



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 314 114**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/56** (2006.01)

**C12N 9/42** (2006.01)

**C12N 9/96** (2006.01)

**C11D 3/386** (2006.01)

**D06M 16/00** (2006.01)

**D21H 11/20** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02786115 .2**

96 Fecha de presentación : **17.12.2002**

97 Número de publicación de la solicitud: **1462524**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **29.09.2004**

54

Título: **Preparaciones de celulasa que contienen agente reductor y procedimiento para procesar fibras.**

30

Prioridad: **18.12.2001 JP 2001-384037**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.03.2009**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.03.2009**

73

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

72

Inventor/es: **Nakane, Akitaka;**  
**Koga, Jinichiro y**  
**Kubota, Hidetoshi**

74

Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 314 114 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

Preparaciones de celulasa que contienen agente reductor y procedimiento para procesar fibras.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a una preparación de celulasa que contiene un agente reductor por el cual se mejora la actividad endoglucanasa, y un procedimiento para tratar una tela usando la preparación de celulasa.

10 **Técnica antecedente**

La celulasa tiene tres tipos de actividades enzimáticas: una actividad celobiohidrolasa que hidroliza regiones cristalinas sólidas de la celulosa desde el extremo no reducido de un modo exo para generar celobiosa; una actividad endoglucanasa que hidroliza regiones amorfas de la celulosa del modo endo para transformar moléculas de celulosa en moléculas de bajo peso molecular y para generar diversos tipos de celooligosacáridos; y una actividad  $\beta$ -glucosidasa que descompone la celobiosa o celooligosacáridos en glucosa. De estas actividades enzimáticas, se sabe que es ventajosa la celulasa que tiene una elevada actividad endoglucanasa cuando se trata una tela.

Para conferir propiedades deseadas a telas que contienen celulosa, la tela tiene que tratarse de forma convencional con celulasa. Por ejemplo, en la industria textil, el tratamiento con celulasa se realiza para mejorar el tacto y el aspecto de la tela que contiene celulosa, o para conferir un aspecto "lavado a la piedra" a la tela que contiene celulosa coloreada, proporcionando de este modo a la tela variaciones localizadas de color (Patente EP N° 307.564).

En dicho procesamiento textil, se usa principalmente celulasa derivada de hongos que carcomen la madera tales como *Trichoderma* o *Humicola*. Dicha celulasa se usó en forma de una mezcla que comprende múltiples componentes de celulasa obtenidos del procesamiento de un filtrado de cultivo de microorganismos que tienen actividad celulolítica. Sin embargo, para conseguir una mayor economía, entre las preparaciones de celulasa obtenidas por aislamiento de componentes de celulasa, solamente la endoglucanasa, que actúa principalmente en el tratamiento de telas, y que está genéticamente potenciada, se ha usado recientemente.

Los ejemplos de dicha endoglucanasa con elevada actividad incluyen: EGV [Publicación Internacional no Examinada (Kohyo) N° 5-509223] y NCE4 (documento WO98/03640) derivadas de *Humicola insolens*, que actúan en gran medida sobre telas de algodón; RCE I, RCE II, y RCE III derivadas de *Rhizopus oryzae*, que actúan en gran medida sobre telas de lyocell; MCE I y MCE II derivadas de *Mucor circinelloides*; y PCE I derivada de *Phycomyces nitens* (documento WO00/24879).

Para mejorar los efectos de la celulasa, también se ha intentado el uso combinado de aditivos. Por ejemplo, la Publicación Internacional no Examinada (Kohyo) N° 5-507615 describe que un polímero soluble en agua tal como polivinilpirrolidona, poli(alcohol vinílico), y poliacrilamida potencia los efectos de la celulasa derivada de *Humicola insolens* y mejora su actividad para retirar la pelusa de telas coloreadas. Además, se sabe que la actividad CMCasa en la solución de cultivo de *Trichoderma viride* se mejora por la adición de Tween 20 (Ooshima, H. y col., *Biotechnology and Bioengineering* 28: 1727-1734, 1986). Además, se sabe que la actividad para retirar la pelusa de RCE I derivada de *Rhizopus oryzae* se mejora en presencia de un tensioactivo no iónico (documento WO02/38754).

El documento US 5 225 102 describe composiciones para estabilidad aumentada en blanqueado en seco oxidante. Se menciona en la columna 3, línea 60 a las celulasas como una enzima capaz de hidrolizar sustratos. Para este propósito se propone encapsular las enzimas. Se sugirió que también se encapsularan agentes reductores que se considera que protegen las enzimas. Se menciona el sulfito sódico como agente reductor que puede estar presente en una cantidad del 0,1 al 60% en peso. El documento JP 10 001870 A describe una composición de agente suavizante sólida para suavizar las prendas. La composición incluye una sustancia de arcilla suavizante tal como kaolín y/o celulasa y -además de una sustancia adicional- uno o más tipos de compuestos seleccionados entre urea y sus derivados, tiourea, sales p-tolueno sulfúricas, sales inorgánicas solubles en agua y poliéteres. El documento US 4 404 115 describe composiciones de limpieza líquidas acuosas que contienen enzimas. La enzima puede ser una celulolítica que esté presente junto con un pentaborato de metal alcalino, un sulfito de metal alcalino y un poliol. El pentaborato de metal alcalino parece ser la característica esencial en vista de la estabilización de la enzima.

60 **Descripción de la invención**

Las celulasas usadas para los propósitos descritos anteriormente son todas caras. Por lo tanto, para conseguir una aplicación a nivel industrial, los presentes inventores consideraron que se desea una mejora adicional de la actividad endoglucanasa, de modo que los efectos anteriores de la celulasa puedan ejercerse de forma más eficaz. Además, cuando se realiza un intento por obtener los efectos de una mejora de la actividad endoglucanasa, el uso de aditivos caros aumenta los costes del tratamiento de procesamiento textil. Por lo tanto, cuando se seleccionan los aditivos, los presentes inventores consideraron que es necesario mostrar los efectos de la mejora de la actividad añadiendo una baja concentración de los aditivos, y que los aditivos deben estar fácilmente disponibles y ser económicos.

## ES 2 314 114 T3

Por lo tanto, el objetivo de la presente invención es proporcionar una preparación de celulasa que tenga la actividad endoglucanasa mejorada, que pueda usarse en el tratamiento de telas para el propósito de mejorar las telas que contienen celulosa de modo que la retirada de la pelusa pueda realizarse de forma eficaz y económica.

5 Los presentes inventores han realizado estudios intensivos y, como resultado, descubrieron que un agente reductor tal como tiosulfato sódico o similares potencian los efectos de endoglucanasas derivadas de Zygomycetes tales como RCE I, MCE I, PCE I, y similares a índices mucho mayores que endoglucanasas conocidas derivadas de Trichoderma y Humicola, y se completó la presente invención.

10 La presente invención se refiere a: Una preparación de celulasa que comprende un agente reductor y una proteína constituida por la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 1, 4, ó 6.

(5) La preparación de celulasa descrita anteriormente contiene del 0,01 al 50% en peso del agente reductor en la preparación de celulasa; preferiblemente el agente reductor es tiosulfato sódico, sulfito sódico, o tiourea; la preparación de celulasa preferiblemente es un gránulo que no tiene capacidad de pulverización o un líquido estabilizado; un asunto adicional de la invención es un procedimiento para tratar tela que contiene celulosa, que comprende la etapa de tratar la tela con la preparación de celulasa descrita en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para mejorar una propiedad de la tela. La mejora de una propiedad de la tela puede ser el aclarado del color, retirada de la pelusa, la adición del aspecto y textura tipo lavado a la piedra, una mejora en el tacto y el aspecto, suavizado de la tela. El procedimiento descrito anteriormente incluye el tratamiento de la tela con la preparación de celulasa remojando o aclarando la tela; un procedimiento de destintado de papel residual, comprende la etapa de tratar el papel residual con la preparación de celulasa descrita en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 junto con un agente de destintado; y un procedimiento para mejorar el refinado de pulpa de papel, comprende la etapa de tratar la pulpa de papel con la preparación de celulasa descrita en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

### Mejor modo de realizar la invención

La presente invención se explicará en detalle a partir de ahora.

#### [1] Preparación de celulasa

La preparación de celulasa de la presente memoria descriptiva comprende uno o más agentes reductores y al menos uno de:

(1a) una endoglucanasa derivada de Zygomycetes;

(1b) una proteína en la que está delecionado un dominio de unión a celulosa en la endoglucanasa derivada de Zygomycetes (1a) [a partir de ahora mencionada a veces como “endoglucanasa CBD delecionada”];

(1c) una proteína modificada de la endoglucanasa derivada de Zygomycetes (1a) o la endoglucanasa CBD delecionada (1b) [a partir de ahora mencionada a veces simplemente como “proteína modificada”]; o

(1d) una proteína homóloga de la endoglucanasa derivada de Zygomycetes (1a) o la endoglucanasa CBD delecionada (1b) [a partir de ahora mencionada simplemente como “proteína homóloga”].

El término “endoglucanasa” como se usa en este documento significa endo-1,4- $\beta$ -glucanasa (EC 3.2.1.4), que tiene la actividad de hidrolizar el enlace  $\beta$ -1,4-glucopiranosilo de  $\beta$ -1,4-glucano.

El término “actividad endoglucanasa” como se usa en este documento significa actividad CMCasa. El término “actividad CMCasa” como se usa en este documento significa actividad hidrolizante de carboximetilcelulosa (CMC; Tokyo Kasei Kogyo Co., Ltd.). Cuando se incuba una solución que contiene una proteína (enzima) a ensayar y CMC durante un periodo predeterminado y se mide la cantidad de azúcar reductor liberada, la cantidad de enzima que produce el azúcar reductor correspondiente a 1  $\mu$ mol de glucosa por minuto se define como 1 unidad de la actividad CMCasa.

La actividad endoglucanasa puede medirse, por ejemplo, por el siguiente procedimiento. Es decir, se añaden 0,5 ml de una solución que contiene una proteína a ensayar a 0,5 ml de solución de CMC al 2% disuelta en 50 mmol/l de tampón acetato-acetato sódico (pH 6,0), y la mezcla se incuba a 50°C durante 30 minutos. Se mide la concentración de azúcar reductor generado en la mezcla de reacción por el procedimiento de ácido 3,5-dinitrosalicílico (procedimiento DNS). Más particularmente, después de la incubación durante 30 minutos, se añaden 3,0 ml de un reactivo DNS a 1,0 ml de la mezcla de reacción, el conjunto se incuba en un baño de agua hirviendo durante 5 minutos y se diluye con 8,0 ml de agua destilada, y se mide la absorbancia a 540 nm. Se traza una curva de calibrado usando soluciones de glucosa preparadas por dilución por etapas, y se determina la cantidad de azúcar reductor generada en la mezcla de reacción enzimática según la de glucosa convertida. La actividad se calcula definiendo la cantidad de enzima que produce el azúcar reductor correspondiente a 1  $\mu$ mol de glucosa por minuto, como 1 unidad.

## ES 2 314 114 T3

El reactivo DNS puede prepararse de acuerdo con las descripciones de referencias tales como Sakuzo Hukui, "Seikagaku Jikken-hou 1, Kangen-Tou no Teiryō-hou (Laboratory Manual for Biological Chemistry, Vol. 1, Assay of Reducing Sugar)", pág. 19-20, Japan Scientific Societies Press, o por el siguiente procedimiento. A 300 ml de una solución acuosa al 4,5% de hidrato sódico, se añaden 880 ml de una solución de ácido 3,5-dinitrosalicílico al 1% y 255 g de sal de Rochelle (Solución A). A 22 ml de una solución acuosa al 10% de hidrato sódico, se añaden 10 g de fenol cristalino, y después se añade agua de modo que se disuelva y se ajusta el volumen a 100 ml (Solución B). Después, se disuelven 6,9 g de hidrogenocarbonato sódico en 69 ml de Solución B, y se vierte Solución A en la misma. El conjunto se mezcla con agitación para disolver la sal de Rochelle, se deja reposar durante 2 días, y después se filtra.

En cuanto a la endoglucanasa derivada de Zygomycetes que puede usarse en la presente invención, puede mencionarse RCE I (SEC ID N° 1), MCE I (SEC ID N° 4), o PCE I (SEC ID N° 6) descritas en el documento WO00/24879.

*Rhizopus oryzae* CP96001, de la que deriva la RCE I mencionada anteriormente, se depositó de forma nacional en el International Patent Organism Depository National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (Dirección: AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-chome Tukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566 Japón) el 21 de abril de 1997, y se transfirió a un depósito internacional el 24 de septiembre de 1999. El número de depósito internacional (un número en paréntesis [] después del número de depósito internacional es un número de depósito nacional) es FERM BP-6889 [FERM P-16201].

*Mucor circinelloides* CP99001, de la que deriva la MCE I mencionada anteriormente, se depositó de forma nacional en el International Patent Organism Depository National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (Dirección: AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-chome Tukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566 Japón) el 2 de julio de 1999, y se transfirió a un depósito internacional el 24 de septiembre de 1999. El número de depósito internacional (un número en paréntesis [] después del número de depósito internacional es un número de depósito nacional) es FERM BP-6890 [FERM P-17446].

*Phycomyces nitens* CP99002, de la que deriva la PCE I mencionada anteriormente, se depositó de forma nacional en el International Patent Organism Depository National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (Dirección: AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-chome Tukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566 Japón) el 2 de julio de 1999, y se transfirió a un depósito internacional el 24 de septiembre de 1999. El número de depósito internacional (un número en paréntesis [] después del número de depósito internacional es un número de depósito nacional) es FERM BP-6891 [FERM P-17447].

Las proteínas que pueden usarse en la preparación de celulasa de la presente invención incluyen RCE I, MCE I, y PCE I.

El término "proteína modificada" como se usa en este documento significa una proteína que muestra la actividad endoglucanasa y que consta de una secuencia de aminoácidos en la que uno o más (por ejemplo, de uno a varias decenas, más particularmente, de 1 a 50, preferiblemente de 1 a 30, más preferiblemente de 1 a 9) aminoácidos están delecionados, sustituidos, insertados, o añadidos en la secuencia de aminoácidos de RCE I, MCE I, o PCE I, o una cualquiera de las endoglucanasas CBD delecionadas de las mismas.

El término "proteína homóloga" como se usa en este documento significa una proteína que muestra actividad endoglucanasa y que tiene una secuencia de aminoácidos codificada por un polinucleótido (secuencia de bases) complementario a un polinucleótido (secuencia de bases) que hibrida en condiciones rigurosas con un polinucleótido (secuencia de bases) que codifica la secuencia de aminoácidos de RCE I, MCE I, o PCE I, o una cualquiera de las endoglucanasas CBD delecionadas de las mismas. El término "polinucleótido" como se usa en este documento incluye ADN y ARN, y es preferible ADN.

El término "condiciones rigurosas" como se usa en este documento significa condiciones en las que una sonda que comprende una secuencia de bases que codifica una secuencia parcial o de longitud completa de

(a) la secuencia de aminoácidos de RCE I, MCE I, o PCE I;

(b) la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las endoglucanasas CBD delecionadas de las mismas; o

(c) una cualquiera de las proteínas modificadas de las mismas hibrida con un polinucleótido que codifica una proteína homóloga, y la sonda no hibrida con el gen de la endoglucanasa NCE 4 (SEC ID N° 7) descrito en el documento WO98/03640 y el gen de la endoglucanasa SCE 3 (SEC ID N° 8) descrito en el documento WO98/54322. A este respecto, debe observarse que la cantidad de cada gen o polinucleótido usada en este documento es equivalente a la cantidad de cada uno del gen NCE 4, el gen SCE 3, y el polinucleótido que codifica una proteína homóloga.

Más particularmente, significa condiciones en las que, por ejemplo, usando como sonda una secuencia de ADN de longitud completa marcada que codifica la secuencia de aminoácidos de RCE I, se realiza pre-hibridación a 42°C durante 1 hora de acuerdo con el protocolo adjunto al sistema de marcaje de ARN/ADN directo y detección ECL (Amersham), después la sonda anterior se añade a la misma seguido de hibridación a 42°C durante 15 horas, y después de ello, el producto resultante se lava dos veces con 0,5 x SSC (1 x SSC; 15 mmol/l de citrato trisódico, 150 mmol/l

## ES 2 314 114 T3

de cloruro sódico) que contiene SDS al 0,4% y 6 mol/l de urea a 42°C durante 20 minutos, y finalmente seguido de lavado del producto dos veces con 5 x SSC a temperatura ambiente durante 10 minutos.

5 El “polinucleótido (secuencia de bases) que codifica la secuencia de aminoácidos de RCE I, MCE I, o PCE I” mencionado anteriormente incluye un polinucleótido en que está optimizado el uso de codones y/o una secuencia de reconocimiento de intrones de acuerdo con el tipo de célula huésped usada para la transformación, tal como el gen de endoglucanasa RCE I de codones optimizados (SEC ID N° 9) descrito en el documento WO00/24879.

10 En cuanto a la proteína modificada u homóloga, puede mencionarse, por ejemplo, una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene preferiblemente una homología del 80% o más, más preferiblemente una homología del 90% o más, adicionalmente más preferiblemente una homología del 95% o más, mucho más preferiblemente una homología del 98% o más, con la de RCE I, MCE I, o PCE I, o una cualquiera de las endoglucanasas CBD delecionadas de las mismas. A este respecto, los valores anteriores de homología pueden ser valores calculados usando un programa conocido para búsqueda de homología, preferiblemente valores calculados usando FASTA3 [Science, 227, 15 1435-1441 (1985); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 2444-2448 (1988); <http://www.ddbj.nig.ac.jp/E-mail/homology-j.htm>] de acuerdo con parámetros por defecto.

20 El “agente reductor”, que está contenido en la preparación de celulasa de la presente invención, significa una sustancia que tiene actividad para reducir una molécula aceptando electrones de la molécula, oxidándose ella misma de este modo. Se sabe que dichos agentes reductores muestran actividad para reducir y retirar el cloro restante o similares en agua corriente. En cuanto al agente reductor usado en la presente invención, es preferible un agente reductor inorgánico, y no puede usarse una sustancia que inhiba la actividad enzimática. Ejemplos de los mismos incluyen ácido sulfuroso, ácido disulfuroso, y ácido tiosulfúrico, y sales de los mismos, y tiourea. Los agentes reductores pueden usarse solos o en una combinación de los mismos.

25 La preparación de celulasa de la presente invención puede comprender componentes que están contenidos convencionalmente en preparaciones de celulasa tales como excipientes y/o conservantes. La forma de la preparación de celulasa puede ser sólida o líquida. Ejemplos de formas incluyen formulación en polvo, particulada, en gránulo, en gránulo no pulverizante y líquida.

30 El gránulo no pulverizante (preferiblemente un gránulo que no tiene capacidad de pulverización) que es una forma de preparación de celulasa, puede producirse de acuerdo con el procedimiento de granulación en seco común. Es decir, se mezcla enzima celulasa en polvo con una o más sustancias seleccionadas entre el grupo que comprende sales inorgánicas tales como sulfato sódico o cloruro sódico que son neutras y no tienen efecto sobre la actividad endoglucanasa; minerales tales como bentonita o montmorilonita que no tienen efecto sobre la actividad endoglucanasa; 35 sustancias orgánicas neutras tales como almidón o celulosa en polvo; y tensioactivos. Por lo tanto, los polvos o la suspensión finamente suspendida de uno o más agentes reductores que mejora los efectos de endoglucanasa se añaden a la mezcla, y después el producto obtenido se mezcla completamente o se amasa.

40 Dependiendo de la situación, opcionalmente se añade un polímero sintético tal como polietilenglicol o un polímero natural tal como almidón, que se une a sólidos, a la mezcla y se amasa adicionalmente. Por lo tanto, la granulación se realiza por moldeo por extrusión, usando, por ejemplo, un sedimentador de disco, y el material moldeado obtenido después se convierte en una forma esférica usando un marumerizer seguido de secado, de modo que pueden producirse gránulos no pulverizantes. Naturalmente, también es posible revestir la superficie de los gránulos con un polímero o 45 similares para controlar la filtración de oxígeno o agua. En este caso, pueden añadirse uno o más agentes reductores que mejoran el efecto de endoglucanasa a la preparación de celulasa a una proporción del 0,01 al 50% en peso, preferiblemente del 0,1 al 20% en peso, más preferiblemente del 0,1 al 10% en peso.

50 Además, la preparación líquida (preferiblemente líquido estabilizado) puede prepararse mezclando un estabilizador de endoglucanasa tal como un polímero sintético o natural con una solución de enzima celulasa y, si es necesario, añadiendo sales inorgánicas y/o un conservante sintético. En este caso, puede añadirse uno o más agentes reductores que mejoren el efecto de la endoglucanasa. Similar al caso del gránulo no pulverizante, puede añadirse uno o más agentes reductores que mejoren el efecto de la endoglucanasa a la preparación de celulasa a una proporción del 0,01 al 50% en peso, preferiblemente del 0,1 al 20% en peso, más preferiblemente del 0,1 al 10% en peso.

### 55 [2] Procedimiento para tratar telas

El procedimiento para tratar telas de acuerdo con la presente invención comprende la etapa de:

60 tratar la tela que contiene celulosa con la preparación de celulasa mencionada anteriormente.

Las siguientes propiedades de la tela que contiene celulosa pueden mejorarse por el presente procedimiento de tratamiento:

65 (1) Aclarado del color de tela que contiene celulosa coloreada;

(2) Retirada de la pelusa (reducción del índice de formación de pelusas, y reducción de la pelusa);

## ES 2 314 114 T3

(3) Provisión de variación localizada de color a tela que contiene celulosa coloreada, es decir, provisión de un aspecto y textura tipo lavado a la piedra a tela que contiene celulosa coloreada, típicamente vaqueros;

(4) Mejora del tacto y el aspecto de la tela reduciendo el peso; y

(5) Suavizado de la tela (reducción de la rigidez).

Más particularmente, el procedimiento para tratar telas de acuerdo con la presente invención puede realizarse añadiendo la preparación de celulosa de la presente invención en agua en que se remoja o remojará la tela, por ejemplo, durante el remojado o aclarado de la tela.

Las condiciones tales como temperatura de contacto o la cantidad de endoglucanasa pueden determinarse apropiadamente de acuerdo con otras condiciones diversas. Por ejemplo, cuando se reduce el índice de formación de pelusa o se reducen la pelusa de la tela que contiene celulosa, la tela puede tratarse a una temperatura de aproximadamente 30 a 60°C, usando 0,2 µg/ml o más de agentes reductores y endoglucanasas en una concentración proteica de 0,001 a 20 mg/l. Puede añadirse uno o más agentes reductores, teniendo en consideración los efectos económicos, siempre que la cantidad del mismo sea de 0,2 µg/ml o más y el agente reductor no inhiba la actividad enzimática. Preferiblemente puede usarse de 0,2 a 500 µg/ml, más preferiblemente de 0,3 a 150 µg/ml del mismo.

Cuando se proporciona una variación localizada de color a la tela que contiene celulosa coloreada, la tela puede tratarse a una temperatura de aproximadamente 40 a 60°C, usando 0,2 µg/ml o más de agentes reductores y endoglucanasas en una concentración proteica de 0,01 a 100 mg/l. Puede añadirse uno o más agentes reductores, teniendo en consideración los efectos económicos, siempre que la cantidad del mismo sea de 0,2 µg/ml o más y el agente reductor no inhiba la actividad enzimática. Preferiblemente puede usarse de 0,2 a 500 µg/ml, más preferiblemente de 0,3 a 150 µg/ml del mismo.

En un procesamiento para reducir el peso para mejorar el tacto y el aspecto de la tela que contiene celulosa, la tela puede tratarse a una temperatura de aproximadamente 30 a 60°C, usando 0,2 µg/ml o más de agentes reductores y endoglucanasas en una concentración proteica de 0,001 a 100 mg/l. Puede añadirse uno o más agentes reductores, teniendo en consideración los efectos económicos, siempre que la cantidad del mismo sea de 0,2 µg/ml o más y el agente reductor no inhiba la actividad enzimática. Preferiblemente puede usarse de 0,2 a 500 µg/ml, más preferiblemente de 0,3 a 150 µg/ml del mismo.

La concentración proteica de cada tipo de endoglucanasa puede calcularse, por ejemplo, por análisis de HPLC usando una columna TSKgel TMS-250 (4,6 mm D.I. x 7,5 cm) (TOSOH Corporation). El análisis de HPLC implica cargar acetonitrilo en TFA (ácido trifluoroacético) al 0,05% con un gradiente de concentración lineal del 0% al 80% a un caudal de 1,0 ml/min para eluir cada tipo de endoglucanasa, y calculando la concentración proteica a partir del área del pico a UV 280 nm. Por ejemplo, una NCE4 purificada, cuya concentración proteica se determina previamente por un Protein Assay Kit (BioRad Laboratories), se somete al análisis de HPLC del mismo modo que anteriormente, de modo que puede usarse como patrón. La NCE4 purificada puede obtenerse, por ejemplo, cultivando *Humicola insolens* MN200-1 y purificándola del cultivo, de acuerdo con el procedimiento descrito en el documento WO98/03640. Como patrón para la determinación de la concentración proteica en el Protein Assay Kit, por ejemplo, puede usarse Patrón de Albúmina (albúmina de suero bovino, fracción V; PIERCE).

### [3] Procedimiento para destintar papel residual

El procedimiento para destintar papel residual de acuerdo con la presente invención comprende la etapa de:

tratar el papel residual con la preparación de celulosa mencionada anteriormente junto con un agente de destintado.

Más particularmente, el presente procedimiento puede realizarse tratando papel residual con la preparación de celulosa de la presente invención junto con un agente de destintado, en una etapa de destintado en un procedimiento para producir papel reciclado a partir de papel residual. El presente procedimiento posibilita destintar papel residual, y por tanto puede mejorarse la blancura del papel residual. El papel residual que puede tratarse por el presente procedimiento incluye todos los tipos de papel residual común, por ejemplo, periódicos usados, papel de revistas usadas, y papel usado impreso de bajo a medio grado que comprende pulpa mecánica y pulpa química; papel sin madera usado que comprende pulpa química; y papel residual impreso de los mismos tal como papel de revestimiento. El agente de destintado significa un agente habitualmente usado en el destintado de papel residual. Los ejemplos de agente de destintado incluyen cloruro sódico, bases tales como carbonato sódico, silicato sódico, peróxido de hidrógeno, fosfatos, tensioactivos aniónicos o no iónicos, eliminadores tales como ácido oleico, y agentes auxiliares tales como un estabilizador del pH, un agente quelante, o un agente dispersante.

### [4] Procedimiento para mejorar el refino de pulpa de papel

El procedimiento para mejorar el refino de pulpa de papel de acuerdo con la presente invención comprende la etapa de:

tratar el pulpa de papel con la preparación de celulosa mencionada anteriormente.

Más particularmente, el presente procedimiento puede realizarse tratando pulpa de papel con la preparación de celulosa de la presente invención. Los ejemplos de pulpa de papel que pueden tratarse por el presente procedimiento incluyen pulpa de papel residual, pulpa de cartón reciclado, pulpa kraft, pulpa de sulfito, pulpa de tratamiento termomecánico, y otra pulpa de elevado rendimiento.

## Ejemplos

La presente invención se ilustrará ahora adicionalmente por, aunque de ningún modo de forma limitante, los siguientes Ejemplos.

### Ejemplo 1

*Comparación entre proporciones de mejora de actividades de retirada de la pelusa de diversos tipos de celulosas por la adición de agente reductor*

El cultivo de *Rhizopus oryzae*, *Mucor circinelloides*, y *Phycomyces nitens*, y la purificación de las endoglucanasas RCE I, MCE I, y PCE I a partir de los cultivos se realizaron por el procedimiento descrito en el documento WO00/24879.

El cultivo de *Humicola insolens* MN200-1 y la purificación de la endoglucanasa NCE4 a partir del cultivo se realizaron por el procedimiento descrito en el documento WO98/03640. La cepa se depositó de forma nacional en el International Patent Organism Depository National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (Dirección: AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-chome Tukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566 Japón) el 15 de julio de 1996, y se transfirió a un depósito internacional el 13 de junio de 1997. El número de depósito internacional (un número en paréntesis [] después del número de depósito internacional es un número de depósito nacional) es FERM BP-5977 [FERM P-15736].

El cultivo de *Trichoderma viride* MC300-1 se realizó por el procedimiento descrito en el documento WO98/54332. La cepa se depositó de forma nacional en el International Patent Organism Depository National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (Dirección: AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-chome Tukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566, Japón) el 9 de septiembre de 1996, y se transfirió a un depósito internacional el 11 de agosto de 1997. El número de depósito internacional (un número en paréntesis [] después del número de depósito internacional es un número de depósito nacional) es FERM BP-6047 [FERM P-15842].

El tratamiento de retirada de la pelusa de una tela de tricotado de algodón con pelusa formada en una lavadora grande (una tela de 6 cm x 8 cm de Cotton Smooth Knit N° 3900, Nitto Boseki Co., Ltd. teñida de marrón por tinción reactiva en Tsuyatomo-Senko) se realizó usando cada uno de los sobrenadantes de cultivo obtenidos en las siguientes condiciones:

#### Condiciones de Ensayo

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

Temperatura: 58°C (solamente el sobrenadante de cultivo de *Trichoderma viride*); 40°C (todas las demás soluciones enzimáticas)

Tiempo: 120 minutos

Cantidad de solución de reacción: 100 ml

pH de reacción: pH 4,5 (5 mmol/l de tampón acetato) (solamente el sobrenadante de cultivo de *Trichoderma viride*; pH 7,0 (5 mmol/l de tampón fosfato) (todas las demás soluciones enzimáticas). Todos los tampones se prepararon usando agua corriente.

Tipo y cantidad de agente reductor: 1,2 µg/ml de tiosulfato sódico pentahidrato (Wako Pure Chemical Industries, Co., Ltd.)

A cada una de las soluciones de tratamiento, se añadieron cuatro bolas de goma de aproximadamente 16 g junto con cada solución enzimática.

La cantidad de solución enzimática necesaria para retirar aproximadamente el 50% de la pelusa formada en base a evaluación visual se determinó en cada uno de los dos casos de adición y no adición del agente reductor. Por lo tanto, se obtuvo un valor dividiendo la cantidad de la solución enzimática necesaria para retirar aproximadamente el 50% de la pelusa cuando no se añade el agente reductor por la cantidad cuando se añade el agente reductor, y el valor obtenido se definió como una proporción de mejora de la actividad de retirada de la pelusa por la adición del agente reductor. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

TABLA 1

Soluciones enzimáticas	Proporción de mejora de la actividad de retirada de la pelusa por la adición de agente reductor (factor)
sobrenadante de cultivo de <i>Humicola insolens</i>	1,2
sobrenadante de cultivo de <i>Trichoderma viride</i>	1,1
NCE 4 purificada	1,2
RCE I purificada	5,0
MCE I purificada	3,5
PCE I purificada	2,5

A partir de los resultados de la Tabla 1, se halla que la actividad de retirada de la pelusa de RCE I, MCE I, y PCE I, que son endoglucanasas derivadas de Zygomycetes, se mejora por la adición del agente reductor a un nivel mucho mayor que los sobrenadantes de cultivo (es decir, celulasa) derivados de *Humicola insolens* y *Trichoderma viride*.

#### Ejemplo 2

*Mejora del efecto de la actividad de retirada de la pelusa de RCE I expresada en Humicola por la adición de diversos agentes reductores*

La endoglucanasa RCE I se expresó en *Humicola insolens* de acuerdo con el procedimiento descrito en los Ejemplos D3 y D4 del documento WO00/24879. El tratamiento de retirada de la pelusa de una tela de tricotado de algodón con pelusa formada en una lavadora grande (una tela de 6 cm x 8 cm de Cotton Smooth Knit N° 3900, Nitto Boseki Co., Ltd. teñida de marrón por tinción reactiva en Tsuyatomo-Senko) se realizó usando el sobrenadante de cultivo obtenido en las siguientes condiciones:

40

#### Condiciones de Ensayo

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

45

Temperatura: 40°C

Tiempo: 120 minutos

50

Cantidad de solución de reacción: 100 ml

pH de reacción: pH 7,0 (5 mmol/l de tampón fosfato; preparado usando agua corriente)

Cantidad de agente reductor: 1,2 µg/ml

55

Tipo de agente reductor: tiosulfato sódico pentahidrato (Wako Pure Chemical Industries, Co., Ltd.); sulfito sódico (anhídrido) (Wako Pure Chemical Industries, Co., Ltd.); y tiourea (Kanto Kagaku, Co., Ltd.).

A cada una de las soluciones de tratamiento, se añadieron cuatro bolas de goma de aproximadamente 16 g junto con la solución enzimática.

60

La cantidad de la solución enzimática necesaria para retirar aproximadamente el 50% de la pelusa formada en base a evaluación visual se determinó en cada uno de los dos casos de adición y no adición de los diversos agentes reductores. Por lo tanto, se obtuvo un valor dividiendo la cantidad de la solución enzimática necesaria para retirar aproximadamente el 50% de la pelusa cuando no se añade el agente reductor por la cantidad cuando se añade cada uno de los diversos agentes reductores, y el valor obtenido se definió como una proporción de mejora de la actividad de retirada de la pelusa por la adición de cada uno de los diversos agentes reductores. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

65

## ES 2 314 114 T3

TABLA 2

Agentes reductores	Proporción de mejora de la actividad de retirada de la pelusa por la adición de agente reductor (factor)
Tiosulfato sódico pentahidrato	5,0
Sulfito sódico (anhídrido)	5,0
Tiourea	5,0

A partir de los resultados de la Tabla 2, se halla que la actividad de retirada de la pelusa del sobrenadante de cultivo obtenido expresando y secretando RCE I en *Humicola insolens* se mejoraba por cualquiera de los anteriores agentes reductores.

### Ejemplo 3

*Efecto de mejora de la actividad de retirada de la pelusa de RCE I expresada en Humicola por la adición de agente reductor con diversas concentraciones*

La endoglucanasa RCE I se expresó en *Humicola insolens* de acuerdo con el procedimiento descrito en los Ejemplos D3 y D4 del documento WO00/24879. El tratamiento de retirada de la pelusa de una tela de tricotado de algodón con pelusa formada en una lavadora grande (una tela de 6 cm x 8 cm de Cotton Smooth Knit N° 3900, Nitto Boseki Co., Ltd. teñida de marrón por tinción reactiva en Tsuyatomo-Senko) se realizó usando el sobrenadante de cultivo obtenido en las siguientes condiciones:

#### *Condiciones de Ensayo*

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

Temperatura: 40°C

Tiempo: 120 minutos

Cantidad de solución de reacción: 100 ml

pH de reacción: pH 7,0 (5 mmol/l de tampón fosfato; preparado usando agua corriente)

Tipo de agente reductor: tiosulfato sódico pentahidrato (Wako Pure Chemical Industries, Co., Ltd.)

Cantidad de agente reductor: de 0,15 a 150 µg/ml

A cada una de las soluciones de tratamiento, se añadieron cuatro bolas de goma de aproximadamente 16 g junto con la solución enzimática.

La cantidad de la solución enzimática necesaria para retirar aproximadamente el 50% de la pelusa formada en base a evaluación visual se determinó en cada uno de los casos de adición de diversas concentraciones del agente reductor. Por lo tanto, se obtuvo un valor dividiendo la cantidad de la solución enzimática necesaria para retirar aproximadamente el 50% de la pelusa cuando no se añade el agente reductor por la cantidad cuando se añade cada una de las diversas concentraciones del agente reductor, y el valor obtenido se definió como una proporción de mejora de la actividad de retirada de la pelusa por la adición de cada una de las diversas concentraciones del agente reductor. Los resultados se muestran en la Tabla 3.

## ES 2 314 114 T3

TABLA 3

Cantidad de agente reductor ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	Proporción de mejora de la actividad de retirada de la pelusa por la adición de agente reductor (factor)
0,15	1,0
0,3	2,5
0,6	4,5
0,9	5,0
1,2	5,0
1,8	4,5
3,0	4,5
6,0	4,5
15,0	4,5
30,0	4,5
60,0	4,0
150,0	4,0

A partir de los resultados de la Tabla 3, se halla que la actividad de retirada de la pelusa del sobrenadante de cultivo obtenido expresando y secretando RCE I en *Humicola insolens* se mejoró por la adición del agente reductor que tiene un amplio intervalo de concentración de 0,3  $\mu\text{g}/\text{ml}$  a 150  $\mu\text{g}/\text{ml}$  o más.

### Ejemplo 4

#### Producción de preparación de celulasa RCE I que comprende agente reductor

Después de mezclar las siguientes materias prima mezclando las proporciones descritas en la Tabla 4, se añadió una cantidad apropiada de agua a las mismos, y se amasó la mezcla. El producto obtenido se sometió a un sedimentador de disco para el moldeo, y el producto obtenido por moldeo por inyección se convirtió en una forma de partícula usando un marumerizer (Fuji Paudal Co., Ltd.) seguido de secado y tamizado del producto para obtener un producto granulado.

TABLA 4

Materias prima	Proporción de mezcla (%)
Tiosulfato sódico	1
S-220 (tensioactivo no iónico fabricado por NOF Corporation)	10
Producto en polvo de celulasa RCE I	5
Cloruro de magnesio	0,5
Fosfato monopotásico (Wako Pure Chemical Industries, Co., Ltd.)	2
Fosfato dipotásico (Wako Pure Chemical Industries, Co., Ltd.)	1
Almidón de maíz (Shikishima Starch Co.)	80,5

## ES 2 314 114 T3

El producto en polvo de celulasa RCE I se preparó concentrando el sobrenadante de cultivo de RCE I expresado en *Humicola insolens* usando ultrafiltración, de acuerdo con el procedimiento descrito en los Ejemplos D3 y D4 del documento WO00/24879, seguido de secado por pulverización.

5

### **Aplicabilidad industrial**

La presente invención proporciona una preparación de celulasa que tiene una actividad endoglucanasa derivada de Zygomycetes drásticamente mejorada añadiendo un agente reductor en la preparación. Cuando la preparación de celulasa se usa en el tratamiento de telas (tal como la reducción de la pelusa de tela que contiene celulosa, la mejora del tacto y el aspecto, el aclarado del color, variación localizada de color, o suavizado), el destintado de papel residual, o el procesamiento para mejorar el refino de pulpa de papel, cada uno de los anteriores tratamientos puede realizarse con una cantidad menor de enzima, reduciendo de este modo de forma significativa los costes.

15

### **Texto libre de la lista de secuencias**

Las características de “Secuencia Artificial” se describen en el identificador numérico <223> en la Lista de Secuencias. Más particularmente, la secuencia de bases de la SEC ID N° 9 es una secuencia de codones optimizados correspondiente a la proteína RCE I (SEC ID N° 1).

25

30

35

40

45

50

55

60

65

# ES 2 314 114 T3

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Una preparación de celulasa que comprende un agente reductor y una proteína que consta de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 1, 4, ó 6.
2. La preparación de celulasa de acuerdo con la reivindicación 1, que contiene del 0,01 al 50% en peso del agente reductor en la preparación de celulasa.
- 10 3. La preparación de celulasa de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en la que el agente reductor es tiosulfato sódico, sulfito sódico, o tiourea.
4. La preparación de celulasa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que es un gránulo o líquido estabilizado.
- 15 5. Un procedimiento para tratar telas que contienen celulosa, que comprende la etapa de tratar la tela con la preparación de celulasa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para mejorar una propiedad de la tela.
- 20 6. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la mejora de la propiedad de la tela es el aclarado del color.
7. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la mejora de la propiedad de la tela es la retirada de la pelusa.
- 25 8. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la mejora de la propiedad de la tela es la adición de un aspecto y textura tipo lavado a la piedra.
9. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la mejora de la propiedad de la tela es la mejora del tacto y el aspecto.
- 30 10. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la mejora de la propiedad de la tela es el suavizado de la tela.
- 35 11. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 10, en el que el tratamiento de la tela con la preparación de celulasa se realiza remojando o aclarando la tela.
- 40 12. Un procedimiento para destintar papel residual, que comprende la etapa de tratar el papel residual con la preparación de celulasa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 junto con un agente de destintado.
- 45 13. Un procedimiento para mejorar el refino de pulpa de papel, que comprende la etapa de tratar la pulpa de papel con la preparación de celulasa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
- 50
- 55
- 60
- 65

# ES 2 314 114 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> MEIJI SEIKA KAISHA, LTD.

5 <120> Preparaciones de celulasa que contienen agente reductor y procedimiento para tratar telas

<130> MEJ-682

10 <150> JP 2001-384037

<151> 18-12-2001

<160> 9

15

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

20 <211> 338

<212> PRT

<213> *Rhizopus oryzae* CP96001

25 <220>

<221> sig\_peptide

<222> (-23) .. (-1)

30

<220>

<221> mat\_peptide

<222> (1) .. (315)

35

<400> 1

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

45 Gly Thr Glu Met Ala Ser Ala Ala Glu Cys Ser Lys Leu Tyr Gly Gln  
-5 1 5

50 Cys Gly Gly Lys Asn Trp Asn Gly Pro Thr Cys Cys Glu Ser Gly Ser  
10 15 20 25

55 Thr Cys Lys Val Ser Asn Asp Tyr Tyr Ser Gln Cys Leu Pro Ser Gly  
30 35 40

60 Ser Ser Gly Asn Lys Ser Ser Glu Ser Ala His Lys Lys Thr Thr Thr  
45 50 55

65

ES 2 314 114 T3

5 Ala Ala His Lys Lys Thr Thr Thr Ala Ala His Lys Lys Thr Thr Thr  
60 65 70

10 Ala Pro Ala Lys Lys Thr Thr Thr Val Ala Lys Ala Ser Thr Pro Ser  
75 80 85

15 Asn Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Lys Tyr Ser Ala Val Ser Gly Gly  
90 95 100 105

20 Ala Ser Gly Asn Gly Val Thr Thr Arg Tyr Trp Asp Cys Cys Lys Ala  
110 115 120

25 Ser Cys Ser Trp Pro Gly Lys Ala Asn Val Ser Ser Pro Val Lys Ser  
125 130 135

30 Cys Asn Lys Asp Gly Val Thr Ala Leu Ser Asp Ser Asn Ala Gln Ser  
140 145 150

35 Gly Cys Asn Gly Gly Asn Ser Tyr Met Cys Asn Asp Asn Gln Pro Trp  
155 160 165

40 Ala Val Asn Asp Asn Leu Ala Tyr Gly Phe Ala Ala Ala Ala Ile Ser  
170 175 180 185

45 Gly Gly Gly Glu Ser Arg Trp Cys Cys Ser Cys Phe Glu Leu Thr Phe  
190 195 200

50 Thr Ser Thr Ser Val Ala Gly Lys Lys Met Val Val Gln Val Thr Asn  
205 210 215

55 Thr Gly Gly Asp Leu Gly Ser Ser Thr Gly Ala His Phe Asp Leu Gln  
220 225 230

60 Met Pro Gly Gly Gly Val Gly Ile Phe Asn Gly Cys Ser Ser Gln Trp  
235 240 245

65 Gly Ala Pro Asn Asp Gly Trp Gly Ser Arg Tyr Gly Gly Ile Ser Ser  
250 255 260 265

Ala Ser Asp Cys Ser Ser Leu Pro Ser Ala Leu Gln Ala Gly Cys Lys  
270 275 280

Trp Arg Phe Asn Trp Phe Lys Asn Ala Asp Asn Pro Ser Met Thr Tyr

ES 2 314 114 T3

		285						290						295			
5	Lys	Glu	Val	Thr	Cys	Pro	Lys	Glu	Ile	Thr	Ala	Lys	Thr	Gly	Cys	Ser	
			300					305						310			
10	Arg	Lys															
	<210>	2															
15	<211>	366															
	<212>	PRT															
	<213>	<i>Rhizopus oryzae</i>	CP96001														
20	<220>																
	<221>	sig_peptide															
	<222>	(-23) .. (-1)															
25	<220>																
	<221>	mat_peptide															
	<222>	(1) .. (343)															
30	<400>	2															
	Met	Lys	Phe	Ile	Thr	Ile	Thr	Ser	Ser	Ala	Leu	Leu	Ala	Leu	Ala	Leu	
35				-20				-15						-10			
	Gly	Thr	Glu	Met	Ala	Ser	Ala	Ala	Lys	Cys	Ser	Lys	Leu	Tyr	Gly	Gln	
40			-5					1				5					
	Cys	Gly	Gly	Lys	Asp	Trp	Asn	Gly	Pro	Thr	Cys	Cys	Glu	Ser	Gly	Ser	
45	10					15					20					25	
	Thr	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Asp	Tyr	Tyr	Ser	Gln	Cys	Leu	Ala	Pro	Glu	
50					30					35						40	
	Ser	Asn	Gly	Asn	Lys	Ser	Ser	Glu	Cys	Ser	Lys	Leu	Tyr	Gly	Gln	Cys	
55				45					50						55		
	Gly	Gly	Lys	Asp	Trp	Asn	Gly	Pro	Thr	Cys	Cys	Glu	Ser	Gly	Ser	Thr	
60			60					65					70				
	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Asp	Tyr	Tyr	Ser	Gln	Cys	Leu	Ala	Pro	Glu	Ser	
65		75					80					85					

ES 2 314 114 T3

Asn Gly Asn Lys Thr Ser Glu Ser Ala His Lys Thr Thr Thr Thr Thr  
 90 95 100 105  
 5 Ala Pro Ala Lys Glu Ile Thr Thr Thr Ala Lys Ala Ser Asn Ser Ser  
 110 115 120  
 10 Asn Ser Ser Gly Lys Tyr Ser Ile Val Ser Gly Gly Ala Ser Gly Asn  
 125 130 135  
 15 Gly Val Thr Thr Arg Tyr Trp Asp Cys Cys Lys Ala Ser Cys Ser Trp  
 140 145 150  
 20 Pro Gly Lys Ala Asn Val Ser Ser Pro Val Lys Ser Cys Asn Lys Asp  
 155 160 165  
 25 Gly Val Thr Ala Leu Ser Asp Ser Asn Val Gln Ser Gly Cys Asn Gly  
 170 175 180  
 30 Gly Asn Ser Tyr Met Cys Asn Asp Asn Gln Pro Trp Ala Val Asn Asp  
 190 195 200  
 35 Asn Leu Ala Tyr Gly Phe Ala Ala Ala Ala Ile Ser Gly Gly Gly Glu  
 205 210 215  
 40 Ser Arg Trp Cys Cys Ser Cys Phe Glu Leu Thr Phe Thr Ser Thr Ser  
 220 225 230  
 45 Val Ala Gly Lys Lys Met Val Ile Gln Val Thr Asn Thr Gly Gly Asp  
 235 240 245  
 50 Leu Gly Ser Ser Thr Gly Ala His Phe Asp Leu Gln Met Pro Gly Gly  
 250 255 260 265  
 55 Gly Val Gly Ile Phe Asn Gly Cys Ser Lys Gln Trp Gly Ala Pro Asn  
 270 275 280  
 60 Asp Gly Trp Gly Ser Arg Tyr Gly Gly Ile Ser Ser Ala Ser Asp Cys  
 285 290 295  
 65 Ser Ser Leu Pro Ser Ala Leu Gln Ala Gly Cys Lys Trp Arg Phe Asn  
 300 305 310  
 Trp Phe Lys Asn Ala Asp Asn Pro Ser Met Thr Tyr Lys Glu Val Thr  
 315 320 325  
 Cys Pro Lys Glu Ile Thr Ala Lys Thr Gly Cys Ser Arg Lys  
 330 335 340

ES 2 314 114 T3

<210> 3

<211> 360

<212> PRT

5 <213> *Rhizopus oryzae* CP96001

<220>

<221> sig\_peptide

10 <222> (-23) .. (-1)

<220>

<221> mat\_peptide

15 <222> (1) .. (337)

<400> 3

20

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

25

Gly Thr Glu Met Ala His Ala Ala Glu Cys Ser Lys Ala Tyr Tyr Gln  
                                   -5                                  1                                  5

30

Cys Gly Gly Lys Asn Trp Asp Gly Pro Thr Cys Cys Glu Ser Gly Ser  
   10                                  15                                  20                                  25

35

Thr Cys Val Asp Tyr Pro Asp Asn Pro Phe Tyr Ser Gln Cys Val Pro  
                                   30                                  35                                  40

40

Asn Glu Asn Leu Thr Ser Thr Asn Lys Ser Ser His Lys Thr Thr Thr  
                                   45                                  50                                  55

45

Thr Glu Ser Ala Lys Lys Thr Thr Thr Thr Lys Gly Ser Lys Lys Thr  
                                   60                                  65                                  70

50

Thr Thr Thr Glu Ala Ser Lys Lys Thr Thr Thr Thr Thr Glu Ala Ser Lys  
                                   75                                  80                                  85

55

Lys Thr Thr Thr Thr Glu Ala Ser Lys Lys Thr Thr Thr Thr Thr Lys  
   90                                  95                                  100                                  105

60

Lys Ala Ser Thr Ser Thr Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ala Ser Thr Asn

65

ES 2 314 114 T3

				110					115					120			
5	Tyr	Ser	Ala	Val	Ser	Gly	Gly	Ala	Ser	Gly	Asn	Gly	Glu	Thr	Thr	Arg	
				125					130					135			
10	Tyr	Trp	Asp	Cys	Cys	Lys	Pro	Ser	Cys	Ser	Trp	Pro	Gly	Lys	Ala	Asp	
			140					145					150				
15	Val	Thr	Ser	Pro	Val	Gly	Ser	Cys	Asn	Lys	Asp	Gly	Lys	Thr	Leu	Ala	
		155				160						165					
20	Asp	Asn	Asn	Thr	Gln	Asn	Gly	Cys	Val	Gly	Gly	Ser	Ser	Tyr	Thr	Cys	
	170				175						180					185	
25	Asn	Asp	Asn	Gln	Pro	Trp	Val	Val	Ser	Asp	Asp	Leu	Ala	Tyr	Gly	Phe	
				190						195					200		
30	Ala	Ala	Ala	Ser	Ile	Ser	Gly	Gly	Ser	Glu	Ala	Thr	Trp	Cys	Cys	Ala	
			205						210					215			
35	Val	Val	Gln	Val	Thr	Asn	Thr	Gly	Ser	Asp	Leu	Gly	Ser	Asn	Thr	Gly	
		235				240						245					
40	Ala	His	Phe	Asp	Leu	Gln	Met	Pro	Gly	Gly	Gly	Val	Gly	Ile	Tyr	Asn	
	250					255					260					265	
45	Gly	Cys	Ala	Thr	Gln	Trp	Gly	Ala	Pro	Thr	Asp	Gly	Trp	Gly	Ala	Arg	
				270						275					280		
50	Tyr	Gly	Gly	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Asp	Cys	Ser	Asn	Leu	Pro	Ser	Ala	
			285						290					295			
55	Leu	Gln	Ala	Gly	Cys	Lys	Trp	Arg	Phe	Gly	Trp	Phe	Lys	Asn	Ala	Asp	
			300					305					310				
60	Asn	Pro	Thr	Met	Thr	Tyr	Lys	Gln	Val	Thr	Cys	Pro	Lys	Ala	Ile	Thr	
		315					320					325					
65	Ala	Lys	Ser	Gly	Cys	Ser	Arg	Lys									
	330					335											

<210> 4

65 <211> 338

<212> PRT

<213> *Mucor circinelloides* CP99001

ES 2 314 114 T3

<220>

<221> sig\_peptide

<222> (-22) .. (-1)

5

<220>

<221> mat\_peptide

<222> (1) .. (316)

10

<400> 4

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

20 Ser Ser Ser Ala Glu Ala Ala Ser Cys Ser Ser Val Tyr Gly Gln Cys  
-5 1 5 10

25 Gly Gly Ile Gly Trp Ser Gly Pro Thr Cys Cys Glu Ser Gly Ser Thr  
15 20 25

30 Cys Val Ala Gln Glu Gly Asn Lys Tyr Tyr Ser Gln Cys Leu Pro Gly  
30 35 40

35 Ser His Ser Asn Asn Ala Gly Asn Ala Ser Ser Thr Lys Lys Thr Ser  
45 50 55

40 Thr Lys Thr Ser Thr Thr Thr Ala Lys Ala Thr Ala Thr Val Thr Thr  
60 65 70

45 Lys Thr Val Thr Lys Thr Thr Thr Lys Thr Thr Thr Lys Thr Ser Thr  
75 80 85 90

50 Thr Ala Ala Ala Ser Thr Ser Thr Ser Ser Ser Ala Gly Tyr Lys Val  
95 100 105

55 Ile Ser Gly Gly Lys Ser Gly Ser Gly Ser Thr Thr Arg Tyr Trp Asp  
110 115 120

60 Cys Cys Lys Ala Ser Cys Ser Trp Pro Gly Lys Ala Ser Val Thr Gly  
125 130 135

65

ES 2 314 114 T3

5 Pro Val Asp Thr Cys Ala Ser Asn Gly Ile Ser Leu Leu Asp Ala Asn  
 140 145 150  
 Ala Gln Ser Gly Cys Asn Gly Gly Asn Gly Phe Met Cys Asn Asn Asn  
 155 160 165 170  
 10 Gln Pro Trp Ala Val Asn Asp Glu Leu Ala Tyr Gly Phe Ala Ala Ala  
 175 180 185  
 15 Ser Ile Ala Gly Ser Asn Glu Ala Gly Trp Cys Cys Gly Cys Tyr Glu  
 190 195 200  
 20 Leu Thr Phe Thr Ser Gly Ala Ala Ser Gly Lys Lys Met Val Val Gln  
 205 210 215  
 25 Val Thr Asn Thr Gly Gly Asp Leu Gly Ser Asn His Phe Asp Leu Gln  
 220 225 230  
 30 Met Pro Gly Gly Gly Val Gly Ile Phe Asn Gly Cys Ala Ala Gln Trp  
 235 240 245 250  
 35 Gly Ala Pro Asn Asp Gly Trp Gly Ala Arg Tyr Gly Gly Val Ser Ser  
 255 260 265  
 40 Val Ser Asp Cys Ala Ser Leu Pro Ser Ala Leu Gln Ala Gly Cys Lys  
 270 275 280  
 45 Trp Arg Phe Asn Trp Phe Lys Asn Ser Asp Asn Pro Thr Met Thr Phe  
 285 290 295  
 50 Lys Glu Val Thr Cys Pro Ala Glu Leu Thr Thr Arg Ser Gly Cys Glu  
 300 305 310  
 55 Arg Lys  
 315

<210> 5

<211> 387

60 <212> PRT

<213> *Mucor circinelloides* CP99001

<220>

65 <221> sig\_peptide

<222> (-22) .. (-1)

ES 2 314 114 T3

<220>

<221> mat\_peptide

<222> (1) .. (365)

5

<400> 5

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

15 Ser Ser Ser Ala Glu Ala Ala Ser Cys Ser Ser Val Tyr Gly Gln Cys  
-5 1 5 10

20 Gly Gly Ile Gly Trp Thr Gly Pro Thr Cys Cys Asp Ala Gly Ser Thr  
15 20 25

25 Cys Lys Ala Gln Lys Asp Asn Lys Tyr Tyr Ser Gln Cys Ile Pro Lys  
30 35 40

30 Pro Lys Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Cys Ser Ser Val Tyr Ser Gln  
45 50 55

35 Cys Gly Gly Ile Gly Trp Ser Gly Pro Thr Cys Cys Glu Ser Gly Ser  
60 65 70

40 Thr Cys Val Ala Gln Glu Gly Asn Lys Tyr Tyr Ser Gln Cys Leu Pro  
75 80 85 90

45 Gly Ser His Ser Asn Asn Ala Gly Asn Ala Ser Ser Thr Lys Lys Thr  
95 100 105

50 Ser Thr Lys Thr Ser Thr Thr Thr Ala Lys Ala Thr Ala Thr Val Thr  
110 115 120

55 Thr Lys Thr Val Thr Lys Thr Thr Thr Lys Thr Thr Thr Lys Thr Ser  
125 130 135

60 Thr Thr Ala Ala Ala Ser Thr Ser Thr Ser Ser Ser Ala Gly Tyr Lys  
140 145 150

65 Val Ile Ser Gly Gly Lys Ser Gly Ser Gly Ser Thr Thr Arg Tyr Trp  
155 160 165 170

ES 2 314 114 T3

Asp Cys Cys Lys Ala Ser Cys Ser Trp Pro Gly Lys Ala Ser Val Thr  
 175 180 185  
 5  
 Gly Pro Val Asp Thr Cys Ala Ser Asn Gly Ile Ser Leu Leu Asp Ala  
 190 195 200  
 10  
 Asn Ala Gln Ser Gly Cys Asn Gly Gly Asn Gly Phe Met Cys Asn Asn  
 205 210 215  
 15  
 Asn Gln Pro Trp Ala Val Asn Asp Glu Leu Ala Tyr Gly Phe Ala Ala  
 220 225 230  
 20  
 Ala Ser Ile Ala Gly Ser Asn Glu Ala Gly Trp Cys Cys Gly Cys Tyr  
 235 240 245 250  
 25  
 Glu Leu Thr Phe Thr Ser Gly Ala Ala Ser Gly Lys Lys Met Val Val  
 255 260 265  
 30  
 Gln Val Thr Asn Thr Gly Gly Asp Leu Gly Ser Asn His Phe Asp Leu  
 270 275 280  
 35  
 Gln Met Pro Gly Gly Gly Val Gly Ile Phe Asn Gly Cys Ala Ala Gln  
 285 290 295  
 40  
 Trp Gly Ala Pro Asn Asp Gly Trp Gly Ala Arg Tyr Gly Gly Val Ser  
 300 305 310  
 45  
 Ser Val Ser Asp Cys Ala Ser Leu Pro Ser Ala Leu Gln Ala Gly Cys  
 315 320 325 330  
 50  
 Lys Trp Arg Phe Asn Trp Phe Lys Asn Ser Asp Asn Pro Thr Met Thr  
 335 340 345  
 55  
 Phe Lys Glu Val Thr Cys Pro Ala Glu Leu Thr Thr Arg Ser Gly Cys  
 350 355 360  
 60  
 Glu Arg Lys  
 365

<210> 6

<211> 346

65 <212> PRT

<213> *Phycomyces nitens* CP99002

ES 2 314 114 T3

<220>

<221> sig\_peptide

<222> (-19) .. (-1)

5

<220>

<221> mat\_peptide

<222> (1) .. (327)

10

<400> 6

15 Met Lys Phe Ser Ile Ile Ala Ser Ala Leu Leu Leu Ala Ala Ser Ser  
-15 -10 -5

20 Thr Tyr Ala Ala Glu Cys Ser Gln Gly Tyr Gly Gln Cys Gly Gly Lys  
1 5 10

25 Met Trp Thr Gly Pro Thr Cys Cys Thr Ser Gly Phe Thr Cys Val Gly  
15 20 25

30 Ala Glu Asn Asn Glu Trp Tyr Ser Gln Cys Ile Pro Asn Asp Gln Val  
30 35 40 45

35 Gln Gly Asn Pro Lys Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Lys Ala Ala Thr  
50 55 60

40 Thr Thr Lys Ala Pro Val Thr Thr Thr Lys Ala Thr Thr Thr Thr Thr  
65 70 75

45 Thr Lys Ala Pro Val Thr Thr Thr Lys Ala Thr Thr Thr Thr Thr Thr  
80 85 90

50 Lys Thr Thr Thr Lys Thr Thr Thr Thr Lys Ala Ala Thr Thr Thr Ser  
95 100 105

55 Ser Ser Asn Thr Gly Tyr Ser Pro Ile Ser Gly Gly Phe Ser Gly Asn  
110 115 120 125

60 Gly Arg Thr Thr Arg Tyr Trp Asp Cys Cys Lys Pro Ser Cys Ala Trp  
130 135 140

65 Asp Gly Lys Ala Ser Val Thr Lys Pro Val Leu Thr Cys Ala Lys Asp  
145 150 155

Gly Val Ser Arg Leu Gly Ser Asp Val Gln Ser Gly Cys Val Gly Gly

ES 2 314 114 T3

	160		165		170
5	Gln Ala Tyr Met Cys Asn Asp Asn Gln Pro Trp Val Val Asn Asp Asp	175	180	185	
10	Leu Ala Tyr Gly Phe Ala Ala Ala Ser Leu Gly Ser Ala Gly Ala Ser	190	195	200	205
15	Ala Phe Cys Cys Gly Cys Tyr Glu Leu Thr Phe Thr Asn Thr Ala Val	210	215	220	
20	Ala Gly Lys Lys Phe Val Val Gln Val Thr Asn Thr Gly Asp Asp Leu	225	230	235	
25	Ser Thr Asn His Phe Asp Leu Gln Met Pro Gly Gly Gly Val Gly Tyr	240	245	250	
30	Phe Asn Gly Cys Gln Ser Gln Trp Asn Thr Asn Thr Asp Gly Trp Gly	255	260	265	
35	Ala Arg Tyr Gly Gly Ile Ser Ser Ile Ser Glu Cys Asp Lys Leu Pro	270	275	280	285
40	Thr Gln Leu Gln Ala Gly Cys Lys Trp Arg Phe Gly Trp Phe Lys Asn	290	295	300	
45	Ala Asp Asn Pro Glu Val Thr Phe Lys Ala Val Thr Cys Pro Ala Glu	305	310	315	
50	Ile Ile Ala Lys Thr Gly Cys Glu Arg Lys	320	325		

<210> 7

<211> 1257

55 <212> ADN

<213> *Humicola insolens*

<220>

60 <221> intrón

<222> (453) .. (509)

65

ES 2 314 114 T3

<400> 7

5           aatgacgggg caacctccc cccgggccc actcttgggt ttggtttgac aggccgtctg 60

10           tctcttgcgt cctcttacta ogcctgcctg gaccctacgt ctcaactccg attcaagatg 120

          cgttctctccc ctctcctccg ctccgccggt gtggccgcc tgccgggtgtt ggcccttgcc 180

15           gctgatggca agtccaccocg ctactgggac tgctgcaagc cttcgtgcgg ctgggccaag 240

          aaggctcccg tgaaccagcc tgtctttctc tgcaacgcc acttccagcg tctcactgac 300

          ttcgacgcc agtccggctg cgagccgggc ggtgtcgcct actcgtgcgc cgaccagacc 360

20           ccatgggctg tgaacgacga cttcgcggtc ggttttgctg ccacctctat tgccggcagc 420

          aatgaggcgg gctggtgctg ogcctgctac gagtaagctt tggcgcgctg tgtaacactg 480

          tgcaggcata gcaactaacca cctcccaggc tcacctcac atccggctct gttgctggca 540

25           agaagatggt cgtccagtc accagcactg gcggtgatct tggcagcaac cacttcgatc 600

          tcaacatccc cggcggcggc gtcggcatct tcgacggatg cactccccag ttcggcggtc 660

          tgcccggcca gcgctacggc ggcatctcgt cccgcaacga gtgcgatogg ttccccgacg 720

30           ccctcaagcc cggctgctac tggcgttcg actggttcaa gaacgccgac aaccgagct 780

          tcagcttccg tcaggtccaa tgcccagccg agctcgtcgc tcgcaccgga tgccgccgca 840

          acgacgacgg caacttcctt gccgtccaga tcccctccag cagcaccagc tctccggctg 900

          gccagcctac cagtaccagc accacctcca cctccaccac ctcgagcccg cccgtccagc 960

35           ctacgactcc cagcggctgc actgctgaga ggtgggctca gtgcggcggc aatggctgga 1020

          goggctgcac cacctgcgct gctggcagca cctgcacgaa gattaatgac tgggtaccatc 1080

          agtgcctgta aacgcagggc agcctgagaa cttactggt tgcgcaacga aatgacactc 1140

          ccaatcactg tattagtct tgtacataat ttcgtcatcc ctccagggat tgtcacatat 1200

40           atgcaatgat gaatactgaa cacaaacctg gccgctttaa ctggccgaag gaatgcc 1257

<210> 8

<211> 1720

<212> ADN

<213> *Trichoderma viride*

<220>

<221> intrón

<222> (500) .. (682)

ES 2 314 114 T3

<400> 8

```

5   ggtgtgtcat ttctcctcaa catactgcct ttcaacaact ttgcctcct ccctggcctg 60
   atatcccaat atcagttttt cccaaagtag caagtcatca gtaaactctgc tcatctatca 120
   ttaatcagtg cccatagtggt ctgtctgttg attgcctccc gccatacacg atgaacagga 180
   ccatggctcc attgctgctt gcagcgtcga tactcttcgg gggcgtgct gcacaacaga 240
10  ctgtctgggg acagtgtgga ggtattgggt ggagcggacc tacgagttgt gctcctggat 300
   cagcttgttc tactctcaat ccttattatg cgcaatgcat tccgggggcc actagtatca 360
   ccacctcgac ccgaccccc tgggtccaa ccaccaccac cagagccacc tcaacgacct 420
   catctccgcc accgaccagc tctggagttc gatttgctgg cgtaacatc gcgggctttg 480
15  acttcggatg taccacagag tatgtcttca tgttgcatag tgttgctggc tgagtattct 540
   gggcggatga tttatagctg tgcgggctgc aaaacaccgc cggcttgcca ctatcaaggc 600
   atagttgata ggcggcgggtg ttttcttcaa tcccctgatt aactctcaa gaatctagtg 660
20  gctgatggat gtatgattac agtggcactt gcgttacatc gaaggtttat cctccgttga 720
   agaacttcac tggggcaaac aactaccggg acggtatcgg ccagatgcag cacttcgtca 780
   acgatgatgg gatgactatt ttccgcctac cgtcggatg gcagtacctc gtaaacaaca 840
25  atctgggtgg aactctcgat tccaccagta tctcgaagta tgatcagctc gttcaggggt 900
   gcctgtctct cgggtatata tgcattatcg acatccacaa ttatgctcga tggaacgggt 960
   gaatcattgg ccagggaggc cctacaaatg cccagtttac cagtctttgg tgcagttgg 1020
   catcgaagta cgcgtctcag tgcaggggtg gtttcggaat aatgaatgag cccacagacg 1080
30  tgaacatcaa cacttgggct gccacggttc aagaggtcgt cactgcaatc cgcaacgccg 1140
   gtgctacgtc gcaatacatt tctctgcctg gaaatgatta tcaatctcgc gcagcttita 1200
   tttccgatgg cagtgcagcc gccctgtctc aggtaacgaa ccctgatgga tcaacaacga 1260
35  atctaattct cgatgtccac aagtacttag actcggacaa ctccggtact cagccgaat 1320
   gcactacaaa caacatcgac ggcgcctttg ctctctcgc cacttggctt cgacagaaca 1380
   accgccaggc tattctgacg gaaaccggcg gtggcaatgt tcagtctcgc atccaagatt 1440
40  tgtgccaaca gatccagtac ctcaaccaga actcagatgt ctatcttggc tatgctggct 1500
   ggggtgccgg ttcatttgat agcacttata ttctgacgga aacgcctact ggaagcggta 1560
   actcgtggac ggacacatcc ctagttagct cgtgtctcgc caggaagtaa caccgaggtc 1620
   gattgcagga gccttgtcaa tagcgatttc atcttgctgt acataattct tactctctga 1680
45  agccgcttgt tctgggtatg tgtcttgaca ggtttctaga 1720

```

<210> 9

<211> 1043

50 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

55 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Secuencia de codones optimizados correspondiente a la proteína RCE I (SEC ID N° 1)

<220>

60 <221> CDS

<222> (16) .. (1032)

<220>

65 <221> sig\_peptide

<222> (16) .. (84)

ES 2 314 114 T3

<220>

<221> mat\_peptide

<222> (85) .. (1029)

5

<400> 9

```

ggatcctggg acaag atg aag ttc atc act atc gcc tcc tcc gcc ctc ctt 51
10
Met Lys Phe Ile Thr Ile Ala Ser Ser Ala Leu Leu
-20 -15

gcc ctc gcc ctt ggc act gag atg gcc tcc gcc gct gag tgc tcc aag 99
Ala Leu Ala Leu Gly Thr Glu Met Ala Ser Ala Ala Glu Cys Ser Lys
-10 -5 1 5

ctc tac gga cag tgc ggc gga aag aac tgg aac ggc ccc acc tgc tgc 147
Leu Tyr Gly Gln Cys Gly Gly Lys Asn Trp Asn Gly Pro Thr Cys Cys
10 15 20

gag agc ggc tcg acc tgc aag gtc tcg aat gac tac tac agc cag tgc 195
Glu Ser Gly Ser Thr Cys Lys Val Ser Asn Asp Tyr Tyr Ser Gln Cys
25 30 35

ctg ccg agc ggc tcc tcg gga aac aag tog agc gag tcg gcc cac aag 243
Leu Pro Ser Gly Ser Ser Gly Asn Lys Ser Ser Glu Ser Ala His Lys
40 45 50

aag acc acg acc gct gcc cac aag aag acc acg acc gcc gct cac aag 291
Lys Thr Thr Thr Ala Ala His Lys Lys Thr Thr Thr Ala Ala His Lys
55 60 65

aag act acg acc gct ccc gcc aag aag acc acg acc gtc gcc aag gct 339
Lys Thr Thr Thr Ala Pro Ala Lys Lys Thr Thr Thr Val Ala Lys Ala
70 75 80 85

tcg act ccg tcc aac tcg agc agc tcg tot tcg gga aag tac agc gct 387
Ser Thr Pro Ser Asn Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Lys Tyr Ser Ala
90 95 100

gtc agc ggt ggc gct agc ggc aac ggc gtc act acc cgc tac tgg gac 435
Val Ser Gly Gly Ala Ser Gly Asn Gly Val Thr Thr Arg Tyr Trp Asp
105 110 115

tgc tgc aag gct tcg tgc tcg tgg ccc ggc aag gct aac gtc agc tog 483
Cys Cys Lys Ala Ser Cys Ser Trp Pro Gly Lys Ala Asn Val Ser Ser
120 125 130

cct gtc aag tcc tgc aac aag gac ggc gtc acc gct ctt agc gac tcc 531
Pro Val Lys Ser Cys Asn Lys Asp Gly Val Thr Ala Leu Ser Asp Ser
135 140 145

aac gcc cag tcc ggc tgc aac ggc ggc aac tcc tac atg tgc aac gac 579

```

ES 2 314 114 T3

Asn Ala Gln Ser Gly Cys Asn Gly Gly Asn Ser Tyr Met Cys Asn Asp  
 150 155 160 165

5  
 aac cag cca tgg gct gtc aac gac aac ctt gct tac ggt ttc gct gcc 627  
 Asn Gln Pro Trp Ala Val Asn Asp Asn Leu Ala Tyr Gly Phe Ala Ala  
 170 175 180

10  
 gct gcc att agc ggc ggt ggc gag agc cgc tgg tgc tgc tcc tgc ttc 675  
 Ala Ala Ile Ser Gly Gly Gly Glu Ser Arg Trp Cys Cys Ser Cys Phe  
 185 190 195

15  
 gag ctc acc ttc acc tcc acc agc gtt gct ggc aag aag atg gtc gtc 723  
 Glu Leu Thr Phe Thr Ser Thr Ser Val Ala Gly Lys Lys Met Val Val  
 200 205 210

20  
 cag gtc acc aac act ggc ggt gac ctt ggc agc tcg acc ggt gcc cac 771  
 Gln Val Thr Asn Thr Gly Gly Asp Leu Gly Ser Ser Thr Gly Ala His  
 215 220 225

25  
 ttc gat ctc cag atg ccc ggc ggc ggc gtc ggc atc ttc aac gga tgc 819  
 Phe Asp Leu Gln Met Pro Gly Gly Gly Val Gly Ile Phe Asn Gly Cys  
 230 235 240 245

30  
 tog tcc cag tgg ggc gct ccc aac gac ggc tgg ggc tcg cgc tac ggc 867  
 Ser Ser Gln Trp Gly Ala Pro Asn Asp Gly Trp Gly Ser Arg Tyr Gly  
 250 255 260

35  
 ggc atc agc tcc gcc agc gac tgc tcg tcc ctc ccc agc gcc ctc cag 915  
 Gly Ile Ser Ser Ala Ser Asp Cys Ser Ser Leu Pro Ser Ala Leu Gln  
 265 270 275

40  
 gcc ggc tgc aag tgg cgc ttc aac tgg ttc aag aac gcc gac aac ccg 963  
 Ala Gly Cys Lys Trp Arg Phe Asn Trp Phe Lys Asn Ala Asp Asn Pro  
 280 285 290

45  
 tcc atg acc tac aag gag gtc acc tgc ccc aag gag atc acc gct aag 1011  
 Ser Met Thr Tyr Lys Glu Val Thr Cys Pro Lys Glu Ile Thr Ala Lys  
 295 300 305

50  
 acc gga tgc tcg cgc aag taa acgcaggatc c 1043  
 Thr Gly Cys Ser Arg Lys  
 310 315

55  
 60  
 65