 4 a 6).

Tabla 4 Transformantes cultivados en biorreactores a escala laboratorio

Variante de celulasa	Transformante
ACM90	RF11351
ACM91	RF11352

10 Ejemplo 3 Purificación de endoglucanasas variantes

- 15 Las células y sólidos se retiraron del medio de cultivo de fermentación mediante centrifugación durante 10 min, 4000 g a 4°C. Se utilizaron 15 ml de sobrenadante para la purificación de proteínas. Después de la centrifugación, se añadió sulfato de amonio sólido a la muestra para obtener una concentración de sal final de 1 M. La muestra después se filtró a través de un filtro de 0,44 µm antes de aplicar a la columna de fenil Sefarosa HiPrep 16/10 FF (GE Healthcare) equilibrada con 20 mM de MES, sulfato de amonio 1 M pH 6. Las proteínas se eluyeron con un gradiente de sulfato de amonio decreciente lineal (de 1 a 0 M). Se recolectaron fracciones de 10 ml y se analizaron en SDS-PAGE. Las fracciones que contenían actividad de endoglucanasa se combinaron y se concentraron a 2 ml utilizando dispositivos de ultrafiltración Vivaspin 20, 10 kDa MWCO (GE Healthcare). La muestra concentrada se fracciona adicionalmente utilizando columna para filtración en gel Superdex 75 26/60 equilibrada con MES 20 mM, NaCl 200 mM pH 6. Se recolectaron fracciones de 2 ml y se analizaron mediante SDS-PAGE. Las fracciones que contenían endoglucanasa pura se combinaron. El contenido de enzima de la muestra purificada se determinó utilizando mediciones de absorbancia de UV a 280 nm. Los coeficientes de excitación para las endoglucanasas purificadas se calculan en base a la secuencia de aminoácidos de la enzima usando el servidor ExPASy <http://web.expasy.org/protparam/>.

- 25 La actividad enzimática de las muestras purificadas se midió como la liberación de azúcares reductores a partir de carboximetilcelulosa (CMC al 3%) a 50°C en solución amortiguadora de Hepes 50 mM pH 7,0 en 10 min (actividad de NCU), Bailey y Nevalainen, 1981; Haakana *et al.*, 2004). La actividad específica (NCU/mg) de las variantes enzimáticas se calculó dividiendo la actividad de NCU entre la cantidad de enzima purificada. Los valores obtenidos se utilizan para calcular las dosificaciones de enzima utilizadas en los ejemplos 4 a 6.

30 Ejemplo 4 Ensayos en aparato Launder-Ometer de variantes de celulasa ACM0 de *A. thermophilum* con aplicación de detergente líquido

- 35 Se analizaron las variantes de celulasa ACM0 de *A. thermophilum* (ACM30, ACM44, ACM72, ACM86 y ACM88) producidas en *Trichoderma*, como se describió en el ejemplo 1, donde se ensayaron respecto a su rendimiento con detergente líquido comercial para ropa de color a 40°C y se compara con celulasa ACM0 y una preparación de celulasa comercial Carezyme® (celulasa de *Aspergillus sp.*, Sigma-Aldrich C-2605-50 ml). Se utilizaron los siguientes monitores para formación de bolita (Jersey impreso multicolor, 94% de algodón, 6% de Dorlastan) suministrados del Centro para Materiales de Ensayo BV (Países Bajos): E-252 (tela original, sin bolitas) y E-253 (material con formación previa de bolitas/pre-dañado). Los monitores E-253 se utilizaron para la demostración de la eliminación de bolitas a partir de material que representa material textil de algodón usado. También se utilizaron los mismos monitores pre-dañados para la demostración del efecto de reavivado del color de materiales textiles de color usados. Se utilizaron monitores de tela original (E-252) para la demostración del mantenimiento del color/cuidado del color y/o prevención del efecto de bolitas (anti-formación de bolitas) de telas nuevas. Ambas telas de ensayo se cortaron en muestras de tela (aproximadamente 29 cm x 15 – 16,5 cm, el peso total de dos muestras de tela es aproximadamente 24 g) que contenían rayas de anchura completa de cada color (negro, rojo, verde, azul) y los bordes se igualaron.

Los tratamientos con celulasa se efectuaron en un Launder-Ometer Atlas LP-2 de la siguiente manera. El Launder-Ometer primero se precalentó a 40°C. Se añadieron 60 g de bolas de acero (0,6 cm de diámetro), 240 ml de licor de lavado y enzima diluida (<1,0 ml) en contenedores de 1,2 litros. Después de esto, se colocó una muestra de tela de E-253 y E-252 en contenedores (lado reverso sobre lado reverso) y se efectúa el ensayo Launder-Ometer a 40°C

durante 60 min con una velocidad de rotación de 42 rpm.

Las enzimas se dosificaron como mg de proteína enzimática activa (AEP). Se calculó el contenido de AEP de cada preparación tomando como base las actividades específicas definidas como se describió en el ejemplo 3. La dosificación de las preparaciones de enzima fue 0,2 ó 0,1 mg de proteína enzimática activa por litro de licor de lavado y la muestra de control no contenía enzima. El licor de lavado contenía 5 g de detergente líquido comercial para ropa de color por litro de agua del grifo sintética (16°dH) y su pH era de aproximadamente 8,5.

Para el agua de grifo sintética con dureza de 16°dH se prepararon las siguientes diluciones de reserva en agua desionizada (Milli-Q o equivalente):

Disolución de reserva con dureza de calcio de 1000°d: $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ (1.02382.1000, Merck KGaA, Alemania) 26,22 g/litro

Disolución de reserva con dureza de magnesio de 200°d: $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ (1.05886.1000, Merck KGaA, Alemania) 8,79 g/litro de H_2O

Disolución de reserva de NaHCO_3 : NaHCO_3 (1.06329.1000 Merck KGaA, Alemania) 29,6 g/l.

Se añadieron 13,3 ml de disolución de CaCl_2 , 13,3 ml de disolución de MgSO_4 y 10,0 ml de disolución de NaHCO_3 recién preparada en un matraz volumétrico en el orden dado, se afora hasta 1 litro con agua desionizada y se mezcló. La dureza del agua se determinó mediante titulación complejométrica y se encontró que era correcta.

Después del tratamiento con celulasa en el Launder-Ometer, las muestras de tela primero se enjuagaron por separado con agua corriente (aprox. 20°C) y después en una lavadora (Whirlpool) utilizando el programa de lavado con extracción. Las muestras de tela se secaron en una secadora. Los ciclos de lavado y secado se repitieron 10 veces.

El rendimiento de la celulasa en aplicación detergente se evaluó midiendo el color como valores de reflectancia con un espectrofotómetro Konica Minolta CM-3610A utilizando coordenadas de espacio de color $L^*a^*b^*$ (iluminante D65/10°, 420 nm de corte). Se midió el color de cada una de las 4 rayas de los monitores de ensayo después de 10 ciclos de lavado. Se utilizó la disminución de la luminosidad (L^*), es decir el incremento del oscurecimiento en comparación con el tratamiento sin celulasa, como una indicación del efecto de la celulasa. Cuando las fibras y fibrillas de la superficie que sobresalen del hilo formando bolitas y que dan a la tela una apariencia grisácea se eliminaron con la celulasa, la luminosidad de la tela disminuye, y la superficie de la tela parece más oscura y los colores se vuelven más brillantes.

El rendimiento de la celulasa se calcula como ΔL^* (delta L^*), que significa el valor de luminosidad L^* de la tela tratada con enzima menos el valor de luminosidad L^* de la tela tratada con disolución de lavado sin enzima (control, sin enzima). Se calculó la suma de ΔL^* para cada una de las cuatro rayas y los resultados finales se mostraron como el incremento de oscurecimiento ($-\Delta L^*$).

Los resultados de los ensayos del incremento del oscurecimiento utilizando una dosificación de 0,2 mg de proteína enzimática activa por litro de licor de lavado se muestran en las figuras 2A (monitores con formación previa de bolitas E-253) y 2B (monitores sin bolitas E-252). El efecto de eliminación de bolitas/reavivado del color (figura 2A) de las variantes ACM30, ACM44, ACM72, ACM86, y especialmente ACM88 se mejora considerablemente en comparación con ACM0. Además, el efecto anti-formación de bolitas/cuidado del color de las variantes ACM30, ACM44, ACM72, ACM86, y especialmente ACM88 era mejor en comparación con ACM0. Las variantes ACM30, ACM44, ACM72, ACM86, y especialmente ACM88 también tenían mejor rendimiento en aplicación detergente que la referencia comercial Carezyme®. Además, según los ensayos efectuados con dosificaciones más pequeñas (0,1 mg de proteína enzimática activa por litro de disolución de lavado), como se muestra en la figura 3A, ACM72 y ACM88 tenían un rendimiento considerablemente mejor en aplicación detergente tanto con el monitor de ensayo con formación previa de bolitas (figura 3A) como con el monitor de ensayo sin bolitas (figura 3B) en comparación con ACM0 y la referencia comercial.

Los resultados espectrofotométricos también se confirmaron mediante evaluación visual. La tela con formación previa de bolitas/pre-dañada, que parecía desgastada y poco interesante, recuperó su apariencia original considerablemente mejor con ACM72 y especialmente con ACM88 en comparación con ACM0 y la referencia comercial en ambos ensayos. Además el mantenimiento de los colores de la tela nueva era visualmente claramente mejor con ACM72 y especialmente con ACM88 que con las referencias.

Ejemplo 5 Análisis del rendimiento de variantes de ACM0 de *A. thermophilum* en aplicación de bioacabado

Se analizó el rendimiento de la variante ACM0 de *A. thermophilum* ACM88 y la celulasa ACM0, producida en *Trichoderma*, como se describió en el ejemplo 1, en el bioacabado (eliminación de bolitas/eliminación de pelusa) de prendas de punto de algodón. Los tratamientos con celulasa se efectuaron con el lavador-extractor Wascator FOM 71 CLS de Electrolux utilizando 1 kg de tela y 15 litros de agua de grifo. Se utilizaron prendas de punto de colegio de tres hilos rugosas hechas de 100% de algodón (tipo 9761, Orneule, Finlandia) como material de ensayo con material de relleno. La tela primero se lavó previamente durante 10 min a 50°C y se enjuagó 3 veces. Después de esto, la

tela tejida de algodón se trató con celulasa a 50°C durante 60 minutos. Las enzimas se dosificaron como 0,025 ó 0,05 mg de proteína enzimática activa (AEP) por el peso (g) de la tela, como se describió en el ejemplo 4. El pH del líquido de lavado se ajustó a 6 con ácido acético o los ensayos se efectuaron sin ajuste de pH, cuando el pH del líquido de lavado era aproximadamente 7,6 al inicio y 8 al final del tratamiento con celulasa. Después de drenar, la enzima se inactivó (durante 10 min a 50°C) elevando el pH por encima de 11 con hidróxido de sodio. La tela después se enjuagó tres veces y se secó en una secadora.

Las muestras de tela se evaluaron visualmente según cuantas fibrillas y pelusas de superficie se detectaron. El resultado de cada evaluación se cuantificó indicando el resultado con relación a una escala que consiste en patrones. Dichos patrones son piezas de la misma tela lavadas con diferentes cantidades de celulasa y éstas tienen un intervalo de intensidad de fibrillas/pelusa de superficie del número 1 al 5 con intervalos de media unidad. El número 1 era una muestra de control tratada sin enzima. Cuanto mayor es el número, mejor es el efecto de eliminación de pelusa. Los resultados se muestran en la figura 4. El rendimiento de bioacabado (eliminación de pelusa) de la variante ACM88 era mejor que el de ACM0 a 50°C, ambos a pH 6 y sin ajuste de pH (pH aproximadamente 8).

Ejemplo 6 Ensayos en Launder-Ometer de variantes de celulasa Cel45A de *A. thermophilum* con aplicación de detergente líquido

Se analizaron las variantes de celulasa Cel45A de ACM90 y ACM91 de *A. thermophilum* producidas en *Trichoderma*, respecto a su rendimiento con detergente líquido comercial para ropa de color a 40°C y se compararon con la celulasa At_Cel45A (SEQ ID NO: 13) y la preparación de celulasa comercial de Carezyme® (Sigma-Aldrich C-2605-50 ml).

Los ensayos se efectuaron y los resultados se evaluaron como se describió en el ejemplo 3, excepto que las dosificaciones de celulasa At_Cel45A son 0, 0,1, 0,2 ó 0,4 mg de proteína enzimática activa (AEP) por litro de licor de lavado. Las dosificaciones correspondientes de la variante ACM90 o ACM91 son 0, 0,05, 0,1 ó 0,2 mg de AEP/litro.

Los resultados se muestran en las figuras 5A y B. El efecto de eliminación de bolitas/reavivado del color medido con el monitor de ensayo con formación previa de bolitas E-253 y el efecto anti-formación de bolitas/cuidado del color medido con el monitor sin formación de bolitas E-252 de las variantes ACM90 y ACM91 mejoró considerablemente en comparación con la celulasa At_Cel45A.

Como conclusión, los resultados descritos en los ejemplos 3 y 6 muestran que el rendimiento de las variantes de endoglucanasa es mejorado, en comparación con la enzima progenitora, independientemente del origen del enlazador y de la región CBM.

Referencias

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.

Coen DM. (2001) The polymerase chain reaction. In: Ausubel FM., Brent R., Kingston RE., More DD., Seidman JG., Smith K. y Struhl K. (eds.) *Current protocols in molecular biology*. John Wiley & Sons. Inc., Hoboken, USA.

Gellissen G. (ed.) (2005) *Production of recombinant proteins. Novel microbial and eukaryotic expression systems*. Wiley-VCH Verlag GmbH&Co. Weinheim, Alemania.

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.

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.

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.

Sambrook J y DW Russell. 2001. Molecular cloning, a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, US.

- 5 Smith TF y MS Waterman. 1981. Identification of common molecular subsequences. J. Mol. Biol. 147: 195-197.

Lista de secuencias

<110> Roal A.

<120> Variantes de endoglucanasas fúngicas, su producción y uso

<130> 2140155PC

- 10 <160> 13

<170> PatenteEn versión 3.5

<210> 1

<211> 214

<212> PRT

- 15 <213> Acremonium thermophilum

<400> 1

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

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

Ala Asp Trp Gln Arg Ile Ser Asp Phe Asn Ala Lys Ser Gly Cys Asp
35 40 45

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

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

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

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

Asp Leu Gly Ser Asn Gln Phe Asp Leu Ala Ile Pro Gly Gly Gly Val
115 120 125

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

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

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

ES 2 907 702 T3

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

Thr Ser Arg Thr Gly Cys Lys Arg Asp Asp Asp Ala Ser Tyr Pro Val
195 200 205

Phe Asn Pro Pro Ser Gly
210

<210> 2

<211> 214

<212> PRT

5 <213> Geomyces pannorum

<400> 2

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

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

Ser Cys Asp Lys Gly Asp Asn Val Leu Ala Asp Ala Asp Thr Lys Ser
35 40 45

Ala Cys Asp Asn Gly Gly Pro Ala Phe Met Cys Ser Asp Glu Ser Pro
50 55 60

Trp Ala Val Ser Asp Ser Leu Ala Tyr Gly Phe Ala Ala Val Ser Ile
65 70 75 80

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

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

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

Gly Gly Gly Phe Gly Leu Phe Asn Ala Cys Thr Pro Gln Tyr Gly Thr
130 135 140

Pro Ser Thr Gly Trp Gly Asn Gln Tyr Gly Gly Leu Thr Ser Arg Ser
145 150 155 160

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

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

Val Ala Cys Pro Leu Ala Leu Thr Asn Lys Ser Gly Cys Val Arg Ser
195 200 205

Asp Asp Thr Pro Thr Gly
210

10 <210> 3

ES 2 907 702 T3

<211> 1079
<212> ADN
<213> Acremonium thermophilum

<400> 3

atgtatcgga agttggccgt catctcggcc ttcttggcca cagctcgtgc cctcgacgga	60
aagtcgacga ggtatgcaa tcctcgtacc tctgccctct gtagaaacaa gtgaccgact	120
gcaaagacag atactgggac tgctgcaagc cgtcctgcgg ctgggcccga aaggcctcgg	180
tgaaccagcc cgtcttctcg tgctcggccg actggcagcg catcagcgac ttcaacgaga	240
agtcgggctg cgacggaggc tccgcctact cgtgcgccga ccagacgccc tgggcggtca	300
acgacaactt ctcgtagcgc ttgcgagcca cggccatcgc cggcgggtcc gagtccagct	360
ggtgctgcgc ctgctatgcg tgagttctct gcaagccgct tcccaccccc gctttctgtg	420
caggccgctt ccccccctacc caccacttc ccccccccg cctctgtgat cgggcatccg	480
agctaagttg cgtgtcgtcc agactcacct tcaactcggg ccccgtcgcg ggcaagacca	540
tggtggtgca gtcgaccagc accggcggcg acctgggcag caaccagttc gacctcgcca	600
tccccggcgg cggcgtgggc atcttcaacg gctgcgcctc ccagttcggc ggcctccccg	660
gcgcccagta cggcggcatc agcgaccgca gccagtgtc gtccctcccc gcgcccgtcc	720
agccgggctg ccagtggcgc ttcgactggt tccagaacgc cgacaacccc accttcacct	780
tccagcgctg gcagtccccg tccgagctca cgtcccgcac gggctgtaag cgcgacgacg	840
acgccagcta tcccgtcttc aaccgcctt cgggcaaccc tagcggcggc aaccctcccg	900
gcggaaaccc gcctggcacc accaccaccc gccgccagc cactaccact ggaagctctc	960
ccggacctac ccagtctcac tacggccagt gcggcggtat tggctacagc ggccccacgg	1020
5 tctgcgccag cggcacaact tgccaggtcc tgaaccctta ctactctcag tgctgtaa	1079

<210> 4
<211> 1079
<212> ADN
<213> Acremonium thermophilum

10 <400> 4

atgtatcgga agttggccgt catctcggcc ttcttggcca cagctcgtgc cctcgacgga	60
---	----

ES 2 907 702 T3

aagtcgacga ggtatgccaa tctctgtacc tctgccctct gtagaaacaa gtgaccgact	120
gcaaagacag atactgggac tgctgcaagc cgtcctgcgg ctgggccgga aaggcctcgg	180
tgaaccagcc cgtcttctcg tgctcggccg actggcagcg catcagcgac ttcaacgcga	240
agtcgggctg cgacggaggc tccgcctact cgtgcgccga ccagacgccc tgggcggtca	300
acgacaactt ctcgtacggc ttgcgagcca cggccatcgc cggcggctcc gagtccagct	360
ggtgctgcgc ctgctatgcg tgagttctct gcaagccgct tcccaccccc gctttctgtg	420
caggccgctt cccccctacc caccacttc ccccccccg cctctgtgat cgggcatccg	480
agctaagttg cgtgtcgtcc agactcacct tcaactcggg ccccgtcgcg ggcaagacca	540
tggtggtgca gtcgaccaac accggcggcg acctgggcca gaaccacttc gacctcgcca	600
tccccggcgg cggcgtgggc atcttcaacg gctgcgcctc ccagttcggc ggcctccccg	660
gcgcccagta cggcggcatc agcgaccgca gccagtgtc gtccttcccc gcgcgctcc	720
agccgggctg ccagtgccgc ttcgactggt tccagaacgc cgacaacccc accttcacct	780
tccagcgctg gcagtgcccc tccgagctca cgtccgcac gggctgtaag cgcgacgacg	840
acgccagcta tccgctcttc aaccgcctt cgggcaaccc tagcggcggc aaccctcccg	900
gcggaaaccc gcctggcacc accaccaccc gccgcccagc cactaccact ggaagctctc	960
ccggacctac ccagtctcac tacggccagt gcggcggtat tggtacagc ggccccacgg	1020
tctgcgccag cggcacaact tgccaggtcc tgaaccctta ctactctcag tgcctgtaa	1079

<210> 5

<211> 1079

<212> ADN

5 <213> Acremonium thermophilum

<400> 5

atgtatcgga agttggccgt catctcggcc ttcttggcca cagctcgtgc cctcgacgga	60
aagtcgacga ggtatgccaa tctctgtacc tctgccctct gtagaaacaa gtgaccgact	120
gcaaagacag atactgggac tgctgcaagc cgtcctgcgg ctgggccgga aaggcctcgg	180
tgaaccagcc cgtcttctcg tgctcggccg actggcagcg catcagcgac ttcaacgcga	240
agtcgggctg cgacggaggc aacgcctact cgtgcgccga ccagacgccc tgggcggtca	300
acgacaactt ctcgtacggc ttgcgagcca cggccatcgc cggcggctcc gagcagagct	360
ggtgctgcgc ctgctatgcg tgagttctct gcaagccgct tcccaccccc gctttctgtg	420
caggccgctt cccccctacc caccacttc ccccccccg cctctgtgat cgggcatccg	480
agctaagttg cgtgtcgtcc agactcacct tcaactcggg ccccgtcgcg ggcaagacca	540
tggtggtgca gtcgaccagc accggcggcg acctgggcag caaccagttc gacctcgcca	600
tccccggcgg cggcgtgggc atcttcaacg gctgccagtc ccagttcggc ggcctccccg	660

ES 2 907 702 T3

gcgcccagta cggcggcatc caggaccgca gccagtgtc gtccctcccc gcgcccgtcc 720
agccgggctg ccagtggcgc ttcgactggg tccagaacgc cgacaacccc accttcacct 780
tccagcgcgt gcagtggccg tccgagctca cgtcccgcac gggctgtaag cgcgacgacg 840
acgccaacta tcccgtcttc aaccgcctt cgggcaaccc tagcggcggc aaccctccc 900
gcggaaaccc gcctggcacc accaccaccc gccgcccagc cactaccact ggaagctctc 960
ccggacctac ccagtctcac tacggccagt gcggcggtat tggctacagc ggccccacgg 1020
tctgcgccag cggcacaact tgccaggtcc tgaaccctta ctactctcag tgcctgtaa 1079

<210> 6

<211> 1079

<212> ADN

5 <213> Acremonium thermophilum

<400> 6

atgtatcgga agttggcgt catctcgcc ttcttggcca cagctcgtgc cctcgacgga 60
aagtgcagca ggtatgccaa tctcgtacc tctgccctct gtagaaacaa gtgaccgact 120
gcaaagacag atactgggac tgctgcaagc cgtcctgcgg ctggggccgga aaggcctcgg 180
tgaaccagcc cgtcttctcg tgctcggccg actggcagcg catcagcgac ttcaacgcga 240
agtcgggctg cgacggaggc aacgcctact cgtgcgccga ccagacgccc tgggcgggtca 300
acgacaactt ctctgtacgc ttctgcagcca cggccatcgc cggcgggtcc gagcagagct 360
gggtgctgcgc ctgctatgcg tgagttctct gcaagccgct tcccaccccc gctttctgtg 420
caggccgctt ccccccctacc caccacttc ccccccccg cctctgtgat cgggcatccg 480
agctaagttg cgtgtcgtcc agactcacct tcaactcggg ccccgtcgcg ggcaagacca 540
tggtggtgca gtcgaccaac accggcggcg acctgggcga gaaccacttc gacctcgcca 600
tccccggcgg cggcgtgggc atcttcaacg gctgccagtc ccagttcggc ggcctccccg 660
gcgcccagta cggcggcatc caggaccgca gccagtgtc gtccctcccc gcgcccgtcc 720
agccgggctg ccagtggcgc ttcgactggg tccagaacgc cgacaacccc accttcacct 780
tccagcgcgt gcagtggccg tccgagctca cgtcccgcac gggctgtaag cgcgacgacg 840
acgccaacta tcccgtcttc aaccgcctt cgggcaaccc tagcggcggc aaccctccc 900
gcggaaaccc gcctggcacc accaccaccc gccgcccagc cactaccact ggaagctctc 960
ccggacctac ccagtctcac tacggccagt gcggcggtat tggctacagc ggccccacgg 1020
tctgcgccag cggcacaact tgccaggtcc tgaaccctta ctactctcag tgcctgtaa 1079

<210> 7

<211> 1079

<212> ADN

10 <213> Acremonium thermophilum

<400> 7

ES 2 907 702 T3

atgtatcgga agttggccgt catctcggcc ttcttggcca cagctcgtgc cctcgacgga	60
aagtcgacga ggtatgccaa tctctgtacc tctgccctct gtagaaacaa gtgaccgact	120
gcaaagacag atactgggac tgctgcaagc cgtcctgcgg ctgggccgga aaggcctcgg	180
tgaaccagcc cgtcttctcg tgctcggccg actggcagcg catcagcgac ttcaacgcga	240
agtcgggctg cgacggaggc aacgcctact cgtgcgccga ccagacgccc tgggcggtca	300
acgacaactt ctctgtacgc ttgcgagcca cgtccatctc cggcgggtcc gagcagagct	360
ggtgctgcgc ctgctatgcg tgagttctct gcaagccgct tcccccccc gctttctgtg	420
caggccgctt cccccctacc caccacttc ccccccccg cctctgtgat cgggcatccg	480
agctaagttg cgtgtcgtcc agactcacct tcaactcggg ccccgtcgcg ggcaagacca	540
tgggtggtgca gtcgaccaac accggcggcg acctgggcag caaccacttc gacctcgcca	600
tccccggcgg cggcgtgggc atcttcaacg gctgccagtc ccagttcggc ggcctccccg	660
gcgcccagta cggcggcatc caggaccgca gccagtgtc gtccctcccc gcgcccgtcc	720
agccgggctg ccagtgccgc ttgactggt tccagaacgc cgacaacccc accttcacct	780
tccagcgcgt gcagtcccc tccgagctca cgtccgcac gggctgtaag cgcgacgacg	840
acgccaacta tcccgcttc aaccgcctt cgggcaaccc tagcggcggc aaccctcccc	900
gcggaaaacc gcctggcacc accaccaccc gccgccagc cactaccact ggaagctctc	960
ccggacctac ccagtctcac tacggccagt gcggcggat tggctacagc ggccccacgg	1020
tctgcgccag cggcacaact tgccaggtcc tgaaccctta ctactctcag tgcctgtaa	1079

<210> 8

<211> 1079

<212> ADN

<213> Acremonium thermophilum

5

<400> 8

atgtatcgga agttggccgt catctcggcc ttcttggcca cagctcgtgc cctcgacgga	60
aagtcgacga ggtatgccaa tctctgtacc tctgccctct gtagaaacaa gtgaccgact	120
gcaaagacag atactgggac tgctgcaagc cgtcctgcgg ctgggccgga aaggcctcgg	180
tgaaccagcc cgtcttctcg tgctcggccg actggcagcg catcagcgac ttcaacgcga	240
agtcgggctg cgacggaggc aacgcctact cgtgcgccga ccagacgccc tgggcggtca	300
acgacaactt ctctgtacgc ttgcgagcca cggccatcgc cggcgggtcc gagcagagct	360
ggtgctgcgc ctgctatgcg tgagttctct gcaagccgct tcccccccc gctttctgtg	420
caggccgctt cccccctacc caccacttc ccccccccg cctctgtgat cgggcatccg	480
agctaagttg cgtgtcgtcc agactcacct tcaactcggg ccccgtcgcg ggcaagacca	540
tgggtggtgca gtcgaccagc accggcggcg acctgggcga gaaccacttc gacctcgcca	600

ES 2 907 702 T3

tccccggcgg	cggcgtgggc	atcttcaacg	gctgccagtc	ccagttcggc	ggcctccccg	660
gcgccagta	cggcggcatc	caggaccgca	gccagtgtc	gtccttcccc	gcgccgtcc	720
agccgggctg	ccagtggcgc	ttcgactgg	tccagaacgc	cgacaacccc	accttcacct	780
tccagcgcgt	gcagtgtccg	tccgagctca	cgtcccgcac	gggctgtaag	cgcgacgacg	840
acgccaaacta	tcccgtcttc	aaccgcctt	cgggcaacc	tagcggcggc	aacctccccg	900
gcggaaaccc	gcctggcacc	accaccacc	gccgccagc	cactaccact	ggaagctctc	960
ccggacctac	ccagtctcac	tacggccagt	gcggcggtat	tggctacagc	ggccccacgg	1020
tctgcgccag	cggcacaact	tgccaggtcc	tgaaccctta	ctactctcag	tgcctgtaa	1079

<210> 9

<211> 1076

<212> ADN

5 <213> Acremonium thermophilum

<400> 9

atgcgtctct	caccctttct	ccgcgcagct	ctggctgccg	ctctgcctct	gagcgcccat	60
gccctcgacg	gaaagtcgac	gaggtatgcc	aatcctcgta	cctctgccct	ctgtagaaac	120
aagtgaccga	ctgcaaagac	agatactggg	actgctgcaa	gccgtcctgc	ggctgggccc	180
gaaaggcctc	ggtgaaccag	cccgtcttct	cgtgctcggc	cgactggcag	cgcatcagcg	240
acttcaacgc	gaagtccggc	tgcgacggag	gctccgccta	ctcgtgcgcc	gaccagacgc	300
cctgggcggg	caacgacaac	ttctcgtacg	gcttcgcagc	cacggccatc	gccggcgggt	360
ccgagtcacg	ctgggtgctg	gcctgctatg	cgtgagttct	ctgcaagccg	cttccccacc	420
ccgctttctg	tgcaggccgc	ttcccccta	cccaccact	tcccccccc	cgcctctgtg	480
atcgggcatc	cgagctaagt	tgcgtgtcgt	ccagactcac	cttcaactcg	ggccccgtcg	540
cgggcaagac	catggtgggt	cagtcgacca	gcaccggcgg	cgacctgggc	agcaaccagt	600
tcgacctcgc	catccccggc	ggcggcggtg	gcatcttcaa	cggtgcgcc	tcccagttcg	660
gcggcctccc	cggcgccag	tacggcgcca	tcagcgaccg	cagccagtgc	tcgtccttcc	720
ccgcgccgct	ccagccgggc	tgccagtggc	gcttcgactg	gttccagaac	gccgacaacc	780
ccaccttcac	cttccagcgc	gtgcagtgcc	cgtccgagct	cacgtcccgc	acgggctgta	840
agcgcgacga	cgacgccagc	tatcccgctc	tcaacccgcc	tagcgggtgg	tccccagca	900
ccaccagcac	caccaccagc	tcccgtccg	gtcccacggg	caaccctcct	ggaggcgggtg	960
gctgcactgc	ccagaagtgg	gccagtgcg	gcggcactgg	cttcacgggc	tgcaccacct	1020
gcgtctcggg	caccacctgc	caggtgcaga	accagtggta	ttcccagtgt	ctgtga	1076

<210> 10

<211> 1076

<212> ADN

10 <213> Acremonium thermophilum

<400> 10

ES 2 907 702 T3

atgcgctcct caccctttct ccgcgagct ctggtgccc ctctgcctct gagcgcccat	60
gccctcgacg gaaagtcgac gaggtatgcc aatcctcgta cctctgccct ctgtagaaac	120
aagtgaccga ctgcaaagac agatactggg actgctgcaa gccgtcctgc ggctgggccc	180
gaaaggcctc ggtgaaccag cccgtcttct cgtgctcggc cgactggcag cgcacacagc	240
acttcaacgc gaagtcgggc tgcgacggag gcaacgccta ctctgctgcc gaccagacgc	300
cctgggcccgt caacgacaac ttctcgtacg gcttcgcagc cacggccatc gccggcggct	360
ccgagcagag ctggtgctgc gcctgctatg cgtgagttct ctgcaagccg cttcccaccc	420
ccgctttctg tgcaggccgc ttcccccta cccaccact tcccccccc cgcctctgtg	480
atcgggcatc cgagctaagt tgcgtgtcgt ccagactcac cttcaactcg ggccccgtcg	540
cgggcaagac catggtggtg cagtcgacca acaccggcgg cgacctgggc gagaaccact	600
tgcacctcgc catccccggc gggggcgtgg gcatcttcaa cggctgccag tcccagttcg	660
gcggcctccc cggcgcccag tacggcgcca tccaggaccg cagccagtgc tcgtccttcc	720
ccgcgccgct ccagccgggc tgccagtggc gcttcgactg gttccagaac gccgacaacc	780
ccaccttcac cttccagcgc gtgcagtgcc cgtccgagct cacgtcccgc acgggctgta	840
agcgcgacga cgacgccaac tatcccgctt tcaaccggc tagcgggtggc tccccagca	900
ccaccagcac caccaccagc tcccgtccg gtcccacggg caaccctcct ggaggcggtg	960
gctgcactgc ccagaagtgg gccagtgcg gcggcactgg cttcacgggc tgcaccacct	1020
gcgtctcggg caccacctgc caggtgcaga accagtggta ttccagtggt ctgtga	1076

<210> 11

<211> 1076

<212> ADN

5 <213> Acremonium thermophilum

<400> 11

atgcgctcct caccctttct ccgcgagct ctggtgccc ctctgcctct gagcgcccat	60
gccctcgacg gaaagtcgac gaggtatgcc aatcctcgta cctctgccct ctgtagaaac	120
aagtgaccga ctgcaaagac agatactggg actgctgcaa gccgtcctgc ggctgggccc	180
gaaaggcctc ggtgaaccag cccgtcttct cgtgctcggc cgactggcag cgcacacagc	240
acttcaacgc gaagtcgggc tgcgacggag gcaacgccta ctctgctgcc gaccagacgc	300
cctgggcccgt caacgacaac ttctcgtacg gcttcgcagc cacggccatc gccggcggct	360
ccgagcagag ctggtgctgc gcctgctatg cgtgagttct ctgcaagccg cttcccaccc	420
ccgctttctg tgcaggccgc ttcccccta cccaccact tcccccccc cgcctctgtg	480

ES 2 907 702 T3

```

atcgggcatc cgagctaagt tgcgtgtcgt ccagactcac cttcaactcg ggccccgtcg      540
cgggcaagac catggtggtg cagtcgacca gcaccggcgg cgacctgggc gagaaccact      600
tcgacctcgc catccccggc ggcggcgtgg gcatcttcaa cggtgccag tcccagttcg      660
gcggcctccc cggcgccag tacggcggca tccaggaccg cagccagtgc tcgtccttcc      720
ccgcgccgct ccagccgggc tgccagtggc gcttcgactg gttccagaac gccgacaacc      780
ccaccttcac cttccagcgc gtgcagtgcc cgtccgagct cacgtccgc acgggctgta      840
agcgcgacga cgacgccaac tatccgtct tcaaccggcc tagcggtggc tccccagca      900
ccaccagcac caccaccagc tcccgtccg gtcccacggg caaccctcct ggaggcggtg      960
gctgcactgc ccagaagtgg gcccagtgcg gcggcactgg cttcacgggc tgcaccacct     1020
gcgtctcggg caccacctgc caggtgcaga accagtggta ttccagtgt ctgtga         1076

```

<210> 12

<211> 298

<212> PRT

5 <213> Acremonium thermophilum

<400> 12

```

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 2 907 702 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> 13

<211> 297

<212> PRT

5 <213> Acremonium thermophilum

<400> 13

Met Arg Ser Ser Pro Phe Leu Arg Ala Ala Leu 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

ES 2 907 702 T3

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 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

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido de endoglucanasa variante que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95% de identidad de secuencia con los aminoácidos 1 a 214 de SEQ ID NO: 1 y sustituciones de aminoácidos en las posiciones
- 5 S109N, S116Q y Q118H; o
 S51N, S82Q, A135Q, S150Q y S205N o
 S51N, S82Q, S109N, S116E, Q118H, A135Q, S150Q y S205N; o
 S51N, A75S, A77S, S82Q, S109N, Q118H, A135Q, S150Q y S205N; o
 S51N, S82Q, S116E, Q118H, A135Q, S150Q y S205N; y
- 10 en donde el polipéptido de endoglucanasa variante tiene actividad de endoglucanasa.
2. El polipéptido de endoglucanasa variante según la reivindicación 1 unido a un módulo de unión a carbohidrato y opcionalmente a una región enlazadora.
3. El polipéptido de endoglucanasa variante según la reivindicación 1, en donde el polipéptido de endoglucanasa variante está unido a un módulo de unión a carbohidrato y una región enlazadora, que son heterólogos u homólogos.
- 15 4. El polipéptido de endoglucanasa variante según la reivindicación 3, en donde al menos uno del módulo de unión a carbohidrato y la región enlazadora es heterólogo.
5. Un polinucleótido aislado seleccionado del grupo que consiste en:
 - a) un polinucleótido o ADN complementario que codifica el polipéptido de endoglucanasa variante según las reivindicaciones 1 a 4;
 - 20 b) un polinucleótido que codifica un fragmento de un polipéptido codificado por un polinucleótido de a) en donde dicho fragmento tiene actividad de endoglucanasa
 - c) un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótido que se degenera a la secuencia de nucleótido de una secuencia de polinucleótido de a) o b),
 - o la cadena complementaria de tal polinucleótido.
- 25 6. Un vector, que comprende un polinucleótido según la reivindicación 5 ligado de manera operable a secuencias reguladoras capaces de dirigir la expresión del polipéptido de endoglucanasa variante según la reivindicación 1.
7. Una célula hospedante que comprende el vector según la reivindicación 6.
8. Un método para producir el polipéptido de endoglucanasa variante según la reivindicación 1, comprendiendo dicho método las etapas de transformar una célula hospedante con un vector de expresión que codifica dicho polipéptido de endoglucanasa variante, y cultivar dicha célula hospedante bajo condiciones que permitan la expresión de dicho polipéptido de endoglucanasa variante, y opcionalmente recuperar y purificar dicho polipéptido de endoglucanasa variante.
- 30 9. Una preparación de enzima que comprende el polipéptido de endoglucanasa variante según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
- 35 10. La preparación de enzima según la reivindicación 9 que comprende al menos una enzima seleccionada de un grupo que consiste en otras celulasas, amilasas, lipasas, proteasas, hemicelulasas, ligninasas, enzimas pectinolíticas y/o enzimas oxidativas.
11. Una composición detergente que comprende el polipéptido de endoglucanasa variante según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o una preparación de enzima según la reivindicación 9 ó 10, un agente tensoactivo y opcionalmente uno o más aditivos seleccionados de un grupo que consiste en estabilizadores, amortiguadores, agentes activos en superficie, mejoradores de detergencia, comejoradores de detergencia, agentes blanqueadores, activadores de blanqueado, otras enzimas detergentes, mediadores de enzimas oxidativas, agentes anti-corrosión, agentes antiredeposición y polímeros para liberación de suciedad, cáusticos, abrasivos, abrillantadores ópticos, tintes, pigmentos, perfumes y conservantes.
- 40 12. Un método para tratar material celulósico, en donde el método comprende hacer reaccionar el material celulósico con el polipéptido de endoglucanasa variante según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o la preparación de enzima según la reivindicación 9 o 10.
- 45

13. El método según la reivindicación 12, en donde el material celulósico es material textil, plantas utilizadas en alimentos para animales, o pulpa o fibra secundaria derivada de la madera.
14. El método según la reivindicación 13, en donde el método comprende poner en contacto el material textil con la composición detergente según la reivindicación 11.
- 5 15. El método según la reivindicación 14, que es ropa de colada.
16. El método según la reivindicación 15, que es biodesgaste o bioacabado.
17. Uso del polipéptido de endoglucanasa variante según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o la preparación de enzima según la reivindicación 9 ó 10 en la industria textil y de detergentes, en el procesamiento de biomasa, en la industria de biocombustibles, almidón, pulpa y papel, alimentaria, panadería, de alimentos o de bebidas.
- 10 18. Uso según la reivindicación 17 para el bioacabado o biodesgaste de materiales textiles como telas o ropa o hilo.

FIG. 1

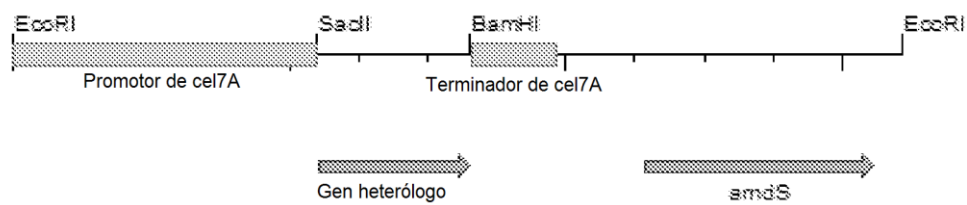


Figura 2

Figura 2A

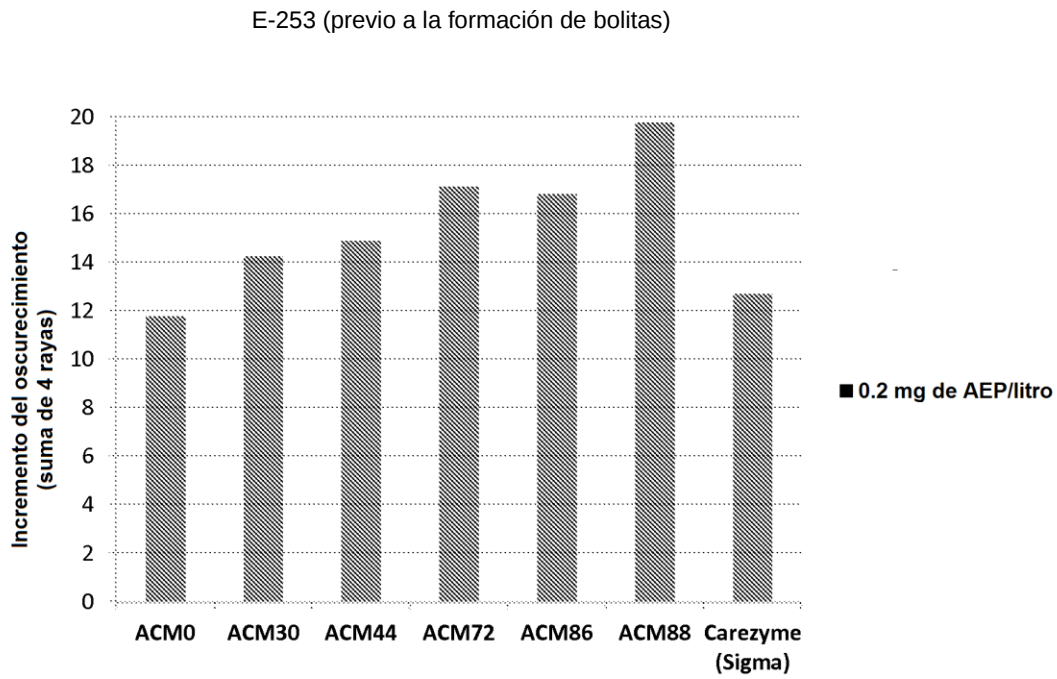


Figura 2B

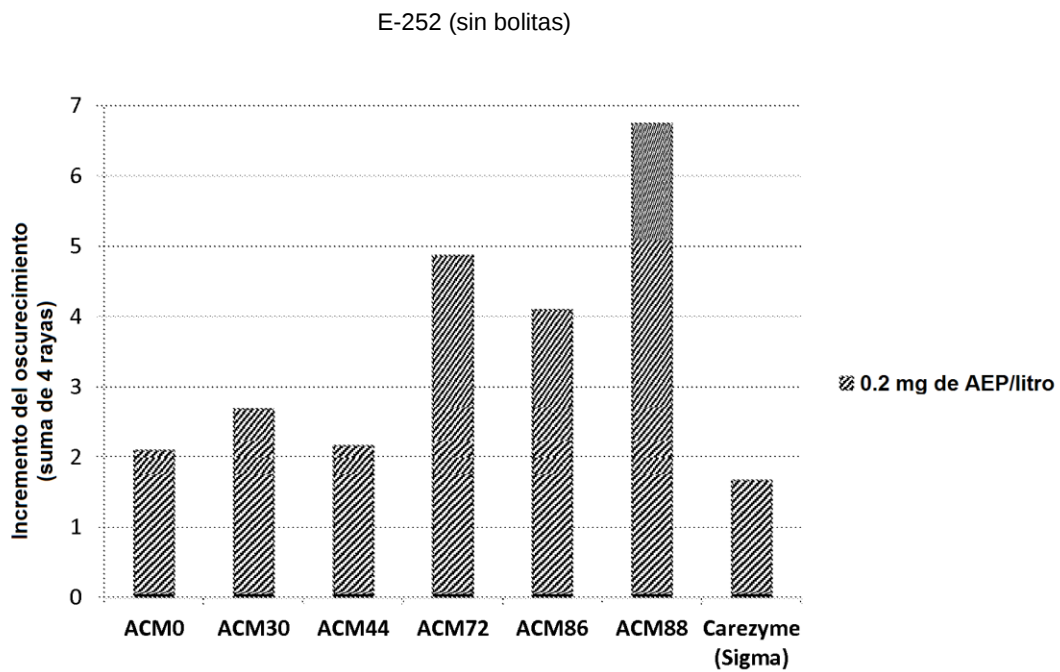


Figura 3

Figura 3A

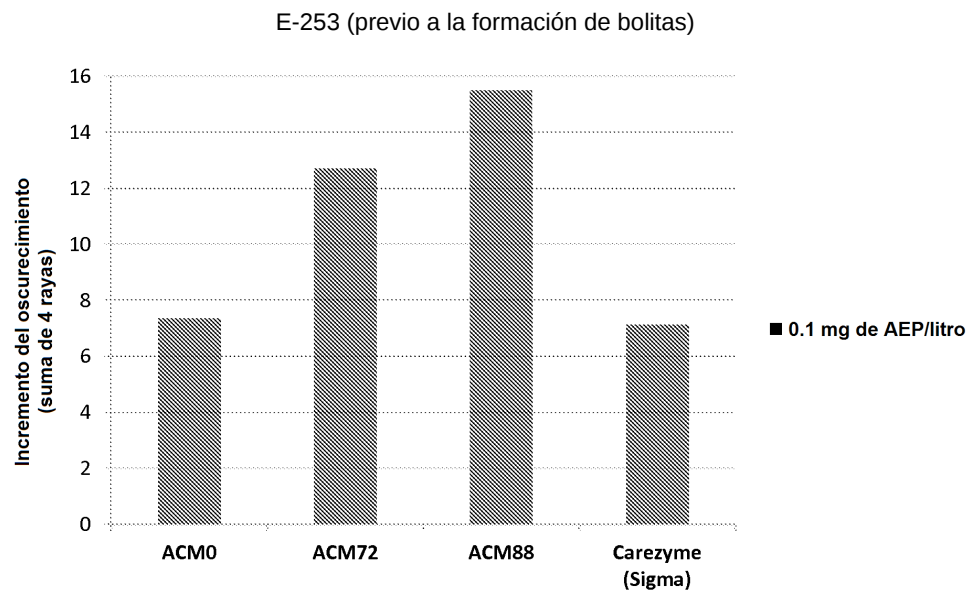


Figura 3B

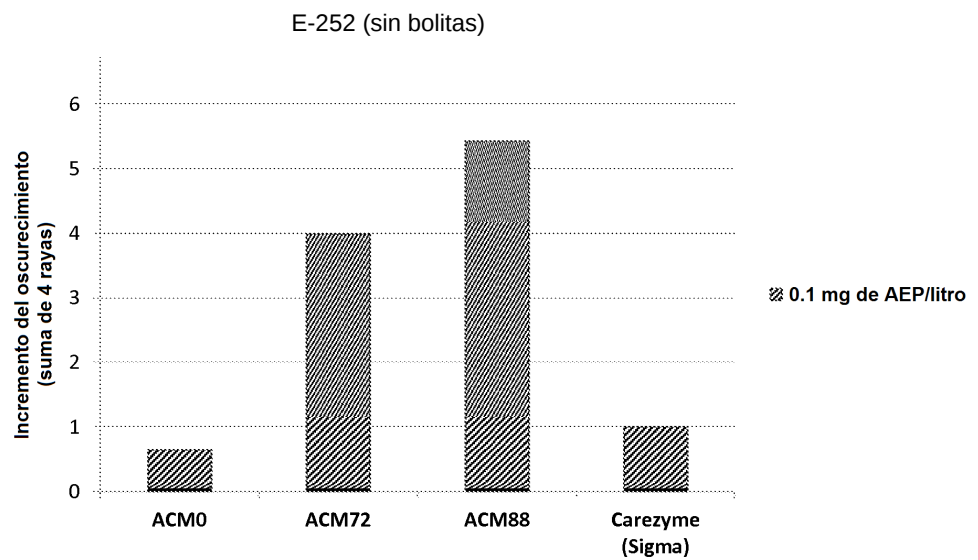


Figura 4

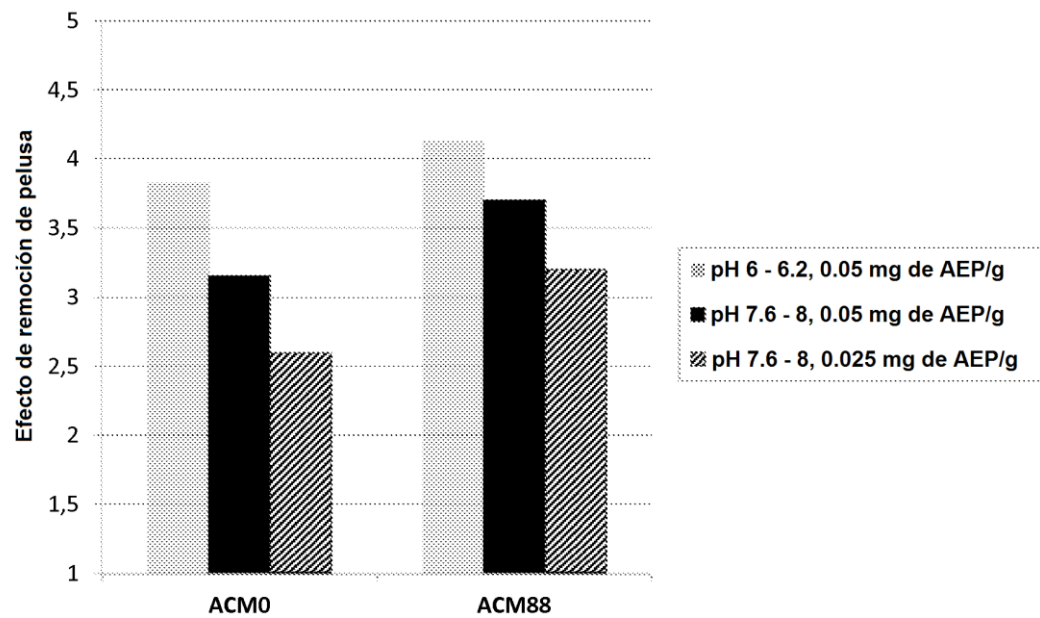


Figura 5

Figura 5A

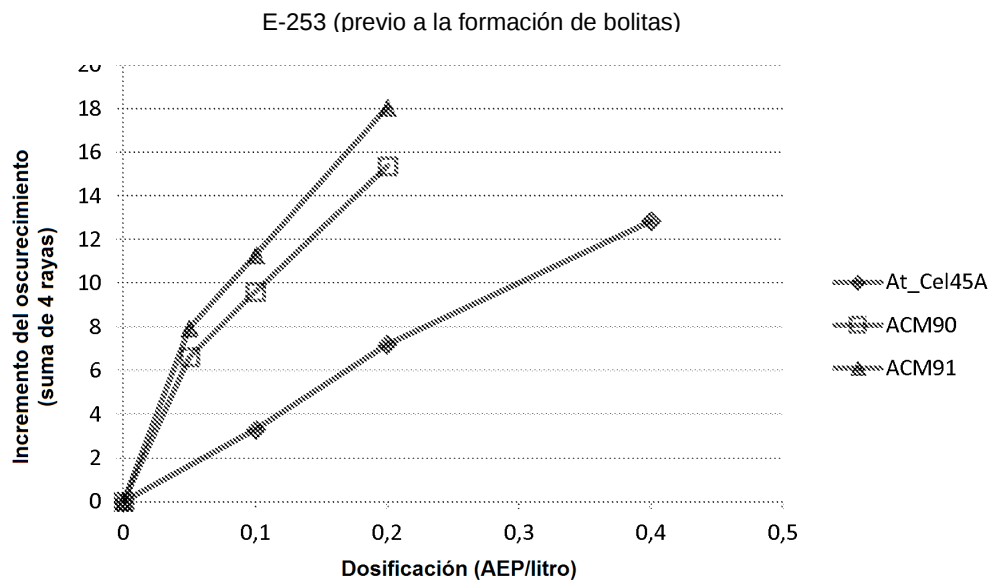


Figura 5B

