



19

OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 144 401**

51 Int. Cl.<sup>7</sup>: C11D 3/386

D06M 16/00

C11D 7/42

12

TRADUCCION DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **91918950.6**

86 Fecha de presentación : **04.10.1991**

87 Número de publicación de la solicitud: **0 551 408**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **21.07.1993**

54 Título: **Composiciones detergentes que contienen composiciones de celulosa deficientes en componentes del tipo CBH I.**

30 Prioridad: **11.06.1991 US 713738**

45 Fecha de la publicación de la mención BOPI:  
**16.06.2000**

45 Fecha de la publicación del folleto de patente:  
**16.06.2000**

73 Titular/es:  
**GENENCOR INTERNATIONAL, INC.**  
**180 Kimball Way**  
**South San Francisco, CA 94080, US**

72 Inventor/es: **Clarkson, Kathleen A.;**  
**Weiss, Geoffrey L.;**  
**Larenas, Edmund A. y**  
**Shoemaker, Sharon P.**

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

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 (artº 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCION

Composiciones detergentes que contienen composiciones de celulasa deficientes en componentes del tipo CBH I.

5 **Campo técnico de la invención**

La presente invención se dirige a la utilización de composiciones detergentes que contienen composiciones de celulasa específicas que, cuando se utilizan para lavar tejidos que contienen algodón, son capaces de reducir la pérdida de fuerza en comparación con el tratamiento con celulasa completa.

10 **Estado de la técnica anterior a la invención**

Las celulasas se conocen en el estado de la técnica como enzimas que hidrolizan celulosa (uniones  $\beta$ -1,4-glucano) dando como resultado de esta manera la formación de glucosa, celobiosa, celooligosacáridos y similares. Aunque la celulasas se producen (expresan) en hongos, bacterias y similares, se ha prestado mayor atención a las producidas por hongos porque ciertos hongos producen un sistema celulasa completo capaz de degradar formas cristalinas de celulosa y porque dichas celulasas pueden producirse fácilmente en grandes cantidades a través de procedimientos de fermentación.

20 Con relación a lo expuesto más arriba, Wood et al., describen en "Methods in Enzymology", 160, 25, pág. 234 y siguientes (1988), que ciertos hongos producen sistemas de celulasa completa comprendidos en diferentes clasificaciones enzimáticas, incluyendo aquellas identificadas como exo-celobiohidrolasas (EC 3.2.1.91) ("CBH"), endoglucanasas (EC 3.2.1.4) ("EG") y  $\beta$ -glucosidasas (EC 3.2.1.21) ("BG"). Por otro lado, algunos hongos son incapaces de producir sistemas celulasa completos. Generalmente, estos sistemas carecen de componentes CBH. Véase, por ejemplo, Coughlan et al., Biochemistry and Genetics of Cellulose Degradation, Aubert et al., Editor, pág. 11 et seq., (Academic Press, 1988); y Wood et al., Methods in Enzymology, 160, 25, pág. 87 y siguientes, (Academic Press, New York, 1988).

30 De manera similar, aunque se ha descrito en la literatura que las celulasas bacterianas contienen pocos componentes CBH o que no contienen componentes CBH, en algunos casos se han descrito componentes tipo CBH derivados de celulasas bacterianas que poseen actividad exo-celobiohidrolasa.

35 Las clasificaciones de la celulosa fúngica en CBH, EG y BG pueden expandirse aún más para incluir componentes múltiples dentro de cada clasificación. Por ejemplo, se han aislado CBHs y EGs múltiples de diferentes fuentes fúngicas, incluyendo el *Trichoderma reesei*, que contiene 2 CBHs, es decir, CBH I y CBH II, y al menos 3 EGs, es decir, EG I, EG II y EG III.

40 Se requiere el sistema celulasa completo, que comprende componentes de cada una de las clasificaciones CBH, EG y BG, para convertir eficientemente la celulosa cristalina a glucosa. Los componentes aislados son mucho menos efectivos, si es que lo son, en hidrolizar la celulosa cristalina. Además, se observa una relación sinérgica entre los componentes celulasa, particularmente si son de diferentes clasificaciones. Es decir, la efectividad de un sistema celulasa completo es significativamente mayor que la suma de las contribuciones de los componentes aislados de la misma clasificación. A este respecto, es conocido en el estado de la técnica que los componentes EG y CBH interactúan sinérgicamente para degradar la celulosa más eficientemente. Véase, por ejemplo, Wood, *Biochem. Soc. Trans.*, 13, pp. 407-410 (1985).

50 La especificidad de sustrato y el modo de acción de los diferentes componentes celulasa varía significativamente según la clasificación, lo que puede justificar la sinergia de los componentes combinados. Por ejemplo, el modo de acción de la celulasa actualmente aceptado es que los componentes endoglucanasa hidrolizan los enlaces  $\beta$ -1,4-glucosídicos internos, particularmente, en las regiones de baja cristalinidad de los componentes celulosa y que los componentes exo-celobiohidrolasa hidrolizan la celobiosa del extremo no-reductor de la celulosa. La acción de los componentes endoglucanasa facilita en gran medida la acción de las exo-celobiohidrolasas mediante la creación de nuevos extremos de cadena que son reconocidos por los componentes exo-celobiohidrolasa.

55 Los componentes  $\beta$ -glucosidasa actúan sólo sobre los celooligosacáridos, es decir, celobiosa, para dar glucosa como único producto. Se consideran una parte integral del sistema celulasa porque conducen la reacción global hacia glucosa y de esta manera mitigan los efectos inhibidores de la celobiosa sobre los componentes CBH y EG.

60 Por otro lado, también se conocen las celulasas en el estado de la técnica por ser útiles en composiciones detergentes con el fin de mejorar la capacidad limpiadora de la composición, para su utilización

como agente suavizante y para mejorar el tacto de tejidos de algodón y similares. Aunque no se comprende completamente el mecanismo exacto por el cual las composiciones de celulasa suavizan prendas, las propiedades suavizantes y restauradoras del color de la celulasa se han atribuido a componentes endoglucanasa alcalinos en las composiciones celulasa. Así, por ejemplo, la Solicitud Internacional de Número de Publicación WO 89/09259 describe que las composiciones detergentes que contienen una composición celulasa enriquecida en un componente endoglucanasa alcalino especificado imparten una restauración del color y una suavidad aumentada a las prendas tratadas en comparación con composiciones de celulasa no enriquecida en dicho componente. Adicionalmente, la utilización de dichos componentes endoglucanasa alcalina en las composiciones detergentes complementa los requisitos de pH de la composición detergente. El componente endoglucanasa referido se define como aquel que muestra una actividad máxima a un pH alcalino de 7,5 a 10 y que tiene un criterio de actividad definida sobre la carboximetilcelulosa y el Avicel.

Por otro lado, se conoce en el estado de la técnica que las composiciones de celulasa degradan las prendas que contienen algodón (véase, por ejemplo, Suzuki et al., Patente U.S. N° 4.822.516), la degradación de las cuales se hace evidente por una pérdida de fuerza reducida en el tejido. Dicha pérdida de fuerza justifica, en parte, la reticencia a utilizar composiciones celulasa en aplicaciones detergentes comerciales.

De acuerdo con lo expuesto anteriormente, las composiciones celulasa que contienen uno o más componentes endoglucanasa, que también proporcionan una pérdida de fuerza reducida en prendas que contienen algodón en comparación con un sistema celulasa completo serán particularmente ventajosas para la utilización en composiciones detergentes.

### Descripción resumida de la invención

Se ha encontrado ahora que las composiciones celulasa fúngicas que contienen uno o más componentes del tipo endoglucanasa pueden combinarse en composiciones detergentes para transmitir mejoras en suavidad, retención/restauración del color y tacto de prendas que contienen algodón lavadas en un medio de lavado que contiene dicha composición. Se ha encontrado además que cuando dichas composiciones celulasa contienen menos de aproximadamente un 5 % en peso de componentes del tipo CBH I, las composiciones detergentes resultantes transmiten una menor pérdida de fuerza a las prendas que contienen algodón lavadas de esta manera.

Con relación a las composiciones detergentes que contienen composiciones celulasa que son deficientes en CBH I, enriquecidas en CBH I o en EG III, se ha encontrado que es la cantidad de celulasa y no la relación relativa de hidrólisis de los componentes enzimáticos específicos para producir azúcares reductores a partir de celulosa, lo que transmite las propiedades detergentes apropiadas a las prendas que contienen algodón, es decir, una o más de las siguientes propiedades: restauración de color mejorada, suavidad mejorada y limpieza mejorada de la composición detergente.

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, la presente invención proporciona la utilización de una composición detergente para lavar una prenda que contiene algodón, comprendiendo dicha composición:

- (a) una cantidad efectiva de limpieza de un surfactante o una mezcla de surfactantes; y,
- (b) desde aproximadamente un 0,01 % hasta aproximadamente un 5 % en peso de una composición de celulasa fúngica basada en el peso de la composición detergente, donde dicha composición celulasa comprende uno o más componentes endoglucanasa y menos de aproximadamente un 5 % en peso de componentes exo-celobiohidrolasa basado en el peso de proteína en la composición de celulasa; caracterizado en que el lavado de la prenda con la composición proporciona una pérdida de fuerza reducida en comparación con el tratamiento con celulasa completa.

Preferentemente, la composición de celulasa comprende desde aproximadamente un 0,05 % hasta aproximadamente un 2 % en peso de dicha composición detergente.

En una realización preferida, la composición celulasa está libre de todos los componentes exocelobiohidrolasa y aún más preferentemente está libre de todos los componentes de tipo CBH.

En otra realización preferida, la composición celulasa deriva de un microorganismo que se ha modificado genéticamente de manera que es incapaz de producir cualquier componente tipo CBH I y más preferentemente cualquier componente tipo CBH, es decir, componentes tipo CBH I y CBH II. En una realización aún más preferida, la composición celulasa deriva de un microorganismo que se ha modificado genéticamente de manera que es incapaz de producir cualquier componente del tipo CBH I o cualquier

componente del tipo CBH sin la expresión de cualquier proteína heteróloga.

### Breve descripción de los dibujos

5 La Fig. 1 es un esbozo de la construcción de p $\Delta$ CBHI<sub>pyr4</sub>.

La Fig. 2 ilustra la delección del gen de *T. reesei* mediante la integración de fragmento más largo de EcoRI de p $\Delta$ CBHI<sub>pyr4</sub> en el locus cbh1 de uno de los cromosomas de *T. reesei*.

10 La Fig. 3 es una autorradiografía de DNA de la cepa GC69 de *T. reesei* transformada con p $\Delta$ CBHI<sub>pyr4</sub> digerido con EcoRI después del análisis Southern Blot utilizando marcado con <sup>32</sup>P como sonda. Los tamaños de los marcadores de pesos moleculares se indican en pares de kilobases a la izquierda de la figura.

15 La Fig. 4 es una autorradiografía de DNA de una cepa GC69 de *T. reesei* transformada con p $\Delta$ CBHI<sub>pyr4</sub> digerido con EcoRI utilizando pIntCBHI marcado con <sup>32</sup>P como sonda. Los tamaños de los marcadores de pesos moleculares se indican en pares de kilobases a la izquierda de la figura.

20 La Fig. 5 es un gel de enfoque isoelectrico que muestra las proteínas secretadas por cepas de *T. reesei* de tipo salvaje y transformadas. Específicamente, en la Fig. 5, carril A del gel de enfoque isoelectrico emplea CBHI parcialmente purificado de *T. reesei*; el carril B emplea *T. reesei* de tipo salvaje; el carril C emplea proteína de una cepa de *T. reesei* con el gen cbh1 deleccionado; y el carril D emplea proteína de una cepa de *T. reesei* con los genes cbh1 y cbh2 deleccionados. EN la Fig. 5, la parte situada a la derecha de la figura está marcada para indicar la localización de proteínas aisladas encontradas en una  
25 o más de las proteínas secretadas. Específicamente, BG se refiere a la  $\beta$ -glucosidasa, E1 se refiere a la endoglucanasa I, E2 se refiere a la endoglucanasa II, E3 se refiere a la endoglucanasa III, C1 se refiere a la exo-celobiohidrolasa I y C2 se refiere a la exo-celobiohidrolasa II.

30 La Fig. 6A es una representación del locus cbh2 de *T. reesei*, clonado como un fragmento de DNA genómico de EcoRI de 4,1kb y la Fig. 6B es una representación del vector p $\Delta$ CBHII de delección del gen cbh2.

35 La Fig. 7 es una autorradiografía de DNA de la cepa de *T. reesei* P37P $\Delta$ CBHI<sub>pyr26</sub> transformada con p $\Delta$ CBHII digerido con EcoRI después del análisis Southern blot utilizando p $\Delta$ BHII marcado con <sup>32</sup>P como sonda. Los tamaños de los marcadores de peso molecular se muestran en pares de kilobases a la izquierda de la figura.

La Fig. 8 es un diagrama del plásmido pEGI<sub>pyr4</sub>.

40 La Fig. 9 ilustra el perfil de actividad de RBB-CMC de una composición de celulasa fúngica enriquecida en EG (CBH I y II deleccionados) derivados de *Trichoderma reesei* sobre un rango de pH a 40°C; así como el perfil de actividad de una composición de celulasa enriquecida en EG III derivada de *Trichoderma reesei* sobre un rango de pH a 40°C.

45 La Fig. 10 ilustra los resultados de pérdida de fuerza después de tres ciclos de lavado en un laundrómetro para tejidos que contienen algodón tratados con composiciones de celulasa que tienen cantidades variables de componentes CBH.

50 La Fig. 11 ilustra los resultados de eliminación de fibras (basados en puntuaciones de un panel de análisis) para tejidos que contienen algodón tratados con celulasa secretada por un *Trichoderma reesei* de tipo salvaje (celulasa completa) a varios pHs.

55 La Fig. 12 ilustra los resultados de eliminación de fibras (basados en puntuaciones de un panel de análisis) para tejidos que contienen algodón tratados con concentraciones variables (en ppm) de celulasa secretada por una cepa de *Trichoderma reesei* modificada por ingeniería genética de manera que es incapaz de secretar CBH I y CBH II.

60 La Fig. 13 ilustra los resultados del panel de análisis de suavidad para concentraciones variables (en ppm) de una composición de celulasa enriquecida en EG derivada de una cepa de *Trichoderma reesei* modificada por ingeniería genética de manera que es incapaz de secretar CBH I & II.

La Fig. 14 es un diagrama de las alteraciones específicas de sitio realizadas en los genes egI1 y cbh1

para crear sitios de restricción de endonucleasas convenientes. En cada caso, la línea superior indica la secuencia de ADN original, los cambios introducidos se muestran en la línea central y la nueva secuencia de muestra en la línea inferior.

5 La Fig. 15 es un diagrama del fragmento de EcoRI más grande que puede obtenerse a partir de pCEPC1.

La Fig. 16 es una autoradiografía de ADN, de una cepa no transformada de *T. reesei* RutC30 y de dos transformantes obtenidos transformando *T. reesei* con pCEPC1 digerido con EcoRI. El ADN se digirió con PstI, se obtuvo un Southern blot y se hibridó con pUC4K::cbh1 marcado con <sup>32</sup>P. Los tamaños de los fragmentos de ADN marcadores se muestran en pares de kilobases a la izquierda de la figura.

La Fig. 17 es un diagrama del plásmido pEGII::P-1.

15 La Fig. 18 es una autoradiografía de DNA de la cepa de *T. reesei* P37PΔΔ67P<sup>-1</sup> transformada con pEGII::P-1 digerido con HindIII y BamHI. Se preparó un Southern blot y se hibridó el ADN con un fragmento de PstI de aproximadamente 4 kb de ADN de *T. reesei* que contiene el gen egl3. Los carriles A, C y E contienen ADN de las cepas no transformadas, mientras que los carriles B, D y F contienen ADN de la cepa de *T. reesei* no transformada. El ADN de *T. reesei* se digirió con BglIII en los carriles A y B, con EcoRV en los carriles C y D y con PstI en los carriles E y F. El tamaño de los fragmentos de ADN marcadores se muestran en pares de kilobases a la izquierda de la figura.

La Fig. 19 es un diagrama del plásmido pΔEGI-1.

25 La Fig. 20 es una autoradiografía de un Southern blot de ADN aislado de transformantes de una cepa GC69 obtenida con pΔEGIPyr-3 digerido con HindIII. El patrón de hibridación con la sonda, pΔEGIPyr-3, esperado para una cepa no transformada se muestra en el carril C. El carril A muestra un transformante en el cual se ha integrado pΔEGIPyr-3 en el genoma pero sin alterar el gen egi1. El carril D contiene pΔEGIPyr-3 digerido con HindIII para proporcionar marcadores de tamaño adecuados. Los tamaños de los fragmentos de ADN marcadores se muestran en pares de kilobases a la derecha de la figura.

### Descripción detallada de la invención

35 Tal y como se ha indicado más arriba, la presente invención se refiere en general a composiciones de detergente que contienen composiciones de celulasa fúngica que contienen uno o más componentes de celulasa tipo EG y menos de aproximadamente un 5 % en peso de componentes de tipo CBH I así como métodos de empleo de dichas composiciones de celulasa. Cuando se utiliza en medio de lavado que tiene pH ácido, neutro o alcalino, dichas composiciones detergentes imparten mejoras en la suavidad, la retención/restauración del color y el tacto de tejidos que contienen algodón lavados en dichos medios.

40 Además, debido a la pequeña cantidad de componentes de tipo CBH I presentes en la composición de celulasa, estas composiciones también proporcionan una reducida pérdida de fuerza en comparación con aquellas composiciones que contienen mayores cantidades de componentes de tipo CBH I.

45 Sin embargo, antes de discutir la presente invención en detalle, se definirán primero los siguientes términos.

El término "celulasa fúngica" se refiere a una composición enzimática derivada de fuentes de hongos o microorganismos modificados genéticamente de manera que incorporan y expresan todos o parte de los genes de celulasa obtenidos a partir de una fuente de hongo. Las celulasas fúngicas actúan sobre la celulosa o uno o más de sus productos de degradación para hidrolizar la celulosa y dar productos primarios, glucosa y celobiosa. Las celulasas fúngicas se distinguen de las celulasas producidas de fuentes no fúngicas, incluidos microorganismos tales como actinomicetas, bacterias reptantes (mixobacterias) y bacterias verdaderas. Los hongos capaces de producir celulasas útiles en la preparación de composiciones de celulasa utilizadas en las composiciones detergentes descritas aquí se describen en la patente británica N°2 094 826A, la descripción de la cual se incluye aquí como referencia.

La mayoría de las celulasas fúngicas tienen en general su actividad óptima en el rango de pH ácido o neutro, aunque se sabe que algunas celulasas fúngicas poseen actividad significativa bajo condiciones neutras y ligeramente alcalinas, es decir, por ejemplo, se sabe que la celulasa derivada de *Humicola insolens* tiene actividad en condiciones neutras o ligeramente alcalinas.

Se sabe que las celulasas fúngicas comprenden varias clasificaciones enzimáticas que tienen diferente

especificidad de sustrato, patrones de acción enzimática y similares. Adicionalmente, los componentes enzimáticos dentro de cada clasificación pueden mostrar diferentes pesos moleculares, diferentes grados de glicosilación, diferentes puntos isoelectrónicos, diferentes especificidad de sustrato, diferentes patrones de acción enzimática, etc. Por ejemplo, celulasas fúngicas pueden contener clasificaciones de celulasas que incluyen endoglucanasas (Egs), exo-celobiohidrolasas (CBHs),  $\beta$ -glucosidasas (BGs), etc. Por otro lado, aunque se ha descrito en la literatura que las celulasas bacterianas contienen pocos o ningún componente CBH, en algún caso se ha descrito que componentes tipo CBH derivados de celulasas bacterianas poseen actividad exo-celobiohidrolasa.

A veces se hace referencia aquí a una composición de celulasa fúngica producida por una fuente fúngica existente en la naturaleza y que comprende uno o más componentes CBH y EG donde cada uno de estos componentes se encuentra en la proporción producida por la fuente fúngica, como “sistema celulasa fúngica completa” o una “composición celulasa fúngica completa” para distinguirla de las clasificaciones y componentes de la celulasa aislada a partir de ahí, de composiciones de celulasa incompletas producidas por bacterias y algunos hongos o de una composición de celulasa obtenida a partir de un microorganismo modificado genéticamente para producir, producir en menor grado o no producir uno o más componentes CBH y/o EG de celulasa.

Los procedimientos de fermentación para cultivar hongos para la producción de celulasa se conocen per se en el estado de la técnica. Por ejemplo, pueden producirse sistemas de celulasa en cultivo en medio sólido o sumergido, incluyendo procesos en discontinuo, en discontinuo con alimentación o de flujo continuo. La separación y purificación de los sistemas celulasa a partir del caldo de fermentación puede llevarse a cabo también mediante procedimientos conocidos per se en el estado de la técnica.

El término componentes tipo endoglucanasa (“EG”) se refiere a todos aquellos componentes celulasa fúngica o combinación de componentes que muestran propiedades de actividad detergente similares a los componentes endoglucanasa del *Trichoderma reesei*. A este respecto, los componentes endoglucanasa de *Trichoderma reesei* (específicamente EG I, EG II, EG III y similares bien solos o bien en combinación) imparten una suavidad, una retención/restauración del color y un tacto mejorado a los tejidos que contienen algodón cuando estos componentes se incorporan a un medio de lavado y el tejido se trata con este medio. De acuerdo con esto, los componentes de tipo endoglucanasa son aquellos componentes celulasa fúngica que imparten una suavidad, una retención/restauración de color y un tacto mejorado a prendas de algodón cuando dichos componentes se incorporan en un medio de lavado. En una realización preferida, los componentes de tipo endoglucanasa empleados en las composiciones detergentes de la presente invención también imparten una menor pérdida de fuerza a tejidos que contienen algodón en comparación con la pérdida de fuerza resultante del sistema celulasa completo derivado de *Trichoderma reesei*.

Dichos componentes tipo endoglucanasa pueden no incluir componentes clasificados como endoglucanasas utilizando análisis de actividad bioquímica tradicionales. Por ejemplo, dichos análisis de actividad tradicionales están basados en la capacidad del componente (a) de hidrolizar derivados de celulosa soluble tales como carboximetilcelulosa (CMC), reduciendo de esta manera la viscosidad de las soluciones que contienen CMC, (b) hidrolizar fácilmente formas hidratadas de celulosa tales como celulosa hinchada por ácido fosfórico (por ejemplo celulosa Walseth) e hidrolizar menos fácilmente las formas más altamente cristalinas de la celulosa (por ejemplo Avicel, Solkaflor, etc.). Por el contrario, se cree que no todos los componentes endoglucanasa, tal y como se define por dichos análisis de actividad, proporcionarán una suavidad, un tacto y una retención/restauración de color mejorados. De acuerdo con esto, es más acertado para los presentes propósitos definir los componentes tipo endoglucanasa como aquellos componentes de celulasa fúngica que poseen similares propiedades en composiciones detergentes tal y como poseen los componentes endoglucanasa de *Trichoderma reesei*.

Las celulasas fúngicas pueden contener más de un componente del tipo EG. Los diferentes componentes generalmente tienen diferentes puntos isoelectrónicos, diferentes pesos moleculares, diferentes grados de glicosilación, diferente especificidad de sustrato, diferentes patrones de acción enzimática, etc. Los diferentes puntos isoelectrónicos de los componentes permiten su separación mediante cromatografía de intercambio iónico y similares. De hecho, el aislamiento de componentes de diferentes fuentes fúngicas es conocido en el estado de la técnica. Véase, por ejemplo, Bjork et al., patente U.S. N°07/422.814, Schulein, Methods in Enzymology, Vol. 160, pág.234 a 242 (1988); y similares. La descripción completa de cada una de estas referencias se incorpora aquí como referencia.

En general, se contempla que combinaciones de componentes tipo EG pueden dar una respuesta sinérgica en la mejora de la suavidad, la retención/restauración de color y tacto en comparación con un componente de tipo EG sencillo. Por otro lado, un componente de tipo EG sencillo puede ser más estable

o tener un espectro de actividad más amplio sobre un rango de pHs. De acuerdo con esto, los componentes tipo EG empleados en la presente invención pueden ser un componente tipo EG sencillo o una combinación de dos o más componentes tipo EG. Cuando se emplea una combinación de componentes, los componentes tipo EG pueden derivar de una misma fuente fúngica o de diferentes fuentes fúngicas.

5

El término componentes tipo exo-celobiohidrolasa ("tipo CBH") se refiere a aquellos componentes celulasa fúngica que muestran propiedades de actividad detergente similares a los componentes tipo CBH I y/o CBH II de *Trichoderma reesei*. A este respecto, cuando se utilizan en ausencia de componentes tipo EG (tal y como se ha definido más arriba), los componentes CBH I y CBH IIU de *Trichoderma reesei* solos no imparten una retención/restauración de color y una mejora del tacto significativos de los tejidos que contienen algodón tratados de esta manera. Adicionalmente, cuando se utiliza en combinación con componentes tipo EG, el componente CBH I de *Trichoderma reesei* imparte una pérdida de fuerza mejorada y un incremento del efecto limpiador a los tejidos que contienen algodón.

De acuerdo con esto, los términos componentes tipo CBH I y los componentes tipo CBH II se refieren a componentes celulasa fúngica que muestran propiedades de actividad detergente similares a los componentes CBH I y CBH II de *Trichoderma reesei*, respectivamente. Tal y como se ha indicado más arriba, para los componentes tipo CBH I, esto incluye las propiedades de aumentar la pérdida de fuerza de tejidos que contienen algodón y/o impartir un incremento del beneficio limpiador cuando se utiliza en presencia de componentes tipo EG. En una realización preferida, los componentes CBH I también imparten un incremento del beneficio suavizante cuando se utilizan en presencia de componentes tipo EG.

Dichos componentes tipo exo-celobiohidrolasa pueden incluir componentes no clasificados tradicionalmente como exo-celobiohidrolasas utilizando análisis de actividad tales como aquellos utilizados para caracterizar CBH I y CBH II de *Trichoderma reesei*. Por ejemplo, utilizando dichos análisis de clasificación tradicionales, dichos componentes son (a) inhibidos completamente por la celobiosa (K aproximadamente de 1 mM); (b) incapaces de hidrolizar hasta un grado significativo celulosas substituidas, tales como carboximetilcelulosa. Por el contrario, se cree que algunos componentes celulasa fúngica que están caracterizados como componentes CBH por dichos análisis de actividad, proporcionarían una suavidad, un tacto y una retención/restauración de color mejorada a los tejidos que contienen algodón cuando dichos componentes se utilizan solos en composiciones detergentes. De acuerdo con esto, se cree que es más preciso de cara a los presentes objetivos definir dichas exo-celobiohidrolasas como componentes tipo EG porque estos componentes poseen propiedades funcionales similares en composiciones detergentes a las que poseen los componentes endoglucanasa de *Trichoderma reesei*.

Las celulasas fúngicas enriquecidas en componentes tipo EG pueden obtenerse mediante técnicas de purificación. Específicamente, el sistema celulasa completa puede purificarse en componentes substancialmente puros mediante técnicas de separación reconocidas bien publicadas en la literatura, incluyendo cromatografía de intercambio iónico a un pH adecuado, cromatografía de afinidad, de exclusión por tamaño y similares. Por ejemplo, en la cromatografía de intercambio iónico (habitualmente cromatografía de intercambio aniónico) es posible separar los componentes celulasa eluyendo con un gradiente de pH o un gradiente salino o ambos (gradiente de pH y gradiente salino).

También se contempla que mezclas de componentes celulasa que tienen la relación requerida de componentes tipo EG respecto a componentes celulasa CBH tipo I pueden prepararse por medios diferentes del aislamiento y recombinación de los componentes. A este respecto, puede ser posible modificar las condiciones de fermentación para un microorganismo natural para dar proporciones relativamente elevadas de componentes EG y CBH. De manera similar, las técnicas recombinantes pueden alterar la proporción relativa de componentes EG respecto a componentes CBH de manera que se produzca una mezcla de componentes celulasa que tengan una relación de componentes EG respecto componentes CBH relativamente elevada o que puede producir uno o más componentes EG libres de todos los componentes CBH.

En relación con lo anterior, un método preferido para la preparación de composiciones celulasa enriquecidas en componentes tipo EG es modificando genéticamente un microorganismo de manera que sea incapaz de producir uno o más componentes del tipo CBH, métodos que no producen ninguna proteína heteróloga. De manera similar, también es posible modificar genéticamente un microorganismo de manera que se sobreproduzca uno o más componentes tipo EG. Por ejemplo, la patente U.S. N°07/593.919, presentada el 5 de octubre de 1990 y que se incorpora aquí como referencia en su totalidad, describe procedimientos para modificar por ingeniería genética *Trichoderma reesei* de manera que sea incapaz de producir uno o más componentes CBH y/o sobreproducir uno o más componentes EG. Además, los métodos de dicha aplicación crean cepas de *Trichoderma reesei* que no producen ninguna proteína

heteróloga. De manera similar, Miller et al., "Direct and Indirect Gene Replacement in *Aspergillus nidulans*", *Molecular and Cellular Biology*, pág. 1714-1721 (1985) describe procedimientos para deleccionar genes en *Aspergillus nidulans* mediante una transformación mediada por ADN utilizando un fragmento lineal de ADN homólogo. Los procedimientos de Miller et al. Consegurían una deleción génica sin  
 5 producir ninguna proteína heteróloga.

En vista de lo expuesto más arriba, la deleción de genes responsables de la producción de componentes celulasa tipo CBH I o tipo CBH II tendría el efecto de enriquecer la cantidad de componentes tipo EG presentes en la composición celulasa. De manera similar, la deleción de aquellos genes responsables de la producción de componentes tipo CBH I y II provocaría una composición celulasa libre de componentes  
 10 tipo CBH.

También se contempla que pueden utilizarse aquí composiciones fúngicas de fuentes fúngicas que producen una composición celulasa fúngica incompleta. Por ejemplo, se sabe que ciertos hongos producen composiciones celulasa libres de componentes CBH. Véase, por ejemplo, Coughlan et al., *Biochemistry and Genetics of Cellulose Degradation*, Aubert et al. Editors, pág. 11-30 (Academic Press, 1988) describe que los hongos de podredumbre parda no producen aparentemente componentes CBH, pero puede ser posible que uno o más de estos componentes sean componentes tipo CBH I. Por otro lado, si una cantidad  
 15 suficientes de las endoglucanasas producidas por dichos hongos son, por los presentes objetivos, componentes tipo EG, entonces sería posible utilizar dicha celulasa en la práctica de la presente invención sin enriquecimiento para obtener la relación necesaria de componentes EG respecto componentes tipo CBH I.

Adicionalmente, puede añadirse una cantidad requerida de uno o más componentes tipo CBH purificados por procedimientos convencionales a una composición celulasa producida a partir de un microorganismo modificado genéticamente de manera que sea incapaz de producir componentes tipo CBH, de manera que se consiga una relación determinada de componentes tipo EG respecto uno o más componentes CBH, es decir, una composición celulasa libre de todos los componentes del tipo CBH de manera que se enriquezca en componentes tipo EG puede formularse de manera que contenga un 1% en peso  
 20 de un componente tipo CBH I simplemente añadiendo esta cantidad de un componente de tipo CBH I purificado a la composición celulasa.

El término "componentes  $\beta$ -glucosidasa (BG)" se refiere a aquellos componentes de celulasa que muestran actividad BG; es decir que dichos componentes actuarán a partir de extremo no reductor de la celobiosa y otros celooligosacáridos solubles ("celobiosa") y darán glucosa como único producto. Los componentes BG no se adsorben sobre o no reaccionan con polímeros de glucosa. Además, dichos componentes BG son inhibidos competitivamente por la glucosa ( $K_i$  aproximadamente de 1mM). En sentido estricto, los componentes BG no son literalmente celulasas porque no pueden degradar la celulosa, dichos componentes están incluidos en la definición de sistema celulasa porque estas enzimas facilitan la degradación general de la celulosa mediante la continuación de la degradación de productos de degradación de la celulosa inhibidora (particularmente celobiosa) producida por la acción combinada de los componentes CBH y los componentes EG. Sin la presencia de componentes BG, tendrá lugar una hidrólisis moderada o escasa de celulosa cristalina. Los componentes BG se caracterizan habitualmente sobre substratos arílicos tales como el p-nitrofenol B-D-glucósido (PNPG) y por lo tanto se les denomina habitualmente  
 35 aril-glucosidasas. Debe destacarse que no todas las aril-glucosidasas son componentes BG en que algunas no hidrolizan la celobiosa.

Se contempla que la presencia o ausencia de los componentes BG en la composición celulasa puede utilizarse para regular la actividad de los componentes CBH. Específicamente, debido a que la celobiosa se produce durante la degradación de la celulosa por los componentes CBH y debido a que se sabe que las elevadas concentraciones de celobiosa inhiben la actividad CBH y además debido a que dicha celobiosa es hidrolizada a glucosa por los componentes BG, la ausencia de componentes BG en la composición celulasa detendrá la actividad CBH cuando la concentración de celobiosa alcanza niveles inhibidores. También se contempla que pueden añadirse uno o más aditivos (por ejemplo celobiosa, glucosa, etc) a la composición  
 40 celulasa para detener efectivamente, directa o indirectamente, alguna o toda la actividad tipo CBH I asó como otras actividades CBH. Cuando se emplean dichos aditivos, la composición resultante se considera una composición adecuada para su utilización en la presente invención si la cantidad de aditivo empleada es suficiente para disminuir la actividad tipo CBH I a niveles iguales o inferiores que los niveles de actividad tipo CBH I alcanzados utilizando las composiciones de celulasa descritas aquí.

Por otro lado, una composición celulasa que contiene cantidades añadidas de componentes BG puede aumentar la hidrólisis global de la celulosa si el nivel de celobiosa generado por los componentes CBH se  
 50



hace restrictivo de dicha hidrólisis general en ausencia de componentes BG añadidos.

Métodos para aumentar o disminuir la cantidad de componentes BG en la composición celulosa se describen en la patente U.S. n°07/625.140, presentada el 10 de diciembre de 1990 con referencia del agente n°010055-056 y titulada "Sacarificación de celulosa mediante el clonaje y amplificación del gen de la  $\beta$ -glucosidasa de *Trichoderma reesei*" cuya solicitud se incorpora aquí como referencia.

Las celulasas fúngicas pueden contener más de un componente BG. Los diferentes componentes tienen en general diferentes puntos isoelectrónicos que permiten su separación mediante cromatografía de intercambio iónico y similares. Puede emplearse un componente BG sencillo o una combinación de componentes BG.

Cuando se emplea en una composición detergente, el componente BG se añade en general en una cantidad suficiente para prevenir la inhibición de los componentes CBH y EG y en particular componentes de celulosa tipo CBH I por la celobiosa. La cantidad de componente BG añadido depende de la cantidad de celobiosa producida en el lavado de detergente, que puede determinarse fácilmente por un experto en la técnica. Sin embargo, cuando se emplea, el porcentaje en peso de componente BG respecto a los componentes tipo CBH en la composición celulosa es preferentemente desde aproximadamente un 0,2% hasta aproximadamente un 10% en peso, y más preferentemente, desde aproximadamente un 0,5% hasta aproximadamente un 5% en peso.

Las celulasas fúngicas preferidas para utilizar en la preparación de las composiciones celulosa fúngicas utilizadas en la presente invención son aquellas obtenidas a partir de *Trichoderma reesei*, *Trichoderma koningii*, *Penicillium sp.*, *Humicola insolens* y similares. Algunas celulasas fúngicas son accesibles comercialmente, por ejemplo CELLUCAST (accesible en Novo Industry, Copenhague, Dinamarca), RAPISASA (accesible en Gist Brocades, N.V., Delft, Holanda), CYTOLASA 123 (accesible en Genencor International, San Francisco Sur, California) y similares. Otras celulasas fúngicas pueden aislarse fácilmente mediante procedimientos de fermentación y aislamiento reconocidos en el estado de la técnica.

El término "tejido que contiene algodón" se refiere a tejidos cosidos o sin coser hechos de algodón puro o mezclas de algodón que incluyen telas tejidas de algodón, tricots de algodón, driles de algodón similares. Cuando se emplean mezclas de algodón, la cantidad de algodón en el tejido debe ser al menos aproximadamente un 40% en peso de algodón; preferentemente más de un 60% en peso de algodón; y más preferentemente más de un 75% en peso de algodón. Cuando se emplea como mezclas, el material acompañante empleado en el tejido puede incluir una o más fibras que no sean de algodón, incluyendo fibras sintéticas tales como fibras de poliamida (por ejemplo nylon 6 y nylon 66), fibras acrílicas (por ejemplo fibras de poliacrilonitrilo), fibras de poliéster (por ejemplo tereftalato de polietileno), fibras de alcohol polivinílico (por ejemplo Vinyon), fibras de cloruro de polivinilo, fibras de cloruro de polivinilideno, fibras de poliuretano, fibras de poliurea y fibras de poliamidas aromáticas. Se contempla que la celulosa regenerada, por ejemplo el rayon, puede utilizarse como un sustituto del algodón en tejidos que contienen algodón.

El término "agente activo de superficie o surfactante" se refiere a surfactantes aniónicos, no iónicos y anfóteros bien conocidos para su utilización en composiciones detergentes.

El término "medio de lavado" se refiere a una solución de lavado acuosa preparada por la adición de una cantidad imprescindible de una composición detergente (surfactante) al agua. El medio de lavado contiene en general una cantidad efectiva limpiadora del detergente.

El medio de lavado se define como un "medio de lavado ácido" si el pH del medio es desde aproximadamente 4 hasta menos de aproximadamente 7. El medio de lavado se define como "medio de lavado neutro" si el pH del medio es aproximadamente 7. El medio de lavado se define como "medio de lavado alcalino" si el pH del medio es desde aproximadamente 7 hasta aproximadamente 10. Preferentemente, el medio de lavado alcalino tendrá un pH desde aproximadamente 7 hasta aproximadamente 9 e, incluso más preferentemente, desde aproximadamente 7 hasta aproximadamente 8. La presente invención se refiere al descubrimiento de que los componentes de tipo EG pueden utilizarse en composiciones detergentes para provocar un efecto suavizante así como una retención/restauración del color y tacto de los tejidos que contienen algodón independientemente de qué composiciones se empleen en medio de lavado ácido, neutro o alcalino. Sin embargo, debido a que las composiciones detergentes se emplean generalmente en condiciones alcalinas, la composición celulosa empleada es preferentemente una que posea alguna actividad bajo dichas condiciones. Las composiciones de celulosa preferidas incluyen aquellas derivadas de *T. reesei* y *Humicola insolens*. Las composiciones celulosa de *Humicola insolens* se conocen en el estado de

la técnica por mantener una actividad significativa bajo condiciones alcalinas.

Aunque es necesaria la presencia de componentes de tipo EG para provocar una retención/restauración de color, una suavidad y un tacto mejorado, las mezclas especificadas de componentes de tipo EG y tipo CBH (incluyendo los componentes de tipo CBH I) también muestra los mismos beneficios e incluso algunos beneficios adicionales. Específicamente, aunque la utilización de los componentes EG provoca un cierto beneficio limpiador, se observa un beneficio limpiador incrementado para tejidos que contienen algodón lavados con una composición detergente que contiene una composición celulosa que contiene uno o más componentes tipo EG y que contiene componentes celulosa tipo CBH I. Adicionalmente, aunque la utilización de componentes EG provoca un efecto suavizante, puede conseguirse un beneficio suavizante adicional incorporando algunos componentes tipo CBH I con los componentes tipo EG.

Por otro lado, la presencia de cantidades significativas de componentes tipo CBH I en combinación con componentes tipo EG provoca una pérdida de fuerza mejorada de los tejidos que contienen algodón en comparación con composiciones de celulosa que están libres de componentes tipo CBH I o que contienen cantidades reducidas de componentes tipo CBH I. De acuerdo con esto, para minimizarlas características de pérdida de fuerza de las composiciones detergentes que contienen celulosa, las composiciones detergentes de la presente invención emplean composiciones celulosa que contienen uno o más componentes tipo EG y menos de un 5 % en peso, y preferentemente menos de un 2 % en peso de componentes tipo CBH I. Las composiciones detergentes que contienen dichas composiciones celulosa proporcionan las mejoras deseadas a los tejidos que contienen algodón a la vez que proporcionan una pérdida de fuerza reducida en comparación con las composiciones detergentes que contienen una composición celulosa que tiene cantidades mayores de componentes tipo CBH I.

También en relación con lo descrito más arriba, la selección de una composición celulosa específica para su utilización en la composición detergente de la presente invención se realiza contrapesando el deseo de un beneficio limpiador incrementado conseguido por la presencia de algunos componentes tipo CBH I con el beneficio de resistencia a pérdida de fuerza que dicta la utilización de una cantidad mínima o la no-utilización de componentes tipo CBH I. Es decir, si el énfasis primario para incorporar celulosa en la composición detergente es para mejorar la suavidad, la retención/restauración del color y mejorar el tacto de los tejidos que contienen algodón con la mínima pérdida posible de fuerza del tejido que contiene algodón, entonces la celulosa empleada en la composición detergente debe comprender preferentemente uno o más componentes tipo EG libres de todos los componentes tipo CBH I.

Por otro lado, si el énfasis primario para incorporar celulosa en la composición detergente es para la retención/restauración del color, la mejora de la suavidad y la mejora del tacto de los tejidos que contienen algodón, en conjunto con un incremento del beneficio limpiador, entonces la celulosa empleada en la composición detergente debe contener una celulosa que comprenda uno o más componentes tipo EG así como algunos componentes tipo CBH I (aunque menos que aproximadamente el 5 % en peso, preferentemente menos que aproximadamente el 2 % en peso, basado sobre el peso total de proteínas de la composición celulosa).

En relación con lo anterior, la cantidad de celulosa empleada generalmente en las composiciones detergentes de la presente invención es una cantidad suficiente para impartir retención/restauración del color y suavidad a las prendas de algodón. Preferentemente, las composiciones celulosa se emplean desde aproximadamente un 0,01 % en peso hasta aproximadamente un 5 % en peso relativo al peso de la composición detergente total. Más preferentemente, las composiciones celulosa se emplean desde aproximadamente un 0,05 % en peso hasta aproximadamente un 2 % en peso con relación al peso de la composición detergente total. La concentración específica de la celulosa empleada en la composición detergente se selecciona de manera que por dilución en un medio de lavado, la concentración de los componentes tipo EG vaya desde aproximadamente 0,5 hasta aproximadamente 500 ppm y preferentemente desde aproximadamente 2 hasta aproximadamente 100 ppm. La cantidad específica de celulosa empleada en la composición detergente dependerá de la cantidad de componentes tipo EG en las composiciones celulosa así como la extensión en que la composición detergente se diluya por la adición de agua para formar un medio de lavado. Estos factores son fácilmente determinables por un experto en la técnica.

Preferentemente, las composiciones celulosa empleadas en las composiciones detergentes de la presente invención contienen al menos aproximadamente un 20 % en peso de componentes tipo endoglucanasa basado sobre el peso total de proteína en la composición celulosa, más preferentemente al menos aproximadamente el 50 % en peso, y aún más preferentemente, al menos el 70 % en peso, y más preferentemente, al menos aproximadamente el 90 % en peso de componentes tipo endoglucanasa basado sobre el peso total de proteína en la composición celulosa.

A concentraciones de celulasa menores (es decir, concentraciones de componentes tipo EG menores que aproximadamente 5 ppm en el medio de lavado), la mejora en suavidad, retención/restauración de color y tacto proporcionados mediante la utilización de concentraciones detergentes de la presente invención es más evidente después de lavados repetidos. A concentraciones mayores (es decir, concentraciones de componentes tipo EG de aproximadamente 5 ppm y mayores en el medio de lavado), las mejoras pueden ser perceptibles en un único lavado.

Uno de los aspectos importantes de la presente invención es que diseñando a medida la composición celulasa para que contenga uno o más componentes EG y para que contenga cantidades mínimas de componentes tipo CBH I, es posible conseguir los efectos deseados de suavidad, retención/restauración del color y tacto mejorado a la vez que se reduce la pérdida de fuerza del tejido que contiene algodón.

Adicionalmente, la utilización de dichas composiciones de celulasa diseñadas a medida permite la utilización de concentraciones menores de celulasa en la composición detergente. Por su parte, la utilización de concentraciones menores de celulasa en las composiciones detergentes debería conducir a una mejora de la seguridad del consumidor.

La composición celulasa tal y como se ha descrito más arriba puede añadirse a la composición detergente en un diluyente líquido, en gránulos, en emulsiones, en geles, en pastas y similares. Dichas formas son bien conocidas por los expertos en la técnica. Cuando se emplea una composición detergente sólida, la composición celulasa se formula preferentemente como gránulos. Preferentemente, los gránulos pueden formularse de manera que contenga un agente protector de la celulasa. Véase, por ejemplo, la patente U.S. N° 07/642.669 presentada el 17 de enero de 1991 con referencia del agente N°010055-073 y titulada "Gránulos que contienen una enzima y un agente protector de enzima y composiciones detergentes que contienen dichos gránulos", solicitud que se incorpora aquí como referencia en su totalidad. De manera similar, el gránulo puede formularse de manera que contenga materiales que reduzcan la velocidad de disolución del gránulo en el medio de lavado. Dichos materiales y gránulos se describen en la patente U.S. de N°07/642.596 presentada el 17 de enero de 1991, con referencia del agente N°GCS-171-US1 y titulada "Composiciones granulares", solicitud que se incorpora aquí como referencia en su totalidad.

Las composiciones detergentes de la presente invención emplean un agente activo de superficie, es decir, un surfactante, incluyendo surfactantes aniónicos, no iónicos y anfóteros bien conocidos por su utilización en composiciones detergentes.

Los surfactantes aniónicos adecuados para utilizar en la composición detergente de la presente invención incluyen alquilbencensulfonatos lineales o ramificados; sulfatos de éteres de alquilo o alquénilo que tienen grupos alquílicos o alquenílicos lineales o ramificados; sulfatos alquílicos o alquenílicos; olefinsulfonatos; alcan-sulfonatos y similares. Algunos ejemplos de contraiones adecuados para surfactantes aniónicos incluyen iones de metales alcalinos tales como sodio y potasio; iones de metales de tierras alcalinas tales como calcio y magnesio; ión amonio; y alcanolaminas que tienen de 1 a 3 grupos alcohol de número de átomos de carbono 2 ó 3.

Los surfactantes anfóteros incluyen los sulfonatos de sales de amonio cuaternario, los surfactantes anfóteros tipo betaína y similares. Dichos surfactantes anfóteros tienen grupos cargados positivos y negativos en la misma molécula. Los surfactantes no iónicos generalmente comprenden éteres de polioxi-alquilenos así como alcanolamidas de ácidos grasos superiores o aductos de óxido de alquilenos de los mismos, monoésteres de glicerina de ácidos grasos y similares.

En la solicitud de patente británica N° 2 094 826 A, la descripción de la cual se incorpora aquí como referencia, se describen surfactantes adecuados para utilizar en la presente invención.

También pueden utilizarse mezclas de dichos surfactantes.

El surfactante o mezcla de surfactantes se emplea generalmente en las composiciones detergentes de la presente invención en una cantidad desde aproximadamente el 1 % en peso hasta aproximadamente el 95 % en peso de la composición detergente total y preferentemente desde aproximadamente el 5 % en peso hasta aproximadamente el 45 % en peso de la composición detergente total. Tras la dilución del medio de lavado, la concentración de surfactante es generalmente aproximadamente de 500 ppm o más; y preferentemente desde aproximadamente 1000 ppm hasta 15000 ppm.

Además de la composición celulasa y del (de los) surfactante(s), las composiciones detergentes de la

presente invención pueden contener opcionalmente uno o más de los siguientes componentes:

*Hidrolasas excepto celulasa*

5 Dichas hidrolasas incluyen hidrolasas de éster carboxílico, hidrolasas de tioéster, hidrolasas de monoéster fosfato y hidrolasas de diéster fosfato, que actúan sobre el enlace éster; hidrolasas de glicósido que actúan sobre compuestos glicosílicos; una enzima que hidroliza compuestos N-glicosílicos; hidrolasas de tioéster que actúa sobre el enlace éter; y hidrolasas de  $\alpha$ -aminoácilpeptido, hidrolasas de aminoácido peptídico, hidrolasas de aminoácido acílico, hidrolasas de dipéptido e hidrolasas de peptidilpeptido que  
 10 actúa sobre el enlace peptídico. Entre ellas se prefiere las hidrolasas de éster carboxílico, las hidrolasas de glicósido y las hidrolasas de peptidilpeptido. Algunas hidrolasas adecuadas incluyen (1) proteasas que pertenecen a la hidrolasa de peptidilpeptido tal como pepsina, pepsina B, renina, tripsina, quimiotripsina A, quimiotripsina B, elastasa, enteroquinasa, catepsina C, papaína, quimopapaína, ficina, trombina, fibro-  
 15 lisina, renina, subtilisina, aspergillopeptidasa A, collagenasa, clostridiopeptidasa B, kalikreina, gastrisina, catepsina D, bromelina, queratinasa, quimiotripsina C, pepsina C, aspergillopeptidasa B, uroquinasa, carboxipeptidasa A y B y aminopeptidasa; (2) hidrolasas de glicósido (se excluye de este grupo la celu-  
 20 lasa, que es un ingrediente esencial)  $\alpha$ -amilasa,  $\beta$ -amilasa, glucoamilasa, invertasa, liozima, pectinasa, quitinasa y dextranasa. Entre ellas se prefiere la  $\alpha$ -amilasa y la  $\beta$ -amilasa. Estas hidrolasas funcionan en sistemas de ácidos a neutros, pero las que se obtienen de bacterias muestran una elevada actividad en  
 sistemas alcalinos; (3) hidroxilasas de éster carboxílico incluyendo esterasa carboxílica, lipasa, pectina, esterasa y clorofilasa. La lipasa es especialmente efectiva entre ellas.

Los nombres comerciales de los productos comerciales y productores son tal y como sigue: "Alka-  
 25 lase", "Esperase", "Savinase", "AMG", "BAN", "Fungamill", "Sweetzyme", "Thermamyl" (Novo Indus-  
 try, Copenhagen, Dinamarca); "Maksatase", "High-alkaline protease", "Amylase THC", "Lipase" (Gist  
 Brocades, N.V., Delft, Holanda); "Protease B-400", "Protease B-4000", "Protease AP", "Protease AP  
 2100" (Schwizerische Ferment A.G., Basilea, Suiza); "CRD Protease" (Monsanto Company, St. Louis,  
 Missouri); "Piocase" (Piopin Corporation, Monticello, Illinois); "Pronase P", "Pronase AS", "Pronase  
 30 AF" (Kaken Chemical Co., Ltd, Japón); "Lapidase P-2000" (Lapidas, Secran, Francia); productos de  
 proteasa (tamiz estándar Tyler, 100% sobre 16 mesh y 100% de 150 mesh) (Clington Corn Products,  
 Division of Standard Brands Corp., Nueva York); "Takamine", "Bromelain 1:10", "HT Protease 200",  
 "Enzyme L-W" (obtenida de hongos, no de bacterias) (Miles Chemical Company, Elkhart, Ind.); "Rhoz-  
 yme P-11 Conc.", "Pectinol", "Lipase B", "Rhozyme PF", "Rhozyme J-25" (Rohm & Haas, Genencor,  
 San Francisco Sur, CA); "Ambrozyme 200" (Jack Wolf & Co., Ltd, Subsidiaria de Nopco Chemical Com-  
 35 pany, Newark, N.J.); "ATP 40", "ATP 120", "ATP 160" (Lapides, Secran, Francia); "Oripasa" (Nagase  
 & Co., Ltd, Japón).

En la composición detergente se incorporan hidrolasas diferentes de celulasa en la medida requerida  
 según el propósito. Debe incorporarse preferentemente en una cantidad de 0,001 a 5% en peso, y más  
 40 preferentemente de 0,02 a 3% en peso, en términos de hidrolasa purificada. Esta enzima debe utilizarse  
 en forma de gránulos hechos de enzima cruda sola o en combinación con otros componentes en la compo-  
 sición detergente. Los gránulos de enzima crudo se utilizan en una cantidad tal que la enzima purificada  
 está presente en un 0,001 a 50% en peso en los gránulos. Los gránulos se utilizan en una cantidad de 0,002  
 45 a 20 y preferentemente de 0,1 a 10% en peso. De la misma manera que con las celulastas, estos gránulos  
 pueden formularse de manera que contengan un agente protector de enzima y un material retardante de  
 la disolución.

*Surfactantes catiónicos y sales de ácidos grasos de cadena larga*

50 Dichos surfactantes catiónicos y sales de ácidos grasos de cadena larga incluyen sales de ácidos grasos  
 saturados o insaturados, sales de ácidos carboxílicos de éteres de alquilo o alquenoilo, sales o ésteres  
 de  $\alpha$ -sulfoácidos grasos, surfactantes tipo aminoácido, surfactantes de éster fosfato, sales de amonio  
 cuaternario que incluyen aquellas que tienen de 3 a 4 substituyentes alquílicos y hasta 1 substituyente  
 55 alquílico substituido por fenilo. Algunos surfactantes catiónicos y sales de ácidos grasos de cadena larga  
 adecuadas se describen en la solicitud de patente británica N°2 094 826 A, la descripción de la cual  
 se incorpora aquí como referencia. La composición puede contener desde aproximadamente 1 hasta  
 aproximadamente 20% en peso de dichos surfactantes catiónicos y sales de ácidos grasos de cadena larga.

60

*Mejoradores*

A. Agentes secuestradores divalentes

5 La composición puede contener desde aproximadamente 0 hasta aproximadamente 50 % en peso de uno o más componentes mejorador seleccionados entre el grupo que consiste en sales de metales alcalinos y sales de alcanolamina de los siguientes compuestos: fosfatos, fosfonatos, fosfonocarboxilatos, sales de aminoácidos, aminopoliacetatos, electrolitos de elevado peso molecular, polímeros que no se disocian, sales de ácidos dicarboxílicos y sales de aluminosilicato. En la solicitud de patente británica N°2 094  
10 826 A, la descripción de la cual se incorpora aquí como referencia, se describen agentes secuestradores divalentes adecuados.

B. Álcalis o electrolitos inorgánicos

15 La composición puede contener desde aproximadamente el 1 hasta aproximadamente el 50 % en peso, preferentemente desde aproximadamente el 5 % hasta aproximadamente el 30 % en peso, basado en la composición de una o más sales de metales alcalinos de los siguientes compuestos, como álcalis o electrolitos inorgánicos: silicatos, carbonatos y sulfatos así como álcalis orgánicos tales como trietanolamina, dietanolamina, monoetanolamina y triisoproparnolamina.

20 *Agentes antiredeposición*

La composición puede contener además desde aproximadamente un 0,1 % hasta aproximadamente un 5 % en peso de uno o más de los siguientes componentes como agentes antiredeposición: polietilenglicol, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona y carboximetilcelulosa.

Entre ellos, una combinación de carboximetilcelulosa o/y polietilenglicol con la composición celulosa de la presente invención proporciona una composición que elimina la suciedad especialmente útil.

30 *Agentes de mezclado*

La utilización de la celulosa de la presente invención en combinación de un agente de mezclado tal como percarbonato sódico, perborato sódico, aducto sulfato sódico/peróxido de hidrógeno y aducto cloruro sódico/peróxido de hidrógeno o/y un colorante de mezclado fotosensible tal como sal de zinc o aluminio de una ftalocianina sulfonado mejora aún más los efectos detergentes.

*Agentes de azulado y colorantes fluorescentes*

40 En la composición pueden incorporarse varios agentes de azulado y colorantes fluorescentes si es necesario. En la solicitud de patente británica N°2 094 826 A se describen agentes de azulado y colorantes fluorescentes adecuados. La descripción de dicha solicitud se incorpora aquí como referencia.

*Inhibidores de aglutinación*

45 Los siguientes inhibidores de aglutinación pueden incorporarse en el detergente en polvo: sales de ácido p-toluensulfónico, sales de ácido xilensulfónico, sales de ácido acético, sales de ácido sulfosuccínico, talco, sílica finamente pulverizada, arcilla, silicato cálcico (tal como Micro-Cell o Johns Manville Co.), carbonato cálcico y óxido magnésico.

50 *Agentes enmascarantes de factores que inhiben la actividad celulasa*

La composición celulosa de la presente invención se desactivan en algunos casos en presencia de iones o compuestos de cobre, zinc, cromo, mercurio, plomo, manganeso o plata. Algunos agentes quelantes de metales y agentes precipitantes de metales son efectivos contra estos inhibidores. Estos incluyen, por ejemplo, agentes secuestradores de iones metálicos divalentes tal y como indica en la lista del apartado anterior con referencia a los aditivos opcionales así como silicato magnésico y sulfato magnésico.

60 La celobiosa, la glucosa y la gluconolactona actúan a veces como inhibidores. Se prefiere evitar la co-presencia de estos sacáridos con la celulosa en la medida de lo posible. En caso de que la co-presencia sea inevitable, es necesario evitar el contacto directo de los sacáridos con la celulosa, por ejemplo recubriéndolos.

## ES 2 144 401 T3

Las sales de ácidos grasos de cadena larga y los surfactantes catiónicos actúan como inhibidores en algunos casos. Sin embargo, la copresencia de estas sustancias con la celulosa es permisible si el contacto directo de ellos se previene mediante algunos medios tales como formación de pastillas o recubrimiento.

5 Los agentes enmascarantes anteriores y los métodos pueden emplearse, si fuera necesario, en la presente invención.

### *Activadores de celulosa*

10 Los activadores varían dependiendo de la variedad de las celulasas. En presencia de proteínas, cobalto y sus sales, magnesio y sus sales, calcio y sus sales, potasio y sus sales, sodio y sus sales o monosacáridos tales como manosa y xilosa, las celulasas se activan y sus poderes detergentes mejoran remarcablemente.

### *Antioxidantes*

15 Los antioxidantes incluyen, por ejemplo, el tert-butilhidroxitolueno, el 4,4'-butilidenedis(6-tert-butil-3-metilfenol), el 2,2'-butilidenedis(6-tert-butil-4-metilfenol), el cresol monoestirenado, el cresol diestirenado, el fenol monoestirenado, el fenol diestirenado y el 1,1-bis(4-hidroxifenil)ciclohexano.

20 *Solubilizantes*

Los solubilizantes incluyen, por ejemplo, alcoholes inferiores tales como el etanol, sales de bencenosulfonatos, sales de alquilbencenosulfonato inferior tales como sales de p-toluensulfonato, glicoles tales como propilenglicol, sales de acilbencenosulfonato, acetamidas, amidas de ácidos piridindicarboxílicos, sales de benzoato y urea.

25 La composición detergente de la presente invención puede utilizarse en un amplio rango de pH desde pH ácido hasta pH alcalino. En una realización preferida, la composición detergente de la presente invención puede utilizarse en un medio de lavado detergente alcalino y más preferentemente, medio de lavado detergente alcalino que tenga un pH desde por encima de 7 hasta no más que aproximadamente 8.

35 Aparte de los ingredientes anteriores, pueden utilizarse perfumes, tampones, conservantes, colorantes y similares, si se desea, con las composiciones detergentes de la presente invención. Dichos componentes se emplean convencionalmente en cantidades hasta ahora utilizadas en el estado de la técnica.

40 Cuando una base detergente utilizada en la presente invención está en forma de polvo, puede ser una base preparada mediante cualquier método de preparación conocido incluyendo un método de secado de atomización y un método de granulación. Se prefiere la base detergente obtenida particularmente mediante el método de secado de atomización y/o el método de granulación de secado de atomización. La base detergente obtenida mediante el método de secado de atomización no se restringe con respecto a las condiciones de preparación. La base detergente obtenida mediante el método de secado de atomización son gránulos huecos que se obtienen polvORIZANDO una suspensión acuosa de ingredientes resistentes al calor, tales como agentes activos de superficie y mejoradores en un espacio caliente. Los granulos tienen un tamaño desde 50 hasta 2000 micrometros. Después del secado de atomización, pueden añadirse perfumes, 45 enzimas, agentes blanqueadores, mejoradores alcalinos inorgánicos. Con una base detergente altamente densa y granular obtenida mediante el método de granulación y secado de atomización, pueden añadirse también varios ingredientes después de la preparación de la base.

50 Cuando la base detergente es un líquido, puede ser bien una solución homogénea o una dispersión no homogénea. Para remover la descomposición de la carboximetilcelulosa mediante la celulosa en el detergente, es deseable que la carboximetilcelulosa sea granulada o esté recubierta antes de la incorporación en la composición.

55 Las composiciones detergentes de la presente invención se utilizan para aplicaciones industriales y domésticas a temperaturas y relaciones de líquido empleadas convencionalmente en estos ambientes.

60 Además de su utilización en detergentes de lavandería, las composiciones detergentes descritas aquí pueden utilizarse adicionalmente en una etapa de prelavado en la solución apropiada a un pH intermedio en el cual existe una actividad suficiente para proporcionar las mejoras deseadas en la retención/restauración del color, efecto suavizante y tacto. Cuando la composición celulosa se emplea en una composición de preremolaje (es decir, prelavado), como composición líquida, en spray, en gel o en pasta, la composición

celulosa se emplea generalmente desde aproximadamente un 0,01 % hasta aproximadamente un 20 % en peso basado en el peso total de la composición de preremajo. En dichas composiciones, puede emplearse opcionalmente un surfactante y cuando éste se emplea, está presente generalmente en una concentración desde aproximadamente un 0,01 % hasta aproximadamente un 20 % en peso basado en el peso total de la composición de preremajo. El resto de la composición comprende componentes convencionales utilizados en el preremajo, por ejemplo, diluyente, tampones, otras enzimas (proteasas) y similares en sus concentraciones convencionales. De acuerdo con esto, dichas composiciones preremajo comprenden concentración desde aproximadamente el 0 % hasta aproximadamente un 20 % en peso de un surfactante y concentración desde aproximadamente un 0,01 % hasta aproximadamente un 20 % en peso de una celulosa que comprende uno o más componentes tipo EG y menos de aproximadamente un 5 % en peso de componentes tipo CBH I.

Además, se entiende que las composiciones celulosa descritas aquí pueden utilizarse también para utilización en casa como una composición autónoma adecuada para la restauración del color de tejidos desteñidos. Véase, por ejemplo, la patente U.S. N° 4.738.682, que se incorpora aquí como referencia en su totalidad.

Los siguientes ejemplos se ofrecen para ilustrar la presente invención y no deben de ninguna manera interpretarse como limitativos del alcance de la presente invención.

## Ejemplos

Los ejemplos 1-12 y 20-28 demuestran la preparación de *Trichoderma reesei* modificado mediante ingeniería genética de manera que sea incapaz de producir uno o más componentes celulosa o de manera que sobreproduzca componentes celulosa específicos.

### Ejemplo 1

#### *Selección de derivados pyr4 de Trichoderma reesei*

El gen pyr4 codifica la orotidina-5'-monofosfatodescarboxilasa, una enzima requerida para la biosíntesis de uridina. El inhibidor tóxico ácido 5-fluoroorótico (FOA) se incorpora en la uridina mediante células de tipo salvaje y por tanto envenena las células. Sin embargo, las células defectuosas en el gen pyr4 son resistentes a este inhibidor pero requieren la uridina para crecer. Por lo tanto, es posible seleccionar cepas de derivados de pyr4 utilizando FOA. En la práctica, se extendieron esporas de la cepa de *T. reesei* RL-37 (Sheir-Neiss, G. Y Montenecourt, B.S., Appl. Microbiol. Biotechnol. 20, p. 46-53 (1984)) sobre la superficie de un medio solidificado que contenía 2 mg/ml de uridina y 1,2 mg/ml de FOA. Aparecieron colonias resistentes a FOA de forma espontánea dentro de los siguientes tres a cuatro días y fue posible identificar a continuación aquellos derivados resistentes a FOA que requerían uridina para crecer. Para identificar aquellos derivados que tienen un gen pyr4 defectivo, se generaron protoplastos y se transformaron con un plásmido que contiene un gen pyr4 ver los ejemplos 3 y 4). A continuación de la transformación, los protoplastos se cultivaron en un medio que carecía de uridina. El subsiguiente crecimiento de las colonias transformadas demostró la complementación de un gen pyr4 defectivo mediante el gen pyr4 introducido por el plásmido. De esta manera, se identificó la cepa GC69 como un derivado pyr4 de la cepa RL-P37.

### Ejemplo 2

#### *Preparación del vector de delección CBH I*

Se clonó un gen cbh1 que codifica la proteína CBH I a partir del ADN genómico de una cepa de *T. reesei* RL-P37 mediante hibridización con una sonda oligonucleotídica sideada sobre la base de la secuencia publicada de este gen utilizando métodos de síntesis de sondas conocidos (Shoemaker et al., 1983b). El gen cbh1 se ubica en un fragmento de *PstI* 6,5 kb y se inserta en pUC4K cortado con *PstI* (adquirido de Pharmacia Inc., Piscataway, NJ) reemplazando el gen Kan' de este vector utilizando técnicas conocidas en el estado de la técnica, técnicas que se exponen en Maniatis et al., (1989) y que se incorporan aquí como referencia. El plásmido resultante, pUC4K::cbh1 se cortó entonces con *HindIII* y el fragmento más grande, de aproximadamente 6 kb se aisló y religó para dar pUC4K::cbh1 $\Delta$ H/H (ver Fig. 1). Este procedimiento elimina la secuencia codificante cbh1 entera y las secuencias flanqueantes aproximadamente 1,2 kb secuencia arriba y 1,5 kb secuencia abajo. Aproximadamente permanece 1 kb de ADN flanqueante desde cada extremo del fragmento *PstI* original.

## ES 2 144 401 T3

El gen pyr4 de *T. reesei* se clonó como un fragmento de ADN genómico de *HindIII* de 6,5 kb en pUC18 para formar pT pyr2 (Smith et al., 1991) siguiendo los procedimientos de Maniatis et al., véase más arriba. El plásmido pUC4K::cbhI $\Delta$ H/H se cortó con *HindIII* y los extremos se defosforilaron con fosfatasa alcalina intestinal de ternero. Este ADN defosforilado final se ligó con el fragmento de *HindIII* de 6,5 kb que contenía el gen pyr4 de *T. reesei* para dar p $\Delta$ CBHIpyr4. La Fig.1 ilustra la construcción de este plásmido.

### Ejemplo 3

#### *Aislamiento de protoplastos*

Se obtuvo micelio inoculando 100 ml de YEG (0,5 % de extracto de levadura, 2 % de glucosa) en un recipiente de 500 ml con aproximadamente  $5 \times 10^7$  esporas de *T. reesei* GC69 (la cepa del derivado pyr4). A continuación se incubó el recipiente a 37°C bajo agitación durante 16 horas. El micelio se recogió mediante centrifugación a 2.750xg. El micelio recogido se lavó con una solución 1,2 M de sorbitol y se resuspendió en 40 ml de una solución que contenía 5 mg/ml de solución Novozym<sup>R</sup>234 (que es el nombre comercial de un sistema enzimático multicomponente que contiene 1,3-alfa-glucanasa, 1,3-beta-glucanasa, laminarinasa, xilanasa, quitinasa y proteasa de Novo Biolabs, Danbury, Ct.);

5 mg/ml de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 0,5 mg/ml de albúmina de suero bovina; 1,2 M de sorbitol. Los protoplastos se separaron de los fragmentos celulares mediante filtración a través de Miracloth (Calbiochem Corp, La Jolla, CA) y se recogieron por centrifugación a 2.000xg. Los protoplastos se lavaron tres veces en sorbitol 1,2 M y una vez en sorbitol 1,2 M, 50 mM de CaCl<sub>2</sub>, se centrifugaron y se resuspendieron a una densidad aproximada de  $2 \times 10^8$  protoplastos por ml de sorbitol 1,2 M, CaCl<sub>2</sub> 50 mM.

### Ejemplo 4

#### *Transformación de los protoplastos fúngicos con p $\Delta$ CBHIpyr4*

Se añadieron 200  $\mu$ l de la suspensión de protoplastos preparada en el Ejemplo 3 a 20  $\mu$ l de p $\Delta$ CBHIpyr4 digerido con EcoRI (preparado en el Ejemplo 2) en tampón TE (Tris 10 mM, pH 7,4; EDTA 1 mM) y 50  $\mu$ l de una solución de polietilenglicol (PEG) que contiene un 25 % de PEG 4000, KCl 0,6 M y CaCl<sub>2</sub> 50 mM. Esta mezcla se incubó en hielo durante 20 minutos. Después de este periodo de incubación, se añadió 2,0 ml de la solución de PEG anteriormente identificada, la solución se mezcló y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Después de esta segunda incubación, se añadió 4,0 ml de una solución que contenía sorbitol 1,2 M y CaCl<sub>2</sub> 50 mM y se volvió a mezclar esta solución. La solución de protoplastos se añadió inmediatamente a alícuotas fundidas de Medio de Vogel N (3 g de citrato sódico, 5 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 g de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, 0,2 g de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,1 g de CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 5  $\mu$ g  $\alpha$ -biotina, 5 mg de ácido cítrico, 5 mg de ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1 mg de Fe(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0,25 mg de CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 50  $\mu$ g de MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O por litro) que contenían un 1 % de glucosa, sorbitol 1,2 M y un 1 % de agarosa adicionales. La mezcla protoplasto/medio se vertió sobre un medio sólido que contenía el mismo medio de Vogel que se ha indicado más arriba. No había uridina presente en el medio y por lo tanto sólo las colonias transformadas eran capaces de crecer como consecuencia de la complementación de la mutación the pyr4 de la cepa GC69 mediante el inserto de gen pyr4 de tipo salvaje en p $\Delta$ CBHIpyr4. Estas colonias se transfirieron a continuación y se purificaron sobre un medio de Vogel N sólido que contenía como aditivo un 1 % de glucosa y se escogieron los transformantes estables para su análisis posterior.

Es este estadio, se distinguieron los transformantes estables de los transformantes inestables por su velocidad de crecimiento más rápida y la formación de colonias circulares con un perfil suave más que irregular sobre medio de cultivo sólido que carecía de uridina. En algunos casos se hizo además un test de estabilidad haciendo crecer los transformantes sobre un medio no selectivo sólido (es decir, que contiene uridina) recogiendo las esporas de este medio y determinando el porcentaje de estas esporas que a continuación germinarán y crecerán sobre un medio selectivo que carece de uridina.

### Ejemplo 5

#### *Análisis de los transformantes*

El ADN se aisló de los transformantes obtenidos en el Ejemplo 4 después de hacerlos crecer en medio líquido de Vogel N que contenía un 1 % de glucosa. Estas muestras de ADN transformantes se cortaron



además con una enzima de restricción *PstI* y se sometieron a electroforesis en gel de agarosa. El gel se transfirió a un filtro de membrana Nytran y se hibridó con una sonda pΔCBHIIpyr4 marcada con <sup>32</sup>P. La sonda se seleccionó para identificar el gen cbh1 nativo como un fragmento de PstI de 6,5 kb, el gen nativo pyr4 y cualquier secuencia de ADN derivada del fragmento de ADN transformante.

5

Las bandas radioactivas de la hibridación se visualizaron mediante autorradiografía. La autorradiografía se ve en la Fig.3. Se hicieron correr cinco muestras, tal y como se describe más arriba, a partir de ahora, muestras A, B, C, D y E. El carril E es la cepa GC69 no transformada y se utilizó como un control en el presente análisis. Los carriles A-D representan transformantes obtenidos mediante los procedimientos descritos más arriba. Los números en el lateral de la autorradiografía representan los tamaños de los marcadores de pesos moleculares. Tal y como puede verse en esta autorradiografía, el carril D no contiene la banda CBHI de 6,5 kb, indicativo de que este gen ha sido totalmente deleccionado en el transformante mediante la integración del fragmento de ADN en el gen cbh1. La cepa con cbh1 deleccionado se llama P37PΔCBHI. La Figura 2 muestra la deleción del gen cbh1 de *T. reesei* mediante la integración a través de un acontecimiento de entrecruzamiento del fragmento más grande de EcoRI de pΔCBHIIpyr4 en el locus cbh1 sobre uno de los cromosomas de *T. reesei*. Los demás transformantes analizados fueron idénticos a la cepa control no transformada.

#### Ejemplo 6

20

##### *Análisis de los transformantes con pIntCBHI*

El mismo procedimiento del Ejemplo 5 se utilizó en este ejemplo, excepto en que la sonda utilizada se cambió a una sonda pIntCBHI marcada con <sup>32</sup>P. La sonda es un plásmido del tipo pUC que contiene un fragmento de BgIII de 2 kb del locus cbh1 in la región que fue deleccionada en pUC4K::cbh1ΔH/H. Se hicieron correr dos muestras en este ejemplo, incluyendo un control, la muestra A, que es la cepa no transformada GC69 y el transformante P37PΔCBHI, muestra B. Tal y como puede verse en la Fig. 4, la muestra A contenía el gen cbh1, tal y como indica la banda a 6,5 kb; sin embargo, el transformante, la muestra B, no contiene esta banda de 6,5 kb y por lo tanto no contiene el gen cbh1 y no contiene ninguna secuencia derivada del plásmido pUC.

#### Ejemplo 7

##### *Secreción de la Proteína mediante la cepa P37PΔCBHI*

35

Las esporas de la cepa P37PΔCBHI producida se inocularon en 50 ml de un medio basal de *Trichoderma* que contenía un 1 % de glucosa, un 0,14 % de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, un 0,2 % de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, un 0,03 % de MgSO<sub>4</sub>, un 0,03 % de urea, un 0,75 % de bacto triptona, un 0,05 % de Tween 80, un 0,00016 % de CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O, un 0,001 % de FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, un 0,000128 % de ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, un 0,000054 % de Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O, un 0,0000007 % de MnCl<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O). El medio se incubó bajo agitación en un recipiente de 250 ml a 37°C durante aproximadamente 48 horas. El micelio resultante se recogió mediante filtración a través de Miracloth (Calbiochem Corp.) y se lavó dos o tres veces con fosfato potásico 17 mM. El micelio se suspendió finalmente en fosfato potásico 17 mM con soforosa 1 mM y se incubó durante 24 horas a 30°C bajo agitación. Se recogió el sobrenadante de estos cultivos y se descartó el micelio. Las muestras del sobrenadante del cultivo se analizaron mediante enfoque isoelectrico utilizando sistema Phastgel de Pharmacia y geles prefabricados de pH 3-9 siguiendo las intrucciones del fabricante. El gel se tiñó con colorante de plata para visualizar las bandas de proteína. La banda correspondiente a la proteína cbh1 estaba ausente en la muestra derivada de la cepa P37PΔCBHI, tal y como se muestra en la Fig. 5. El gel de enfoque isoelectrico muestra varias proteínas en diferentes cultivos de sobrenadante de *T. reesei*. El carril A es CBHI parcialmente purificado; el carril B es el sobrenadante de un cultivo de *T. reesei* no transformado; el carril C es el sobrenadante de la cepa P37PΔCBHI producida de acuerdo con los procedimientos de la presente invención. La posición de varios componentes celulasa se etiquetaron como CBHI, CBHII, EGI, EGII y EGIII. Dado que CBHI constituye un 50 % de la proteína extracelular total, es la proteína secretada en mayor cantidad y por lo tanto es la banda más oscura en el gel. Este gel de enfoque isoelectrico muestra claramente el agotamiento de la proteína CBHI en la cepa P37PΔCBHI.

#### Ejemplo 8

##### *Preparación de pPΔCBHII*

60

El gen cbh2 de *T. reesei* que codifica la proteína CBHII se ha clonado como un fragmento de EcoRI de 4,1 kb de la misma (Chen et al., 1987, *Biotechnology*, 5:274:278). Este fragmento de 4,1 kb se insertó

## ES 2 144 401 T3

entre las dianas de EcoRI de pUC4XL. El último plásmido es un derivado de pUC (construido por R.M. Berka, Genencor International Inc.) que contiene un sitio de clonación múltiple con un patrón simétrico de dianas de restricción de endonucleasas colocadas en el orden indicado a continuación: EcoRI, BamHI, SacI, SmaI, HindIII, XhoI, BglIII, ClaI, BglIII, XhoI, HindIII, SmaI, SacI, BamHI, EcoRI. Utilizando  
5 métodos conocidos en el estado de la técnica, se ha construido un plásmido, p $\Delta$ CBHII (Fig. 6), en el cual se ha eliminado una región central de 1,7 kb de este gen entre una diana HindIII (a 74 pb 3' del punto de inicio de traslación de CBHII) y una diana ClaI (a 265 pb 3' del último codón de CBHII) y se ha reemplazado por un fragmento de ADN de 1,6 kb HindIII-ClaI que contiene el gen pyr4 de *T. reesei*.

10 El gen pyr4 de *T. reesei* se excindió de pTpyr2 (véase el Ejemplo 2) sobre un fragmento NheI-SphI de 1,6 kb y se insertó entre las dianas SphI y XbaI de pUC219 (véase el Ejemplo 23) para crear p219M (Smith et al., 1991, *Curr. Genet.*, 19, p.27-33). El gen pyr4 se eliminó entonces como un fragmento HindIII-ClaI que tenía siete pb de ADN en un extremo y seis pb de ADN en el otro extremo derivado del  
15 sitio de clonación múltiple de pUC219 y se insertó en las dianas HindIII y ClaI del gen cbh2 para formar el plásmido p $\Delta$ CBHII (véase la Fig. 6B).

La digestión de este plásmido con EcoRI liberará un fragmento que tiene 0,7 kb de ADN flanqueante del locus cbh2 en un extremo, 1,7 kb de ADN flanqueante del locus cbh2 en el otro extremo y del gen  
20 pyr4 de *T. reesei* en el medio.

### Ejemplo 9

#### *Delección del gen cbh2 en la cepa GC69 de T. reesei*

25 Se generarán protoplastos de la cepa GC69 y se transformarán con p $\Delta$ CBHII digerido con EcoRI siguiendo los procedimientos descritos en los Ejemplos 3 y 4. Se digerirá ADN de los transformantes con EcoRI y Asp718 y se someterán a electroforesis en gel de agarosa. El ADN del gel se transferirá a un filtro de membrana y se hibridizará con p $\Delta$ CBHII marcado con <sup>32</sup>P de acuerdo con los procedimientos  
30 del Ejemplo 11. Se identificarán los transformantes que tienen una sola copia del fragmento de EcoRI de p $\Delta$ CBHII integrado precisamente en el locus cbh2. Los transformantes también se harán crecer en recipientes de agitación como en el Ejemplo 7 y se examinará la proteína en los sobrenadantes del cultivo mediante enfoque isoeléctrico. De esta manera, se generarán los transformantes GC69 de *T. reesei* que no producen la proteína CBHII.

### 35 Ejemplo 10

#### *Generación de un derivado pyr4 de P37P $\Delta$ CBHI*

40 Se extendieron esporas del transformante (P37P $\Delta$ CBHI) que se deleccionó del gen cbh1 en un medio que contenía FOA. Un derivado pyr4 de este transformante se obtuvo a continuación utilizando los procedimientos del Ejemplo 1. Esta cepa pyr4 se designó P37P $\Delta$ CBHIPyr26.

### Ejemplo 11

#### 45 *Delección del gen cbh2 en una cepa a la que se ha deleccionado previamente cbh1*

Se generaron protoplastos de la cepa P37P $\Delta$ CBHIPyr26 y se transformaron con p $\Delta$ CBHII digerido con EcoRI de acuerdo con los procedimientos descritos en los Ejemplos 3 y 4.  
50

Los transformantes estables purificados se cultivaron en recipientes de agitación shaker como en el Ejemplo 7 y el sobrenadante del cultivo de la proteína se examinó mediante enfoque isoeléctrico. Se identificó un transformante (designado P37P $\Delta$ CBH67) que no producía ninguna proteína CBHII. El carril D de la Fig. 5 muestra el sobrenadante de un transformante en el que se ha deleccionado los genes  
55 cbh1 y cbh2 producido de acuerdo con los procedimientos de la presente invención.

Se extrajo ADN de la cepa P37P $\Delta$ CBH67 digerida con EcoRI y Asp718 y se sometió a electroforesis en gel de agarosa. El ADN de este gel se transfirió a un filtro de membrana y se hibridó con p $\Delta$ CBHII (Fig. 7). El carril A de la Fig. 7 muestra el patrón de hibridación observado para ADN de una cepa  
60 de *T. reesei* no transformada. Se observó el fragmento de EcoRI de 4,1 kb que contiene el gen de tipo salvaje cbh2. El carril B muestra el patrón de hibridación observado para la cepa P37P $\Delta$ CBH67. La única banda de 4,1 kb se ha eliminado y se ha reemplazado por dos bandas de aproximadamente 0,9 y 3,1

kb. Este es el patrón esperado si una sola copia del fragmento de EcoRI de p $\Delta$ CBHII se ha integrado precisamente en el locus cbh2.

5 Las mismas muestras de ADN se digirieron también con EcoRI y se llevó a cabo un análisis Southern blot tal y como se describe más arriba. En este ejemplo, la sonda era pIntCBHII marcada con  $^{32}$ P. Este plásmido contiene una porción de la secuencia que codifica el gen cbh2 que se había deleccionado en el plásmido p $\Delta$ CBHII. No se observó hibridación con el ADN de la cepa P37P $\Delta$ CBH67, mostrando que el gen cbh2 se había deleccionado y que no estaban presentes en esta cepa secuencias derivadas del plásmido pUC.

10 Ejemplo 12

#### *Construcción de pEGIpyr4*

15 El gen egI1 de *T. reesei*, que codifica EGI se ha clonado como un fragmento de ADN genómico de HindIII de 4,2 kb de la cepa RL-P37 mediante la hibridación con oligonucleótidos sintetizados de acuerdo con la secuencia publicada (Penttila et al., 1986, Gene 45:253-263; van Arsdell et al., 1987, *Bio/Technology* 5:60-64). Un fragmento de 3,6 kb de HindIIIBamHI se extrajo de este clon y se ligó con un fragmento de 1,6 kb de HindIII-BamHI que contenía el gen pyr4 de *T. reesei* obtenido a partir de pTyr2 (véase el  
20 Ejemplo 2) y pUC218 (idéntico al pUC219, véase el Ejemplo 23, pero con el sitio de clonación múltiple en orientación contraria) cortado con HindIII para dar el plásmido pEGIpyr4 (Fig. 8). La digestión de pEGIpyr4 con HindIII liberaría un fragmento de ADN que contiene solo ADN genómico de *T. reesei* (genes egI1 y pyr4) excepto por el ADN sintético secuenciado de 24 pb entre los dos genes y 6 pb de  
25 ADN sintético secuenciado a un extremo (véase la Fig. 8).

El Ejemplo 13 demuestra el aislamiento de los componentes de Celulasa Cytolasa 123 (una composición celulasa fúngica completa obtenida a partir de *Trichoderma reesei* y disponible en Genencor International, Inc., San Francisco Sur, CA) mediante procedimientos de purificación.

30 Ejemplo 13

#### *Purificación de Celulasa Cytolasa 123 en Componentes Celulasa*

35 La celulasa CYTOLASA 123 se fraccionó de la siguiente manera. La distribución normal de componentes celulasa en este sistema celulasa es tal y como sigue:

CBH I 45-55 % en peso

40 CBH II 13-15 % en peso

EG I 11-13 % en peso

EG II 8-10 % en peso

45 EG III 1- 4 % en peso

BG 0,5-1 % en peso

50 El fraccionamiento se realizó utilizando columnas que contenían las siguientes resinas: resina de filtración en gel Sephadex G-25 de Sigma Chemical Company (St. Louis, Mo), resina de intercambio aniónico QA Trisacryl M y resina de intercambio catiónico SP Trysacryl M de IBF Biotechnics (Savage, Md). Se desalaron 0,5 g de celulasa CYTOLASA 123 utilizando una columna de 3 litros de resina de filtración en gel Sephadex G-25 con tampón fosfato sódico 10 mM a pH 6,8. Entonces se cargó la solución desalada en una columna de 20 ml de resina de intercambio aniónico QA Trisacryl M. La fracción  
55 unida sobre esta columna contenía CBH I y EG I. Estos componentes se separaron mediante elución en gradiente utilizando un gradiente acuoso que contenía cloruro sódico en una concentración desde 0 hasta aproximadamente 500 mM. La fracción no unida sobre esta columna contenía CBH II y EG II. Estas fracciones se desalaron utilizando una columna de resina de filtración en gel Sephadex G-25 equilibrada con citrato sódico 10 mM, pH 3,3. 200 ml de esta solución se cargaron en una columna de 20 ml de  
60 resina de intercambio catiónico SP Trisacryl M. CBH II y EG II se eluyeron separadamente utilizando un gradiente acuoso que contenía cloruro sódico en una concentración desde 0 hasta aproximadamente

200 mM.

Los siguientes procedimientos son similares al del Ejemplo 13 anterior, otros sistemas celulasa que pueden separarse en sus componentes incluyen CELLUCAST (accesible en Novo Industry, Copenhague, Dinamarca), RAPIDASE (accesible en Gist Brocades, N.V., Delft, Holanda) y sistemas celulasa derivados de *Trichoderma koningii*, *Penicillium* sp. y similares.

#### Ejemplo 14

##### 10 Purificación de EG III de celulasa Cytolasa 123

El Ejemplo 13 anterior demuestra el aislamiento de diferentes componentes a partir de celulasa Cytolasa 123. Si embargo, dado que EG III está presente en muy pequeñas cantidades en la celulasa Cytolasa 123, los siguientes procedimientos se emplean para aislar este componente.

15

##### A. Extracción a gran escala de la enzima celulasa EG III

Se calentaron cien litros de filtrado de celulasa libre de células a aproximadamente 30°C. El material calentado se llevó a PEG 8000 (polietilenglicol, PM aproximadamente 8000) en un 4% peso/volumen y sulfato sódico anhidro en aproximadamente un 10%. La mezcla formó una mezcla líquida en dos fases. Las fases se separaron utilizando una centrifuga de pila de discos SA-1. Las fases se analizaron utilizando geles de enfoque isoelectrico de tinción con plata. El fraccionamiento y el enriquecimiento se obtuvieron para EG III y xilanasa. La composición recuperada contenía aproximadamente de un 20 a un 50% en peso de EG III.

25

Respecto al procedimiento anterior, la utilización de un polietilenglicol de peso molecular substancialmente inferior a aproximadamente 8000 dio una separación inadecuada; mientras que la utilización de un polietilenglicol de peso molecular substancialmente superior a aproximadamente 8000 provocó la exclusión de las enzimas deseadas en la composición recuperada. Respecto a la cantidad de sulfato sódico, los niveles de sulfato sódico substancialmente superiores a aproximadamente el 20% en peso/volumen provocó problemas de precipitación; mientras que niveles de sulfato sódico substancialmente inferiores a aproximadamente el 10% en peso/volumen dio una separación pobre o la solución permaneció en una sola fase.

35

##### B. Purificación de EG III a través de fraccionamiento

La purificación de EG III se llevó a cabo mediante fraccionamiento a partir de una composición celulasa fúngica completa (celulasa CYTOLASA 123, accesible comercialmente a partir de Genencor Internacional, San Francisco Sur, CA), producida por *Trichoderma reesei* de tipo salvaje. Específicamente, el fraccionamiento se realiza utilizando columnas que contienen las siguientes resinas: resina de filtración en gel Sephadex G-25 de Sigma Chemical Company (St. Louis, Mo), resina de intercambio aniónico QA Trisacryl M y resina de intercambio catiónico SP Trysacryl M de IBF Biotechnics (Savage, Md). Se desalaron 0,5 g de celulasa CYTOLASA 123 utilizando una columna de 3 litros de resina de filtración en gel Sephadex G-25 con tampón fosfato sódico 10 mM a pH 6,8. Entonces se cargó la solución desalada en una columna de 20 ml de resina de intercambio aniónico QA Trisacryl M. La fracción unida sobre esta columna contenía CBH I y EG I. La fracción no unida sobre esta columna contenía CBH II y EG II. Estas fracciones se desalaron utilizando una columna de resina de filtración en gel Sephadex G-25 equilibrada con citrato sódico 10 mM, pH 4,5. 200 ml de esta solución se cargaron en una columna de 20 ml de resina de intercambio catiónico SP Trisacryl M. EG III se eluyó con 100 ml de una solución acuosa de cloruro sódico 200 mM.

50

Para aumentar la eficiencia del aislamiento de EG III, puede ser deseable emplear *Trichoderma reesei* modificado genéticamente para sobreexpresar EG III y/o ser incapaces de producir uno o más componentes EG I, EG II, CBH I y/o CBH II. Esto conducirá necesariamente a un aislamiento de EG III más eficiente mediante, por ejemplo, el fraccionamiento y/o la extracción de PEG tal y como se ha descrito más arriba.

60

De manera similar, puede ser deseable que las composiciones EG III descritas más arriba se purifiquen aún más para proporcionar composiciones EG III substancialmente puras, es decir, composiciones que contengan EG III en un porcentaje superior a aproximadamente el 80% en peso de proteína. Por ejemplo, dicha proteína EG III substancialmente pura puede obtenerse utilizando un material obtenido partiendo desde el procedimiento A al procedimiento B o viceversa. Un procedimiento particular para purificar más

## ES 2 144 401 T3

EG III es mediante fraccionamiento de una muestra de EG III obtenida en el apartado b) de este Ejemplo 14. La siguiente fracción se realizó sobre un sistema de FPLC utilizando una columna 5/5 Mono-S-HR (accesible de Pharmacia LB Biotechnology, Piscataway, NJ). El fraccionamiento se realizó desalando 5 ml de la muestra de EG III preparada en el apartado b) de este Ejemplo 14 con una columna de 20 ml de Sephadex G-25 que se había equilibrado previamente con citrato sódico 10 mM pH 4. A continuación se eluyó la columna en un gradiente acuoso 0-200 mM de NaCl a una velocidad de 0,5 ml/min con muestras recogidas en fracciones de 1 ml. El componente EG III se recogió en las fracciones 10 y 11 y se determinó que era superior al 90 % de pureza mediante electroforesis en gel SDS. El componente EG III de esta pureza es adecuado para determinar la secuencia aminoacídica N terminal mediante técnicas conocidas.

El componente EG III substancialmente puro así como los componentes EG I y EG II purificados en el Ejemplo 13 anterior pueden utilizarse de manera singular o en mezclas en los métodos de la presente invención. Estos componentes EG tienen las siguientes características:

	PM	pI	PH óptimo <sup>1</sup>
EG I	-47-49 kD	4,7	-5
EG II	-36 kD	5,5	-5
EG III	-25-28 kD	7,4	-5,5-6,0

La utilización de una mezcla de estos componentes en la práctica de la presente invención puede dar una respuesta singérgica en la mejora de la suavidad, de la retención/restauración del color y/o del tacto en comparación con un componente aislado. Por otro lado, la utilización de un componente aislado en la práctica de la presente invención podría ser más estable o tener un espectro de actividad más amplio sobre un rango de pHs. Por ejemplo, el Ejemplo 15 más abajo muestra que EG III tienen una actividad considerable contra RBB-CMC bajo condiciones alcalinas.

### Ejemplo 15

#### *Actividad de composiciones celulasa sobre un rango de pH*

El siguiente procedimiento se empleó para determinar los perfiles de pH de dos composiciones celulasa diferentes. La primera composición celulasa era una composición celulasa a la que se había deleccionado CBH I y CBH II preparada a partir de *Trichoderma reesei* modificado genéticamente de una manera similar a la descrita más arriba de manera que es incapaz de producir componentes CBH I y CBH II. En tanto que esta composición celulasa no contiene CBH I y CBH II, que generalmente comprenden desde aproximadamente el 58 % hasta el 70 % de una composición celulasa derivada de *Trichoderma reesei*, esta composición celulasa estará enriquecida necesariamente en componentes EG, es decir, EG I, EG II, EG III y similares.

La segunda composición celulasa era una fracción aproximadamente del 20-40% de pureza de EG III aislado a partir de una composición celulasa derivada de *Trichoderma reesei* mediante métodos de purificación similares al apartado b) del Ejemplo 14.

La actividad de estas composiciones celulasa se determinó a 40°C y las determinaciones se realizaron utilizando los siguientes procedimientos.

Se añade de 5 a 30  $\mu$ l de una solución de enzima apropiada a una concentración suficiente para proporcionar la cantidad requerida de enzima en la solución final. Se añade 250  $\mu$ l de RBB-CMC al 2% (Remazol Brilliant Blue R-Carboxymethylcellulose-accesible comercialmente en MegaZyme, 6 Altona Place, North Rocks, N.S.W.2151, Australia) en un tampón citrato/fosfato 0,05 M a pH 4, 5, 5,5, 6,5, 7, 7,5 y 8.

Se agita en el vórtex y se incuba a 40°C durante 30 minutos. Se enfría en un baño de hielo durante de 5 a 10 minutos. Se añade 1000  $\mu$ l de metilcelosolve que contiene acetato sódico 0,3 M y acetato de zinc 0,02 M. Se agita en el vórtex y se deja reposar durante 5-10 minutos. Se centrifuga y se vierte el sobrenadante en cubetas. La actividad enzimática relativa se determinó midiendo la densidad óptica (OD) de la solución en cada cubeta a 59 nm. Niveles superiores de densidad óptica corresponden a niveles superiores de actividad enzimática.

## ES 2 144 401 T3

Los resultados de este análisis se presentan en la Fig. 9, que ilustra a actividad relativa de la composición celulosa a la que se ha deleccionado CBH I y CBH II en comparación con la composición celulosa EG III. A partir de esta figura, se ve que la composición celulosa a la que se ha deleccionado CBH I y CBH II posee una actividad celulolítica óptima contra RBB-CMC a pH cerca de 5,5 y tiene alguna actividad a pHs alcalinos, es decir a pHs desde por encima de 7 a 8. Por otro lado, la composición celulosa enriquecida en EG III posee una actividad celulolítica óptima a aproximadamente pH 5,5-6 y posee una actividad significativa a pHs alcalinos.

### Ejemplo 16

#### Ensayo de pérdida de fuerza de composiciones celulosa mediante el launderómetro

El objetivo de este ejemplo es examinar la capacidad de diferentes composiciones celulosa de reducir la fuerza de tejidos que contienen algodón. Debido a la actividad de la mayoría de los componentes celulosa derivados de *Trichoderma reesei* es mayor a pH 5 o cercano a 5, los resultados de pérdida de fuerza serán más evidentes cuando el ensayo se realiza a aproximadamente este pH. Sin embargo, se cree que los resultados conseguidos a pH 5 correlacionan con los resultados de pérdida de fuerza que tendrán lugar a otros pHs y en consecuencia, son indicativos de la capacidad de pérdida de fuerza relativa de los componentes celulosa analizados.

Específicamente, en este ejemplo, la primera composición celulosa analizada era una composición celulosa fúngica completa (celulosa CYTOLASA 123 accesible comercialmente en Genencor International, San Francisco Sur, CA) producida por *Trichoderma reesei* de tipo salvaje y se identifica como GC010.

La segunda composición celulosa analizada era una composición celulosa a la que se había deleccionado CBH II preparada a partir de *Trichoderma reesei* modificado genéticamente de una manera similar a la de los Ejemplos 1-12 más arriba y 20-28 más debajo de manera que sea incapaz de expresar CBH II y se identifica como CBHIIId. En tanto que CBH II comprende hasta aproximadamente el 15% de composición celulosa, la deleción de este componente provoca niveles enriquecidos de CBH I todos los componentes EG.

La tercera composición celulosa analizada era una composición celulosa a la que se había deleccionado CBH I y CBH II preparada a partir de *Trichoderma reesei* modificado genéticamente de una manera similar a la descrita más arriba de manera que sea incapaz de expresar CBH I y CBH II y se identifica como CBHI/IId. En tanto que CBH I y CBH II comprende hasta aproximadamente el 70% de composición celulosa, la deleción de este componente provoca niveles enriquecidos de todos los componentes EG.

La última composición celulosa analizada era una composición celulosa a la que se había deleccionado CBH I preparada a partir de *Trichoderma reesei* modificado genéticamente de una manera similar a la descrita más arriba de manera que sea incapaz de expresar CBH I y se identifica como CBHIId. En tanto que CBH I comprende hasta aproximadamente el 55% de composición celulosa, la deleción de este componente provoca niveles enriquecidos de CBH II y de todos los componentes EG.

Se analizó el efecto de las composiciones celulosa descritas más arriba sobre la pérdida de fuerza de tejidos que contienen algodón en un launderómetro. En primer lugar se normalizaron las composiciones de manera que se utilizaban cantidades iguales de los componentes EG. Entonces se añadió cada composición celulosa a soluciones separadas de 400 ml de un tampón citrato/fosfato 20 mM, valorado a pH 5 y que contiene 0,5 ml de un surfactante no iónico. Cada una de las soluciones resultantes se añadió a un recipiente metálico hermético de launderómetro separado. En estos recipiente metálico herméticos se añadió una cantidad de mármoles para facilitar la pérdida de fuerza así como un tejido de algodón de 16 pulgadas x 20 pulgadas (100% algodón tejido, accesible como Style N°467 en Test Fabrics, Inc., 200 Blackford Ave., Middlesex, NJ 08846). A continuación se cerró el recipiente metálico hermético y se bajó hasta hacerlo entrar dentro del baño del launderómetro que se mantuvo a 43°C. Entonces se rotó el recipiente metálico hermético en el baño a una velocidad de al menos 40 revoluciones por minuto (rpms) durante aproximadamente 1 hora. Después se extrajo la tela, se aclaró bien y se secó en un secador estándar.

Para maximizar los resultados de pérdida de fuerza, el procedimiento anterior se repitió dos veces más y después del tercer tratamiento, los tejidos de algodón se extrajeron y se analizó la pérdida de fuerza. La pérdida de fuerza se midió determinando la fuerza tensil en la dirección de relleno ("FTS") utilizando un Analizador Instron y los resultados se compararon con el FTS del tejido tratado en la misma solución

## ES 2 144 401 T3

a excepción de que no se añadió celulosa. Los resultados de este análisis se describen como % de pérdida de fuerza, que se determina como sigue:

$$\% \text{ Pérdida de Fuerza} = 100 \times \left[ 1 - \frac{\text{FTS con celulosa}}{\text{FTS sin celulosa}} \right]$$

Los resultados de este análisis se presentan en la Fig. 10, que muestra que las composiciones que contienen celulosa a la que se ha deleccionado CBH I, es decir, celulosa completa (GC010) y CBH II, poseían la mayor pérdida de fuerza mientras que las composiciones que no contenían CBH I poseían una pérdida de fuerza reducida en comparación con la celulosa completa y la celulosa a la que se ha deleccionado CBH II. A partir de estos resultados, se ve que la presencia de CBH I en una composición celulosa otorga una pérdida de fuerza incrementada a la composición en comparación con una composición similar que no contiene CBH I.

De manera similar, estos resultados muestran que CBH II juega algún papel en la pérdida de fuerza.

En consecuencia, en vista de estos resultados, cuando se desean composiciones celulosa resistentes a la pérdida de fuerza, dichas composiciones deben estar libres de todos los componentes celulosa tipo CBH I y preferentemente, de todos los componentes tipo CBH. Con respecto a esto último, se contempla que las composiciones celulosa enriquecidas en EG provocarán una pérdida de fuerza incluso menor a  $\text{pH} \geq 7$  que aquellos resultados observados a  $\text{pH} 5$  mostrados en la Fig. 10.

### Ejemplo 17

#### Restauración de color

La capacidad de la celulosa enriquecida en EG para restaurar el color en tejidos que contienen algodón se analizó en los siguientes experimentos. Específicamente, la restauración de color en una tela tejida de algodón se produce por la acumulación en el tejido de fibras de superficie sobre un periodo de tiempo. Estas fibras dan lugar a una apariencia descolorida y enmarañada al tejido y de acuerdo con esto, la eliminación de estas fibras es un prerequisite necesario para restaurar el color nitido original al tejido. En vista de lo descrito más arriba, estos experimentos determinan la capacidad de una composición celulosa de restaurar el color midiendo la capacidad de la composición celulosa de eliminar fibras de superficie.

El primer experimento mide la capacidad de un sistema celulosa completo (celulosa Cytolasa 123 disponible comercialmente en Genencor International, Inc., San Francisco Sur, CA) producido por *Trichoderma reesei* de tipo salvaje de eliminar fibras de superficie a partir de un tejido que contiene algodón sobre varios pHs. Se analizó la capacidad de esta celulosa de eliminar fibras de superficie en un laundrometro. Se añadió una cantidad apropiada de celulosa para proporcionar 25 ppm o 100 ppm de celulosa en la composición final en soluciones separadas de 400 ml de un tampón citrato/fosfato 20 mM que contenía 0,5 ml de un surfactante no iónico. Las muestras se prepararon y se valoraron de manera que se proporcionaban muestras a  $\text{pH} 5$ ,  $\text{pH} 6$ ,  $\text{pH} 7$  y  $\text{pH} 7,5$ . Cada una de las soluciones resultantes se añadió a un recipiente metálico hermético de laundrometro separado. En estos recipiente metálico herméticos se añadió una cantidad de mármoles para facilitar la pérdida de fuerza así como un tejido de algodón de 7 pulgadas x 5 pulgadas (100% algodón tejido, accesible como Style N°439W en Test Fabrics, Inc., 200 Blackford Ave., Middlesex, NJ 08846). A continuación se cerró el recipiente metálico hermético y el recipiente metálico hermético se bajo hasta entrar dentro del baño del laundrometro que se mantuvo a  $43^\circ\text{C}$ . Entonces se rotó el recipiente metálico hermético en el baño a una velocidad de al menos 40 revoluciones por minuto (rpms) durante aproximadamente 1 hora. Después se extrajo la tela, se aclaró bien y se secó en un secador estándar.

Se analizó entonces la eliminación de fibras en el tejido tratado de esta manera mediante evaluación en un panel de análisis. En particular, se estimó los niveles de fibra en los tejidos codificados (es decir, no marcados) de 6 individuos. Se evaluó visualmente las fibras de superficie de los tejidos y se estimó en una escala de 0 a 6. Esta escala tiene seis estándares para permitir comparaciones con significado. Los estándares son tal y como siguen:

## ES 2 144 401 T3

Estimación	Estándar <sup>2</sup>
0	Tejido no tratado con celulasa
1	Tejido tratado <sup>3</sup> con 8 ppm de celulasa
2	Tejido tratado con 16 ppm de celulasa
3	Tejido tratado con 20 ppm de celulasa
4	Tejido tratado con 40 ppm de celulasa
5	Tejido tratado con 50 ppm de celulasa
6	Tejido tratado con 100 ppm de celulasa

2 En todos los estándares, el tejido era un tejido de análisis estandarizado de lencería de sábanas de algodón (Style N°439W) disponible en Test Fabrics, Inc., 200 Blackford Ave, Middlesex, NJ 08846

3 Para todas las muestras tratadas con la misma composición celulasa. Las concentraciones de celulasa están como proteína total. Las condiciones de tratamiento en el launderómetro son las mismas que las descritas en el Ejemplo 16 más arriba.

Se proporcionó la estimación del tejido a analizar que igualaba mejor uno de los estándares. Después del análisis completo de los tejidos, se sumaron los valores asignados a cada tejido para cada uno de los individuos y se generó un valor medio.

Los resultados de este análisis se presentan en la Fig. 11. Específicamente, la Fig. 11 ilustra que al mismo pH se observa una respuesta dependiente de la dosis en la cantidad de fibras eliminada. Es decir, que a un mismo pH, los tejidos tratados con más celulasa proporcionaron niveles mayores de eliminación de fibras en comparación con los tejidos tratados con menos celulasa. Además, los resultados de esta figura demuestran que a pHs más elevados, la eliminación de fibras puede efectuarse todavía simplemente utilizando concentraciones más elevadas de celulasa.

En un segundo experimento, se comparó la capacidad de eliminar fibras de dos composiciones celulasa diferentes. Específicamente, la primera composición celulasa analizada era un sistema celulasa completa (celulasa CYTOLASA 123, accesible comercialmente en Genencor International, San Francisco Sur, CA) producida por *Trichoderma reesei* de tipo salvaje y se identifica como GC010.

La segunda composición celulasa analizada era una composición celulasa a la que se había delecionado CBH I y CBH II preparada a partir de *Trichoderma reesei* modificado genéticamente de una manera similar a la descrita más arriba de manera que sea incapaz de expresar CBH I y CBH II y se identifica como CBHI/Iid. En tanto que CBH I y CBH II comprende hasta aproximadamente el 70% de composición celulasa, la deleción de este componente provoca niveles enriquecidos de todos los componentes EG.

Primero se normalizaron las composiciones celulasa de manera que se utilizaron cantidades similares de componentes EG. Se analizó la capacidad de estas composiciones eliminar fibras de superficie en un launderómetro. Se añadió una cantidad apropiada de celulasa para proporcionar las concentraciones requeridas de componentes EG en las composiciones finales a soluciones separadas de 400 ml de un tampón citrato/fosfato 20 mM, valorado a pH 5 y que contiene 0,5 ml de un surfactante no iónico. Cada una de las soluciones resultantes se añadió a un recipiente metálico hermético de launderómetro separado. En estos recipiente metálicos herméticos se añadió una cantidad de mármoles para facilitar la pérdida de fuerza así como un tejido de algodón de 7 pulgadas x 5 pulgadas (100% algodón tejido, accesible como Style N°439W en Test Fabrics, Inc., 200 Blackford Ave., Middlesex, NJ 08846). A continuación se cerró el recipiente metálico hermético y el recipiente metálico hermético se bajo hasta entrar dentro del baño del launderómetro que se mantuvo a 43°C. Entonces se rotó el recipiente metálico hermético en el baño a una velocidad de al menos 40 revoluciones por minuto (rpms) durante aproximadamente 1 hora. Después se extrajo la tela, se aclaró bien y se secó en un secador estándar.

Entonces se analizó la eliminación de fibras en los tejidos tratados de esta manera mediante evaluación en el panel de análisis descrito más arriba. Los resultados de este análisis se presentan en la Fig. 12. La Fig. 12 ilustra que tanto la composición celulasa GC010 como la CBHI/Iid dieron resultados de eliminación de fibras idénticos cuando se utilizan cantidades iguales de EG. Estos resultados sugieren que son los componentes EG los que proporcionan la eliminación de fibras. Estos resultados junto a los resultados de la Fig. 11 demuestran que los componentes EG pueden eliminar fibras incluso bajo



## ES 2 144 401 T3

condiciones alcalinas.

### Ejemplo 18

#### 5 Restauración de color en el tergotómetro

Este ejemplo es complementario al Ejemplo 17 y comprueba que los componentes tipo CBH no son necesarios para la restauración del color. El objetivo de este ejemplo es examinar la capacidad de composiciones celulasa deficientes en componentes tipo CBH de restaurar el color en tejidos que contienen algodón. Debido a que la actividad de la mayoría de los componentes EG derivados de *Trichoderma reesei* es mayor que pH 5 o cercana a pH 5, los resultados de restauración de color serán más evidentes cuando el ensayo se lleva a cabo a aproximadamente este pH. Sin embargo, se cree que los resultados conseguidos a pH 5 correlacionan con los resultados de restauración de color que tendrían lugar a otros pHs, y en consecuencia son indicativos de la capacidad de restauración de color relativa de los componentes celulasa  
15 analizados.

Específicamente, la composición celulasa empleada en este ejemplo era una composición celulasa a la que se había deleccionado CBH I y CBH II preparada a partir de *Trichoderma reesei* modificado genéticamente de una manera similar a la descrita más arriba de manera que sea incapaz de expresar  
20 CBH I y CBH II. En tanto que CBH I y CBH II comprende hasta aproximadamente el 70% de composición celulasa, la deleción de este componente provoca niveles enriquecidos de todos los componentes EG.

El ensayo se llevó a cabo añadiendo una concentración suficiente de esta composición celulasa a un tampón fosfato 50 mM para proporcionar 500 ppm de celulasa. La solución se valoró a pH 5 y contenía un 0,1% en peso de un surfactante no iónico (Grescoterg GL 100 –disponible comercialmente en Gresco Mfg., Thomasville, NC 27360). Entonces se colocó un tejido que contenía algodón desteñido de 10 pulgadas x 10 pulgadas en 1 litro de este tampón y se dejó reposar a 110°F durante 30 minutos y después se agitó durante 30 minutos a 100 rotaciones por minuto. A continuación se extrajeron los tejidos del tampón,  
30 se lavaron y se secaron. Los tejidos resultantes se compararon con el tejido anterior al tratamiento. Los resultados de este análisis son tal y como siguen:

Material que contiene algodón	Resultado
Camiseta tejida en algodón	Beneficio observado
Tricot de algodón	Beneficio observado

El término “beneficio observado” significa que el tejido tratado muestra una restauración del color (es decir, está menos desteñido) en comparación con el tejido no tratado. Estos resultados confirman los resultados del Ejemplo 17 de que la presencia de componentes tipo CBH no es necesaria para efectuar una restauración de color de tejidos que contienen algodón desteñidos.

#### 45 Ejemplo 19

##### *Suavidad*

Este ejemplo demuestra que la presencia de componentes tipo CBH no es esencial para impartir una suavidad mejorada a tejidos que contienen algodón. Específicamente, este ejemplo emplea una composición celulasa derivada de *Trichoderma reesei* modificada por ingeniería genética de la manera descrita más arriba de manera que sea incapaz de producir componentes CBH I y CBH II.

Se analizó la capacidad de esta composición celulasa de suavizar una toalla. Específicamente, 8,5 onzas de toallas no suavizadas, 14 pulgadas por 15 pulgadas (disponibles como Style N°420NS en Test Fabrics, Inc., 200 Blackford Ave., Middlesex, NJ 08846) se cortaron en muestras de 7 pulgadas por 7,5 pulgadas.

Se analizó la capacidad de la composición celulasa descrita más arriba de suavizar estas muestras en un laundrometro. Específicamente, se añadió una cantidad apropiada de celulasa para proporcionar 500 ppm, 250 ppm, 100 ppm, 50 ppm y 10 ppm de celulasa en la solución celulasa final a soluciones separadas de 400 ml de un tampón citrato/fosfato 20 mM que contenía un 0,025% en peso de un surfactante no  
60

iónico (Tritonx114). Adicionalmente, se hizo correr un blanco que contenía la misma solución sin celulasa añadida. Las muestras preparadas de esta manera se valoraron a pH 5. Entonces se añadió cada una de las soluciones resultantes a un recipiente metálico hermético de lauderómetro separado. A continuación se cerró el recipiente metálico hermético y el recipiente metálico hermético se bajó hasta entrar dentro del baño del lauderómetro que se mantuvo a 37°C. Entonces se rotó el recipiente metálico hermético en el baño a una velocidad de al menos 40 revoluciones por minuto (rpms) durante aproximadamente 1 hora. Después se extrajeron las muestras, se aclararon bien y se secaron en un secador estándar.

Entonces se analizó la suavidad de las muestras en un test de preferencia. Específicamente, se les dio a seis expertos analizadores su propio conjunto de muestras y se les preguntó respecto a la suavidad basándose en un criterio de suavidad tal como la flexibilidad del tejido completo. Las muestras obtenidas a partir del tratamiento con las cinco concentraciones de enzima diferentes y el blanco se colocaron detrás de una pantalla y se les pidió a los expertos analizadores que los ordenaran desde el menos suave hasta el más suave. Se asignaron resultados a cada muestra basados en su orden relativo a las otras muestras; siendo 5 más suaves y 0 menos suaves. Los resultados de cada experto analizador se acumularon y después se hizo la media.

Los resultados de la media se presentan en la Fig. 13. Específicamente, estos resultados demuestran que a elevadas concentraciones de celulasa se obtiene una suavidad mejorada. Se destaca que esta suavidad mejorada se consigue en ausencia de CBH I o II en la composición celulasa.

Respecto a estos resultados, se contempla que con concentraciones menores de composición celulasa, se manifiesta una suavidad mejorada tras lavados repetidos.

Respecto a los Ejemplos 16 a 19, las composiciones celulasa enriquecidas en componentes tipo EG derivados de microorganismos diferentes de *Trichoderma reesei* pueden utilizarse en lugar de las composiciones celulasa descritas en estos ejemplos. En particular, la fuente de composición celulasa enriquecida en componentes tipo EG no es importante para esta invención y puede utilizarse cualquier fuente de composición celulasa enriquecida en componentes tipo EG. Por ejemplo, las celulosas fúngicas para utilizar en la preparación de composiciones celulasa fúngicas utilizadas en esta invención pueden obtenerse a partir de *Trichoderma koningii*, *Penicillium sp.* y similares o pueden utilizarse celulosas disponibles comercialmente, es decir, CELLUCLAST (accesible en Novo Industry, Copenhague, Dinamarca), RAPIDASA (accesible en Gist Brocades, N.V., Delft, Holanda) y similares.

#### 35 Ejemplo 20

##### *Transformantes de Trichoderma reesei que contienen el plásmido DEGIpyr4*

Se obtuvo un derivado de la cepa de *T. reesei* RutC30 (Sheir-Neiss y Montenecourt, (1984), App. Microbiol. Biotechnol., 20:46-53) defectivo en pyr4 mediante el procedimiento descrito en el Ejemplo 1. Protoplastos de esta cepa se transformaron con pEGIpyr4 no digerido y se purificaron los transformantes estables.

Cinco de estos transformantes (designados EP2, EP4, EP5, EP6, EP11) así como RutC30 no transformada se inocularon en 50 ml de medio YEG (extracto de levadura, 5 g/l; glucosa, 20 g/l) en recipientes de agitación *shaker* de 250 ml y se cultivaron bajo agitación durante dos días a 28°C. El micelio resultante se lavó con agua estéril y se añadió a 50 ml de medio TSF (tampón citrato-fosfato 0,05 M, pH 5,0; Avicel microcrystalline cellulose, 10 g/l; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2,0 g/l; (NH<sub>6</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1,4 g/l; peptona proteosa, 1,0 g/l; urea, 0,3 g/l; MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0,3 g/l; CaCl<sub>2</sub>, 0,3 g/l; FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 5,0 g/l; MnSO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O, 1,6 mg/l; ZnSO<sub>4</sub>, 1,4 mg/l; CoCl<sub>2</sub>, 2,0 mg/l; Tween 80 0,1%). Estos cultivos se incubaron bajo agitación durante cuatro días más a 28°C. Se tomaron muestras del sobrenadante de estos cultivos y se llevaron a cabo ensayos diseñados para medir la cantidad total de proteína y de actividad endoglucanasa tal y como se describe más abajo.

El ensayo de endoglucanasa se basa en la liberación de oligosacáridos solubles coloreados a partir de Remazol Brilliant Blue-carboximetilcelulosa (RBB-CMC, obtenido de MegaZyme, North Rocks, NSW, Australia). El sustrato se preparó añadiendo 2 g de RBB-CMC seco a 80 ml de agua desionizada recién hervida bajo agitación vigorosa. Cuando se enfrió a temperatura ambiente, se añadieron 5 ml de tampón acetato sódico 2 M (pH 4,8) y se ajustó el pH a 4,5. El volumen se ajustó finalmente a 100 ml con agua desionizada y se añadió azida sódica hasta una concentración final de 1 0,02%. Se colocaron en tubos alícuotas de cultivo control de *T. reesei*, sobrenadante de cultivo transformante pEGIpyr4 o acetato sódico 0,1 M como blanco (10-20 µl), se añadieron 250 µl de sustrato y se incubaron los tubos durante

## ES 2 144 401 T3

30 minutos a 37°C. Los tubos se colocaron en hielo durante 10 minutos y después se añadió 1 ml de precipitado frío (3,3% de acetato sódico, 0,4% de acetato de zinc, pH 5 con HCl, 76% de etanol). Los tubos se agitaron en el vórtex y se permitió que reposaran durante cinco minutos antes de centrifugar durante tres minutos a aproximadamente 13.000 x g. La densidad óptica se midió espectrofotométricamente a una longitud de onda de 590-600 nm.

El ensayo de proteína utilizado era el ensayo BCA (ácido bicinchonínico) utilizando reactivos obtenidos de Pierce, Rockford, Illinois, USA. El estándar era albúmina de suero bovino (BSA). El reactivo BSA se hizo mezclando una parte de reactivo B con 50 partes de reactivo A. Un ml del reactivo BCA se mezcló con 50 µl de BSA apropiadamente diluido o sobrenadante de cultivo de análisis. Se realizó una incubación durante 30 minutos a 37°C y se midió finalmente espectrofotométricamente la densidad óptica a una longitud de onda de 562 nm.

Los resultados de los ensayos descritos más arriba se muestran en la Tabla 1. Está claro que algunos de los transformantes producían cantidades aumentadas de actividad endoglucanasa en comparación con la cepa no transformada RutC30. Se piensa que las endoglucanasas y las exo-celobiohidrolasas producidas por *T. reesei* no transformado constituyen aproximadamente el 20% y el 70% respecto a la cantidad total de proteína secretada. Por lo tanto se esperaba que un transformante tal como EP5, que produce aproximadamente cuatro veces más endoglucanasa que la cepa RutC30, secretara aproximadamente cantidades iguales de proteínas tipo endoglucanasa y exo-celobiohidrolasa.

Los transformantes descritos en este Ejemplo se obtuvieron utilizando pEGIp<sub>yr4</sub> intacto y contendrán secuencias de ADN integradas en el genoma que derivan del plásmido pUC. Antes de la transformación sería posible digerir pEGIp<sub>yr4</sub> con HindIII y aislar el fragmento de ADN más grande que contiene solo ADN de *T. reesei*. La transformación de *T. reesei* con este fragmento aislado de ADN permitiría el aislamiento de transformantes que sobreproducen EGI y que no contienen secuencias de ADN heterólogo a excepción de las dos piezas cortas de ADN sintético mostrado en la Fig.8. También sería posible utilizar pEGIp<sub>yr4</sub> para transformar una cepa en la que se ha delecionado el gen cbh1 o el gen cbh2 o ambos genes. De esta manera podría construirse una cepa que sobreproduciría EGI y produciría un rango limitado de exo-celobiohidrolasas o que no produciría exo-celobiohidrolasas.

Los métodos del Ejemplo 20 podrían utilizarse para producir cepas de *T. reesei* que sobreproducirían cualquiera de los otros componentes celulasa, componentes xilanasas u otras proteínas producidas normalmente por *T. reesei*.

TABLA 1  
*Actividad de endoglucanasa secretada de los transformantes de T. reesei*

	A	B	A/B
Cepa	Actividad Endoglucanasa (O.D. a 590 nm)	Proteína (mg/ml)	
RutC30	0,32	4,1	0,078
EP2	0,70	3,7	0,189
EP4	0,76	3,65	0,208
EP5	1,24	4,1	0,302
EP6	0,52	2,93	0,177
EP11	0,99	4,11	0,241

Los resultados anteriores se presentan con el propósito de demostrar la sobreproducción del componente EGI respecto a la proteína total y no con el propósito de demostrar la extensión de la sobreproducción. A este respecto, se espera que la extensión de la sobreproducción varíe con cada experimento.

### Ejemplo 21

#### *Construcción de pCEPC1*

## ES 2 144 401 T3

Se construyó un plásmido, pCEPC1, en el cual la secuencia codificante de EGI se fusionó funcionalmente con el promotor del gen cbh1. Esto se consiguió utilizando mutagénesis dirigida in vitro para alterar la secuencia de ADN de los genes cbh1 y egI1 para crear dianas de endonucleasa de restricción convenientes justo en 5' (secuencia arriba) de sus respectivos sitios de inicio de translación. El análogo de la secuencia de ADNn se llevó a cabo para verificar la secuencia esperada en la unión entre los dos segmentos de ADN. Las alteraciones específicas realizadas se muestran en la Fig.14.

Los fragmentos de ADN que se combinaron para formar pCEPC1 se insertaron entre las dianas EcoRI de pUC4K y eran como se describe a continuación (véase la Filg. 15):

- 10 A) Un fragmento de 2,1 kb desde la región flanqueante 5' del locus cbh1. Esto incluye la región promotora y se extiende hasta la diana de BcII creada por ingeniería genética y de esta manera contienen la secuencia codificante no**cbh1**.
- 15 B) Un fragmento de ADN genómico de 1,9 kb desde el locus egI1 que empieza en el extremo 5' con la diana BamHI creada por ingeniería genética y que se extiende a través de la región codificante y que incluye aproximadamente 0,5 kb más allá del codón de parada de la translación. En el extremo 3' del fragmento hay 18 pb derivadas del sitio de clonación múltiple de pUC218 y un oligonucleótido sintético de 15 pb utilizado para unir este fragmento con el fragmento descrito más abajo.
- 20 C) Un fragmento de ADN desde la región flanqueante a 3' del locus cbh1, que se extiende desde una posición aproximadamente 1 kb secuencia abajo hasta aproximadamente 2,5 kb secuencia abajo del codón de parada de la translación cbh1.
- 25 D) Insertado en una diana NheI en el fragmento (C) había un fragmento de ADN NheI-SphI de 3,1 kb que contenía el gen pyr4 obtenido a partir de pTpyr2 (Ejemplo 2) y que tenía 24 pb de ADN a un extremo derivado del sitio de clonación múltiple de pUC18.

El plásmido, pCEPC1 se diseñó de manera que la secuencia codificante EGI se integrara en el locus cbh1 reemplazando la secuencia codificante de CBHI sin introducir ningún ADN extraño en la cepa huésped. La digestión de este plásmido con EcoRI libera un fragmento que incluye la región promotora cbh1, la secuencia codificante egI1 y la región de terminación de la transcripción, el gen pyr4 de *T. reesei* y un segmento de ADN a partir de la región flanqueante 3' (secuencia abajo) del locus cbh1 (véase la Fig. 15).

### 35 Ejemplo 22

#### *Transformantes que contienen ADN de PEPC1*

Una cepa que carece de pyr4 de *T. reesei* RutC30 (Sheir-Neiss, ver más arriba) se obtuvo mediante el método descrito en el Ejemplo 1. Esta cepa se transformó con pCEPC1 que se había digerido con EcoRI. Los transformantes estables se seleccionaron y a continuación se cultivaron en recipientes para agitación shaker para la producción de celulasa tal y como se ha descrito en el Ejemplo 20. Para visualizar las proteínas celulasa, se llevó a cabo una electroforesis en gel de enfoque isocéntrico sobre muestras de estos cultivos utilizando el método descrito en el Ejemplo 7. De un total de 23 transformantes analizados de esta manera se encontró que 12 no producían proteína CBHI, que es el resultado esperado tras la integración de ADN de CEPC1 en el locus cbh1. Se utilizó un análisis de Southern blot para confirmar que la integración había ocurrido efectivamente en el locus cbh1 en algunos de estos transformantes y que no estaban presentes secuencias derivadas del vector de plásmido bacteriano (pUC4K) (véase la Fig. 16). Para este análisis el ADN de los transformantes se digirió con PstI antes de someterlo a electroforesis y de transferirlo a un filtro de membrana. El Southern blot resultante se sondeó con un plásmido pUC4K::cbh1 marcado radioactivamente (véase el Ejemplo 2). La sonda se hibridó con el gen cbh1 sobre un fragmento de ADN de 6,5 kb del cultivo control no transformado (Fig. 16, carril A). Se esperaba que la integración del fragmento de ADN de CEPC1 en el locus cbh1 provocara la pérdida de esta banda de 6,5 kb y la aparición de otras tres bandas correspondientes a fragmentos de ADN de aproximadamente 1,0 kb, 2,0 kb y 3,5 kb. Esto es exactamente el patrón observado para el transformante mostrado en Fig. 16, carril C. También se muestra en la Fig. 16, carril B un ejemplo de un transformante en el cual se han integrado múltiples copias de pCEPC1 en sitios del genoma diferentes del locus cbh1.

Los ensayos de actividad endoglucanasa se llevaron a cabo sobre muestras de sobrenadante de cultivo del cultivo no transformado y los transformantes exactamente tal y como se describe en el Ejemplo 20 excepto en que las muestras se diluyeron 50 veces antes del ensayo de manera que la concentración de proteína en las muestras estaba entre aproximadamente 0,03 y 0,07 mg/ml. Los resultados de los ensayos

llevados a cabo con el cultivo de control no transformado y cuatro transformante diferentes (designados como CEPC1-101, CEPC1-103, CEPC1-105 y CEPC1-112) se muestran en la Tabla 2. Los transformantes CEPC1-103 y CEPC1-112 son ejemplos en los que la integración del fragmento CEPC1 ha conducido a la pérdida de la producción de CBHI.

5

TABLA 2

*Actividad de endoglucanasa secretada de los transformantes de T. reesei*

10

	A	B	A/B
Cepa	Actividad Endoglucanasa (O.D. a 590 nm)	Proteína (mg/ml)	
RutC300	0,037	2,38	0,016
CEPC1-101	0,082	2,72	0,030
CEPC1-103	0,099	1,93	0,051
CEPC1-105	0,033	2,07	0,016
CEPC1-112	0,093	1,72	0,054

15

20

Los resultados anteriores se presentan con el propósito de demostrar la sobreproducción del componente EGI en relación a la proteína total y no con el propósito de demostrar la extensión de la sobreproducción. A este respecto, se espera que la extensión de la sobreproducción varíe con cada experimento.

25

Sería posible construir plásmidos similares a pCEPC1 pero con cualquier otro gen de *T. reesei* reemplazando el gen egI1. De esta manera, podría conseguirse la sobreexpresión de otros genes y la delección simultánea del gen cbh1.

30

También sería posible transformar cepas derivadas de pyr4 de *T. reesei* en el que se han deleccionado previamente otros genes, por ejemplo cbh2, para construir transformantes que por ejemplo producirían exo-celobiohidrolasas y que expresarían endoglucanasas.

35

Utilizando construcciones similares a pCEPC1, pero en las cuales se ha substituido ADN de otro locus de *T. reesei* por ADN del locus cbh1, sería posible insertar genes bajo el control de otro promotor en otro locus en el genoma de *T. reesei*.

## 40 Ejemplo 23

*Construcción de pEGII::P-1*

El gen egI3, que codifica EGII (al que previamente otros han hecho referencia como EGIII) se ha clonado a partir de *T. reesei* y se ha publicado la secuencia de ADN (Sloheimo et al., 1988, *Gene* 63:11-21). Hemos obtenido el gen de la cepa RL-P37 como un fragmento de ADN genómico PstI-XhoI de aproximadamente 4 kb insertado entre las dianas de PstI y XhoI de pUC219. El último vector, pUC219, deriva de pUC119 (descrito por Wilson et al., 1989, *Gene* 77:69-78) mediante la expansión del sitio de clonaje múltiple para incluir dianas de restricción de BglIII, ClaI y XhoI. Utilizando métodos conocidos en el estado de la técnica, el gen pyr4 de *T. reesei*, presente en un fragmento de ADN genómico de SaII de 2,7 kb se insertó en una diana de SaII en la secuencia codificante de EGII para crear el plásmido pEGII::P-1 (Fig. 17). Esto provocó la disrupción de la secuencia codificante de EGII pero sin deleccionar cualquier otra secuencia. El plásmido, pEGII::P-1 puede digerirse con HindIII y BamHI para rendir un fragmento lineal de ADN derivado exclusivamente de *T. reesei* excepto en 5 pb en un extremo y 16 pb en el otro extremo, ambos de los cuales derivan del sitio de clonaje múltiple de pUC219.

50

55

## Ejemplo 24

*Transformación de GC69 de T. reesei con pEGII::P-1 para crear una cepa incapaz de producir EGII*

60

La cepa de *T. reesei* GC69 se transformará con pEGII::P-1 que se ha digerido previamente con HindIII y BamHI y se seleccionarán los transformantes estables. El ADN total se aislará a partir de los

transformantes y se utilizará un análisis de Southern blot para identificar aquellos transformantes en los cuales se ha integrado el fragmento de ADN que contiene los genes pyr4 y egI3 en el locus egI3 y en consecuencia se ha interrumpido la secuencia codificante de EGII. Los transformantes serán incapaces de producir EGII. También sería posible utilizar pEGII::P-1 para transformar una cepa en la que se ha deleccionado alguno o todos los genes cbh1, cbh2 o egI1. De esta manera podría construirse una cepa que sólo produciría algunos componentes celulosa y que no produciría componente EGII.

## Ejemplo 25

10 *Transformación de T. reesei con pEGII::P-1 para crear una cepa incapaz de producir CBHI, CBHII y EGII*

Se obtuvo un derivado deficiente en pyr4 de la cepa P37P $\Delta\Delta$ CBH67 (del Ejemplo 11) mediante el procedimiento descrito en el Ejemplo 1. Esta cepa P37P $\Delta\Delta$ 67P<sup>-1</sup> se transformó con pEGII::P-1 que se había digerido previamente con HindIII y BamHI y se seleccionaron los transformantes estables. Se aisló el ADN total a partir de los transformantes y se utilizó un análisis de Southern blot para identificar las cepas en las cuales se había integrado el fragmento de ADN que contenía los genes pyr4 y egI3 en el locus egI3 y en consecuencia se había interrumpido la secuencia codificante de EGII. El Southern blot ilustrado en la Fig. 18 se sondeó con un fragmento de PstI de aproximadamente 4 kb de ADN de *T. reesei* que contenía el gen egI3 que se había clonado en la diana pstI de pUC18 y en consecuencia se había reaislado. Cuando se digirió el ADN aislado de la cepa P37P $\Delta\Delta$ 67P<sup>-1</sup> con PstI para el análisis de Southern blot, el locus egI3 se visualizó a continuación como una banda aislada de 4 kb sobre la autorradiografía (Fig. 18, carril E). Sin embargo, para un transformante interrumpido en el gen egI3, esta banda se había perdido y se había reemplazado por dos nuevas bandas, tal y como se esperaba (Fig. 18, carril F). Si el ADN se digería con EcoRV o BglIII, el tamaño de la banda correspondiente al gen egI3 aumentaba en tamaño en aproximadamente 2,7 kb (el tamaño del fragmento pyr4 insertado) entre la cepa P37P $\Delta\Delta$ 67P<sup>-1</sup> no transformada (Carriles A y C) y el transformante se interrumpió en egI3 (Fig. 18, carriles B y D). El transformante que contenía el gen egI3 interrumpido que se ilustra en la Fig. 18 (Carriles B, D y F) se denominó A22. El transformante identificado en la Fig. 18 es incapaz de producir CBHI, CBHII o EGII.

## Ejemplo 26

35 *Construcción de p $\Delta$ EGI-1*

El gen egI1 de la cepa de *T. reesei* RL-P37 se obtuvo, tal y como se describe en el Ejemplo 12, como un fragmento de ADN genómico de HindIII de 4,2 kb. Este fragmento se insertó en la diana de HindIII de pUC100 (un derivado de pUC18; Yanisch-Perron et al., 1985, *Gene* 33:103-119) con un oligonucleótido insertado en el sitio de clonación múltiple añadiendo dianas de restricción de BglIII, ClaI y XbaI. Utilizando la metodología conocida en el estado de la técnica, se extrajo un fragmento de EcoRV de aproximadamente 1 kb que se extendía desde una posición cercana al medio de la secuencia codificante de EGI hasta una posición más allá del extremo 3' de la secuencia codificante y se reemplazó por un fragmento de ADN de *T. reesei* de ScaI de 3,5 kb que contenía el gen pyr4. El plásmido resultante se le denominó p $\Delta$ EGI-1 (véase la Fig. 19).

El plásmido p $\Delta$ EGI-1 puede digerirse con HindIII para liberar un fragmento de ADN que comprende sólo ADN genómico que tiene un segmento del gen egI1 en cualquier extremo y el gen pyr4 reemplazando parte de la secuencia codificante de EGI en el centro.

La transformación de una cepa deficiente en pyr4 de *T. reesei* con p $\Delta$ EGI-1 digerido con HindIII conducirá a la integración de este fragmento de ADN en el locus egI1 en cierta proporción de los transformantes. De esta manera se obtendrá una cepa incapaz de producir EGI.

## 55 Ejemplo 27

*Construcción de p $\Delta$ EGIpyr-3 y transformación de una cepa de T. reesei deficiente en pyr4*

La hecho de esperar que el gen EGI podría inactivarse utilizando el método descrito en el Ejemplo 26 se refuerza mediante este experimento. En este caso, se construyó un plásmido, p $\Delta$ EGIpyr-3, que era similar a p $\Delta$ EGI-1 excepto en que el gen pyr4 de *Aspergillus niger* reemplazaba el gen pyr4 de *T. reesei*

como un marcador seleccionable. En este caso, el gen egI1 estaba presente de nuevo como un fragmento de HindIII de 4,2 kb insertado en la diana de HindIII de pUC100. El mismo fragmento de EcoRV de 1 kb interno se extrajo de la misma manera que durante la construcción de pΔEGI-1 (véase el Ejemplo 26) pero en este caso se reemplazó por un fragmento de 2,2 kb que contenía el gen pyrG de *A. niger* (Wilson et al., 1988, *Nucl. Acids Res.*, **16**, pág. 2339). La transformación de una cepa deficiente en pyr4 de *T. reesei* (cepa GC69) con pΔEGIp<sub>pyr</sub>-3, después de haberlo digerido con HindIII para liberar el fragmento que contenía el gen pyrG con regiones flanqueantes del locus egI1 en cualquier extremo, condujo a transformantes en los que se había interrumpido el gen egI1. Estos transformantes se reconocieron por análisis de Southern blot del ADN transformante digerido con HindIII y se sondeó con pΔEGIp<sub>pyr</sub>-3 marcado radiactivamente. En la cepa no transformada de *T. reesei* el egI1 estaba presente en un fragmento de ADN de HindIII de 4,2 kb y este patrón de hibridación se representa en la Fig. 20, carril A. También se muestra en la Fig. 20, carril B, un ejemplo de un transformante en el que la integración de una sola copia de pΔEGIp<sub>pyr</sub>-3 ha tenido lugar en un sitio del genoma diferente del locus egI1.

#### Ejemplo 28

*Transformación de T. reesei con pΔEGI-1 para crear una cepa incapaz de producir CBHI, CBHII, EGI y EGII*

Un derivado de la cepa A22 deficiente en pyr4 (del Ejemplo 25) se obtendrá mediante el método descrito en el Ejemplo 1. Esta cepa se transformará con pΔEGI-1 que se ha digerido previamente con HindIII para liberar un fragmento de ADN que comprende sólo ADN genómico de *T. reesei* que tiene un segmento del gen egI1 en cualquier extremo con parte de la secuencia codificante de EGI reemplazada por el gen pyr4.

Se seleccionarán los transformantes pyr4<sup>+</sup> estables y se aislará el ADN total de los transformantes. El ADN se sondeará con pΔEGIp<sub>pyr</sub>-3 marcado con <sup>32</sup>P después de un análisis de Southern blot para identificar transformantes en los cuales se ha integrado el fragmento de ADN que contiene las secuencias del gen pyr4 y del gen egI1 en el locus egI1 y en consecuencia se ha interrumpido la secuencia codificante de EGI. Los transformantes identificados serán incapaces de producir CBHI, CBHII, EGI y EGII.

REIVINDICACIONES

1. Utilización de una composición detergente para lavar un tejido que contiene algodón, comprendiendo dicha composición:

- (a) Una cantidad limpiadora efectiva de un surfactante o una mezcla de surfactantes; y
- (b) desde aproximadamente un 0,01 % hasta aproximadamente un 5 % en peso de una composición celulasa fúngica basado en el peso de la composición detergente, donde dicha composición celulasa comprende uno o más componentes endoglucanasa y menos de aproximadamente un 5 % en peso de componentes exo-celobiohidrolasa basado en el peso de proteína en la composición celulasa;

**caracterizado** en que el lavado del tejido con la composición proporciona una pérdida de fuerza reducida en comparación con el tratamiento con celulasa completa.

2. Utilización según la reivindicación 1, donde dicha composición celulasa comprende desde aproximadamente un 0,05 % hasta aproximadamente un 2 % en peso de dicha composición detergente.

3. Utilización según la reivindicación 1, donde dicha composición celulasa está libre de todos los componentes exo-celobiohidrolasa.

4. Utilización según la reivindicación 3, donde dicha composición celulasa está libre de todos los componentes tipo CBH.

5. Utilización según la reivindicación 4, donde dicha composición celulasa deriva de un microorganismo modificado genéticamente incapaz de expresar cualquier componente exo-celobiohidrolasa y/o capaz de sobreexpresar uno o más componentes endoglucanasa.

6. Utilización según la reivindicación 1, donde dicha composición celulasa deriva de un microorganismo modificado genéticamente incapaz de expresar cualquier componente tipo CBH.

7. Utilización según la reivindicación 6, donde dicha composición celulasa no contiene ninguna proteína heteróloga.

---

**NOTA INFORMATIVA:** Conforme a la reserva del art. 167.2 del Convenio de Patentes Europeas (CPE) y a la Disposición Transitoria del RD 2424/1986, de 10 de octubre, relativo a la aplicación del Convenio de Patente Europea, las patentes europeas que designen a España y solicitadas antes del 7-10-1992, no producirán ningún efecto en España en la medida en que confieran protección a productos químicos y farmacéuticos como tales.

Esta información no prejuzga que la patente esté o no incluida en la mencionada reserva.

---



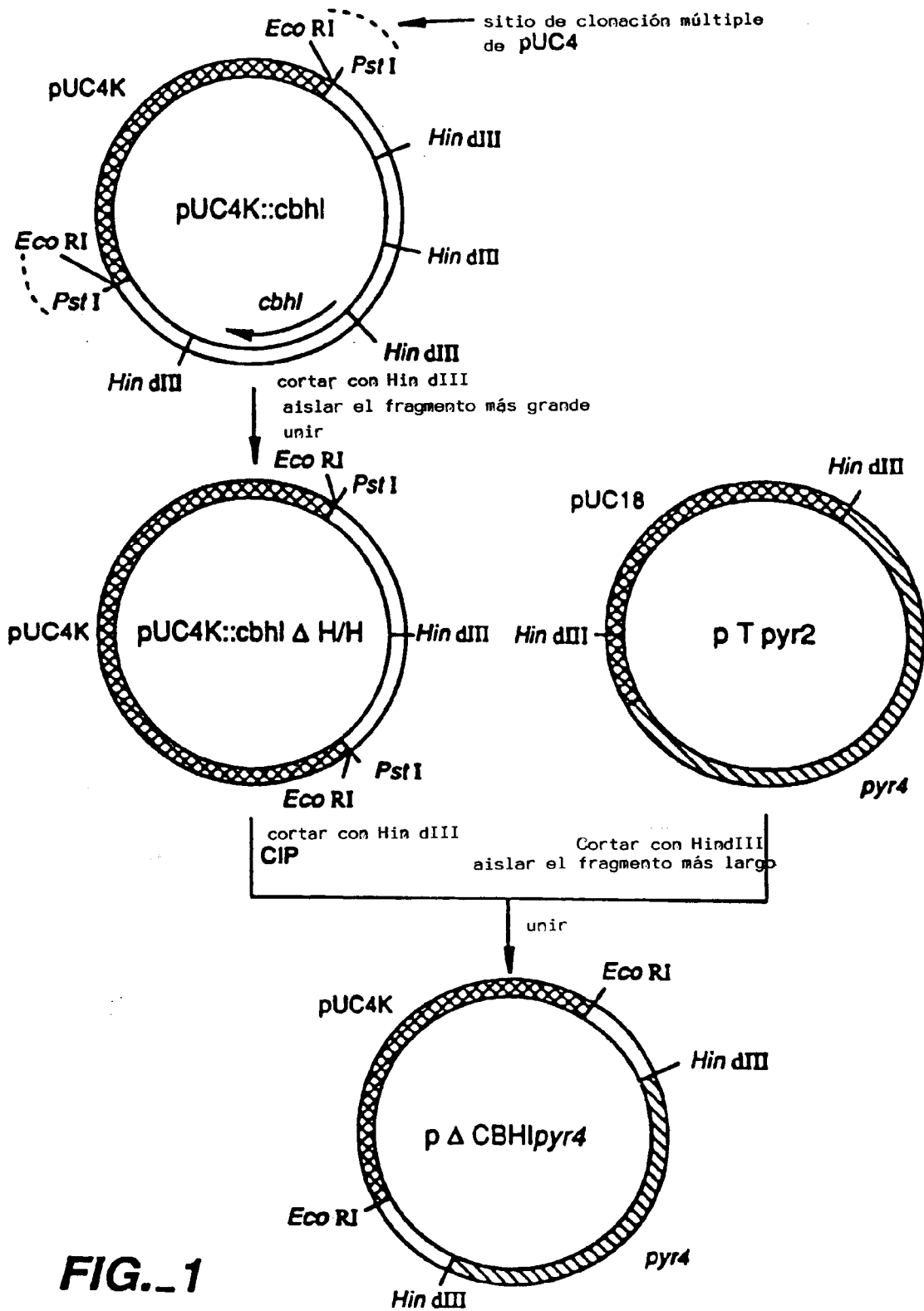


FIG.\_1

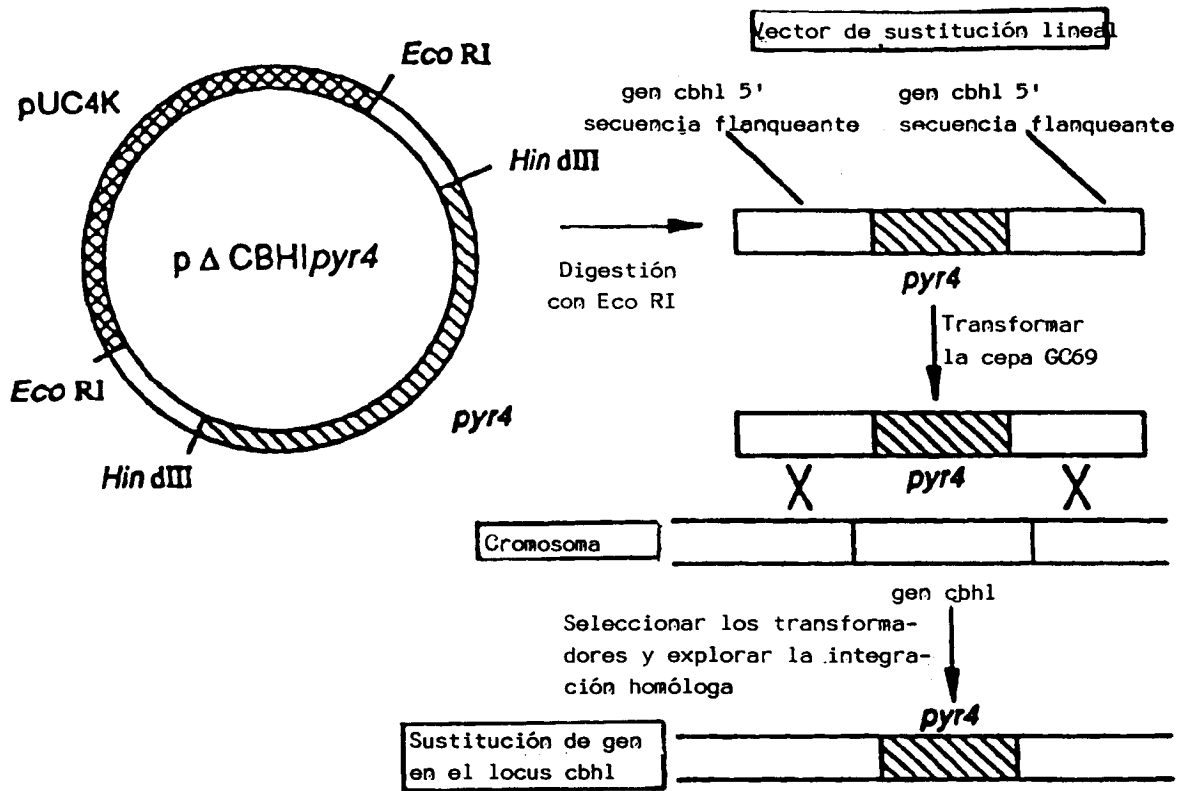
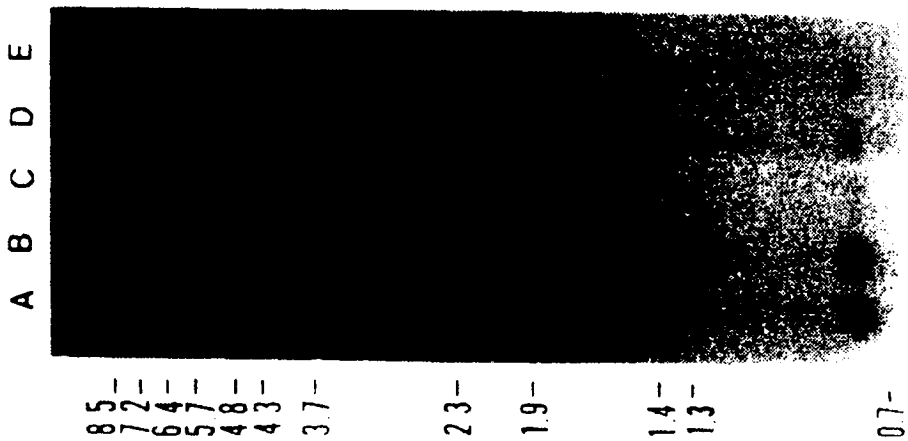
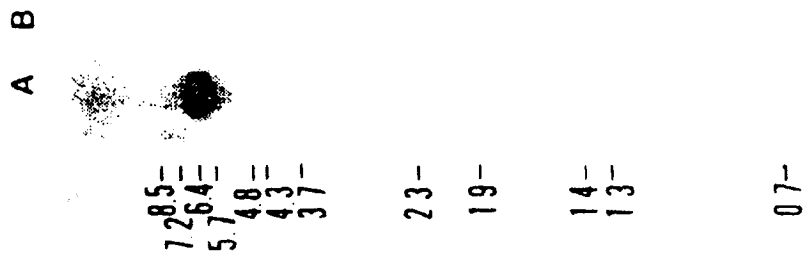


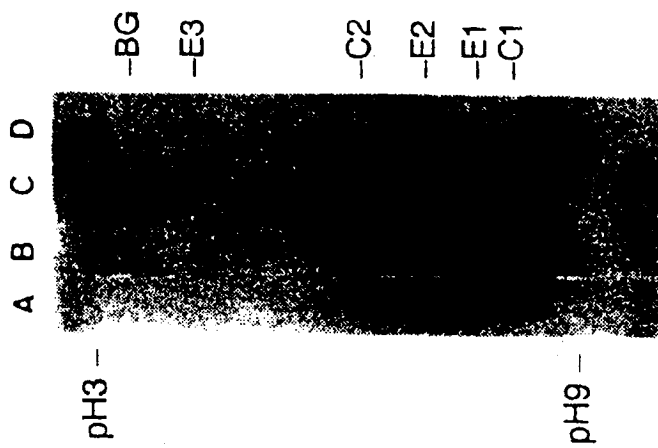
FIG. 2



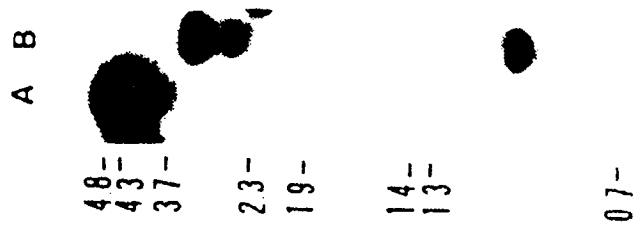
FIG\_3



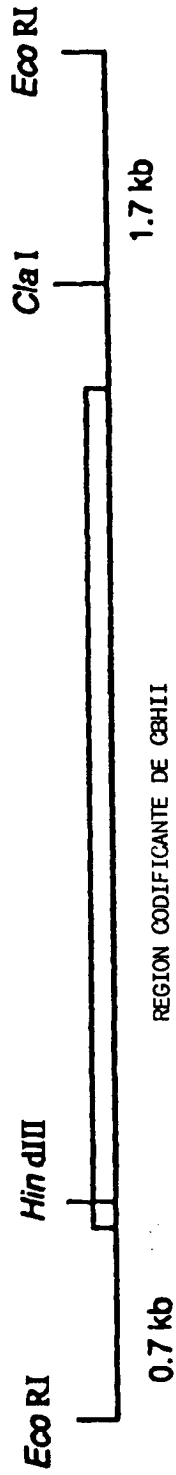
FIG\_4



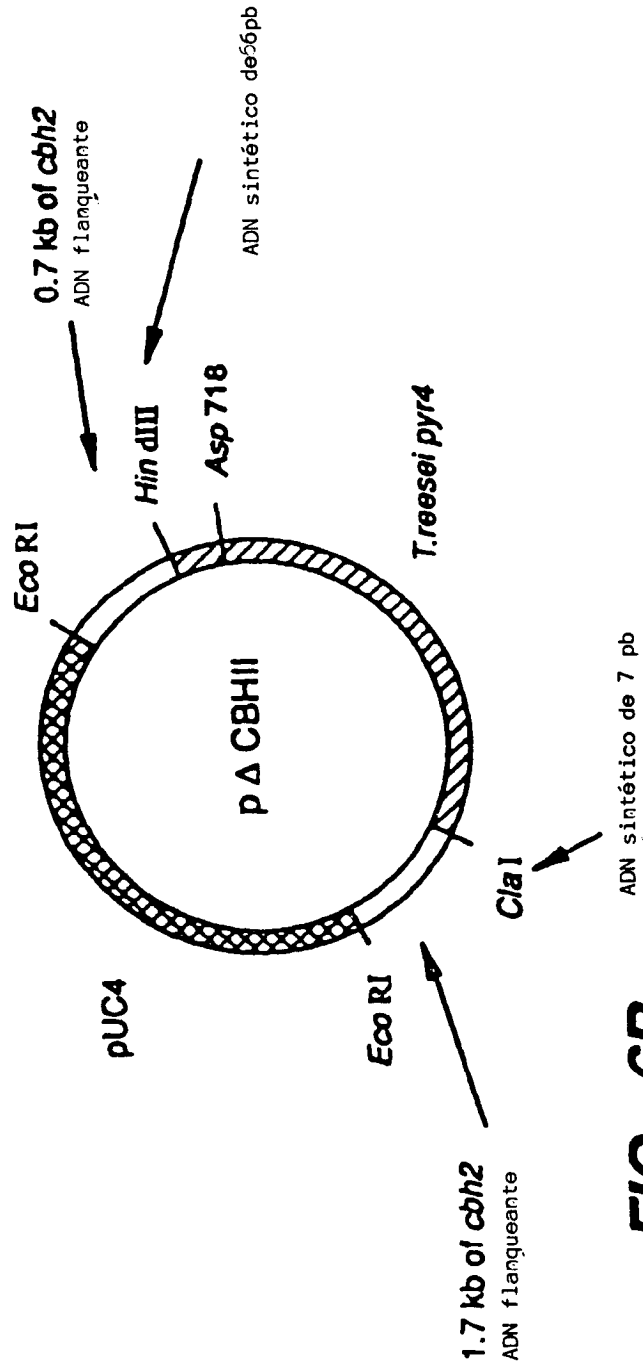
FIG\_5



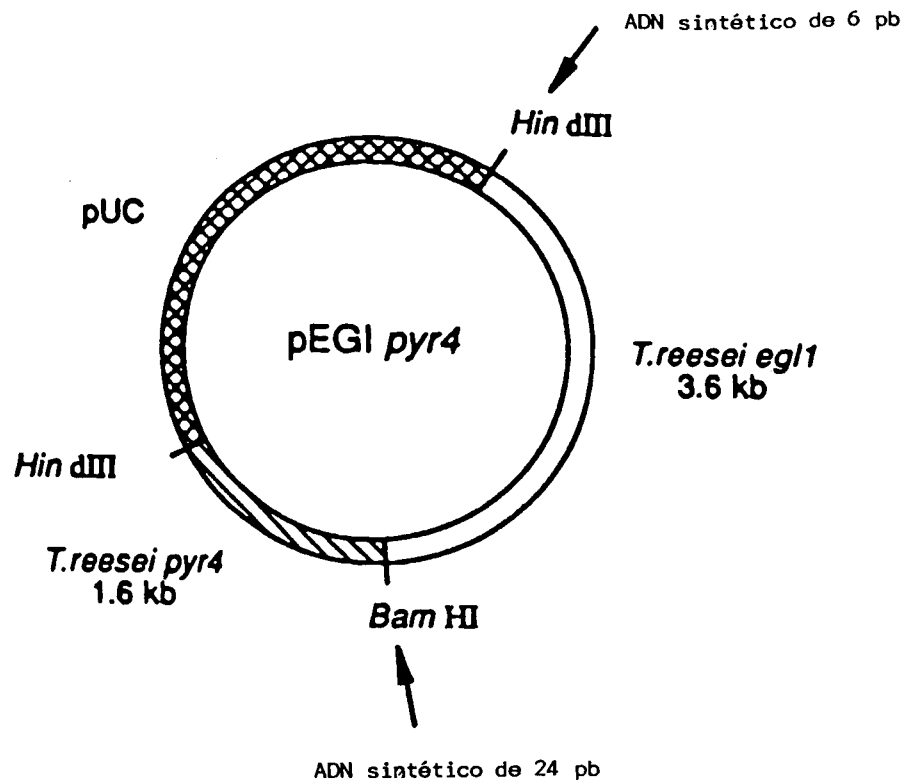
FIG\_7



**FIG.\_6A**



**FIG.\_6B**



**FIG.\_8**

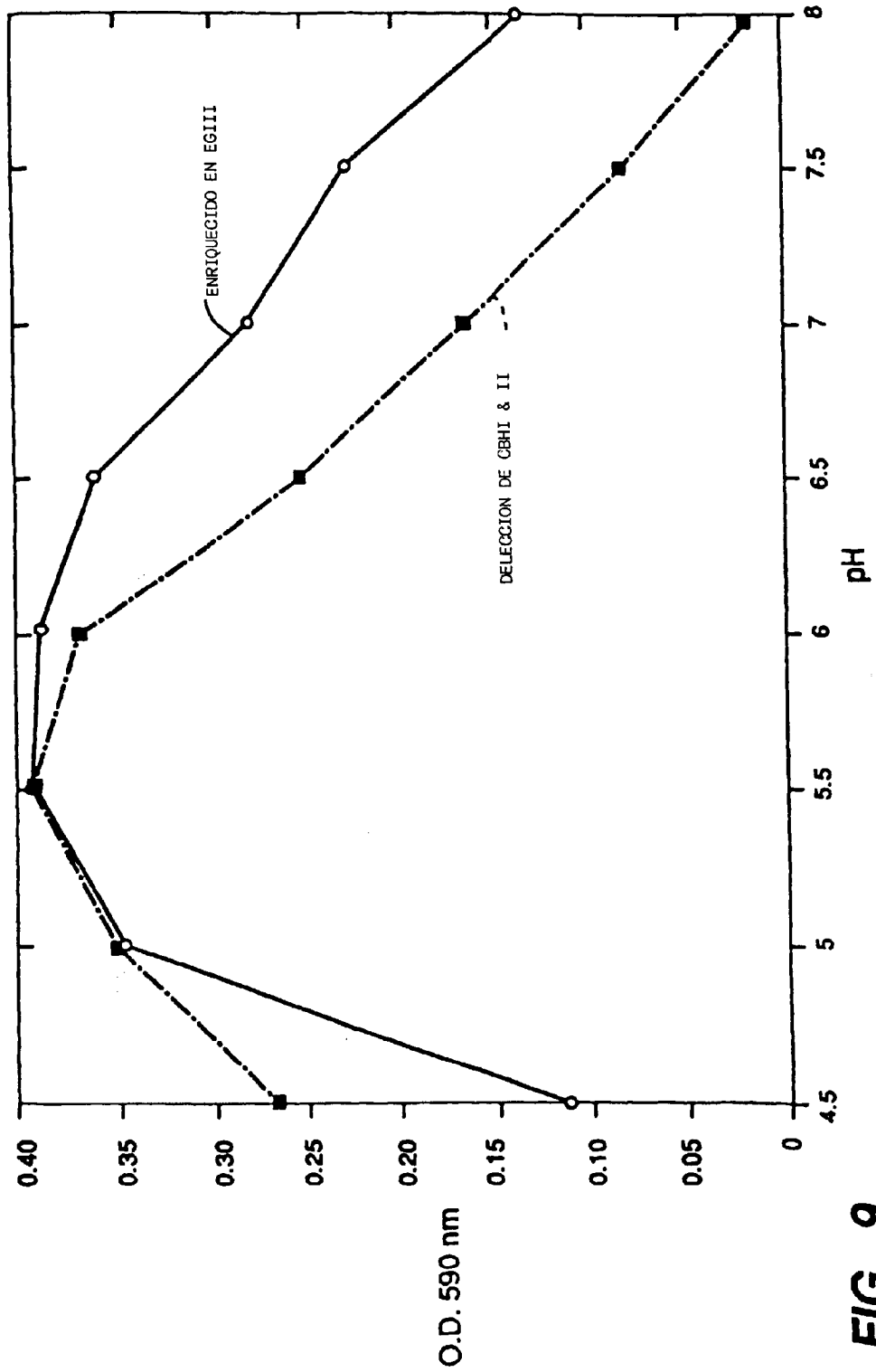


FIG.-9

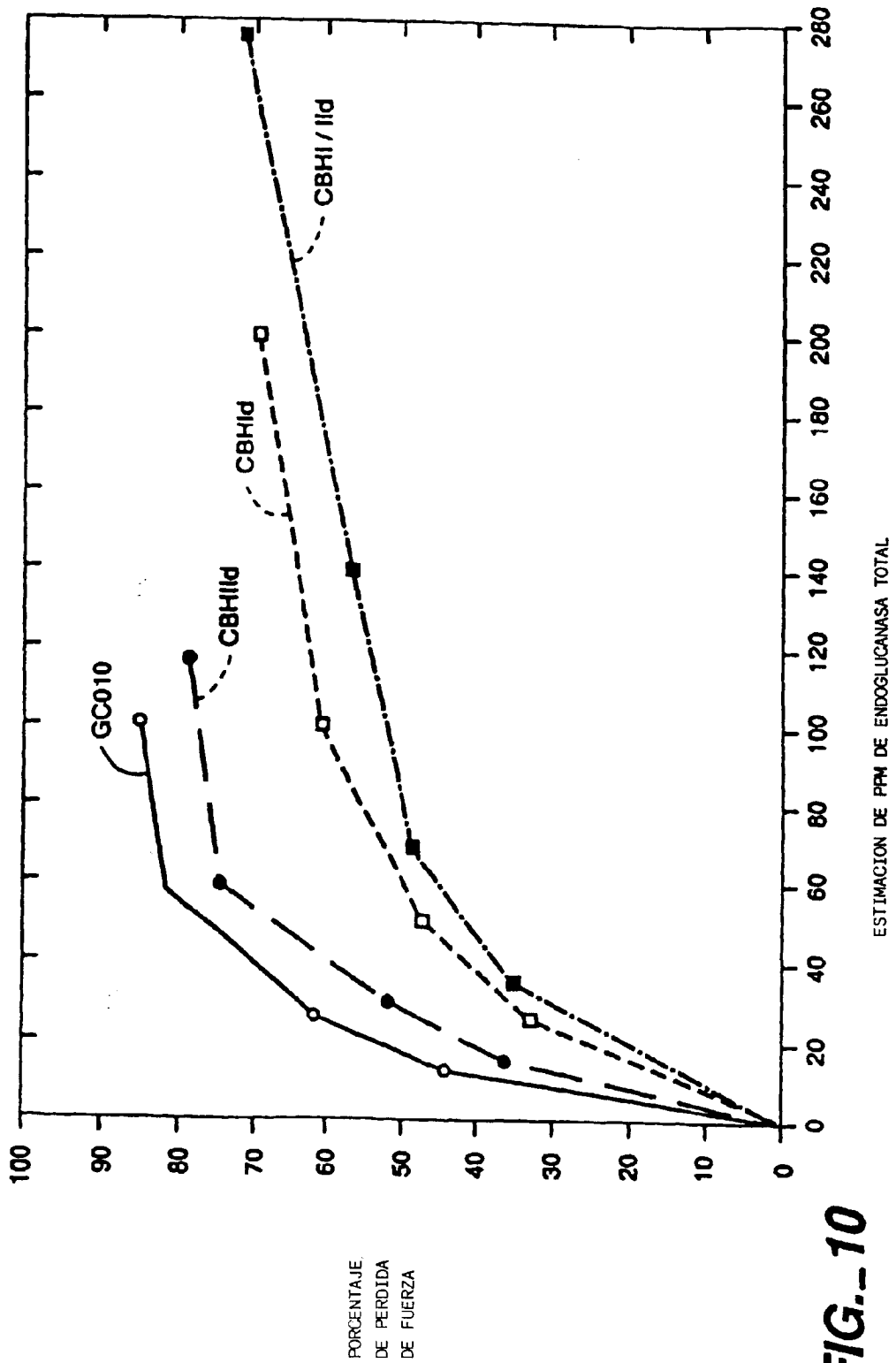
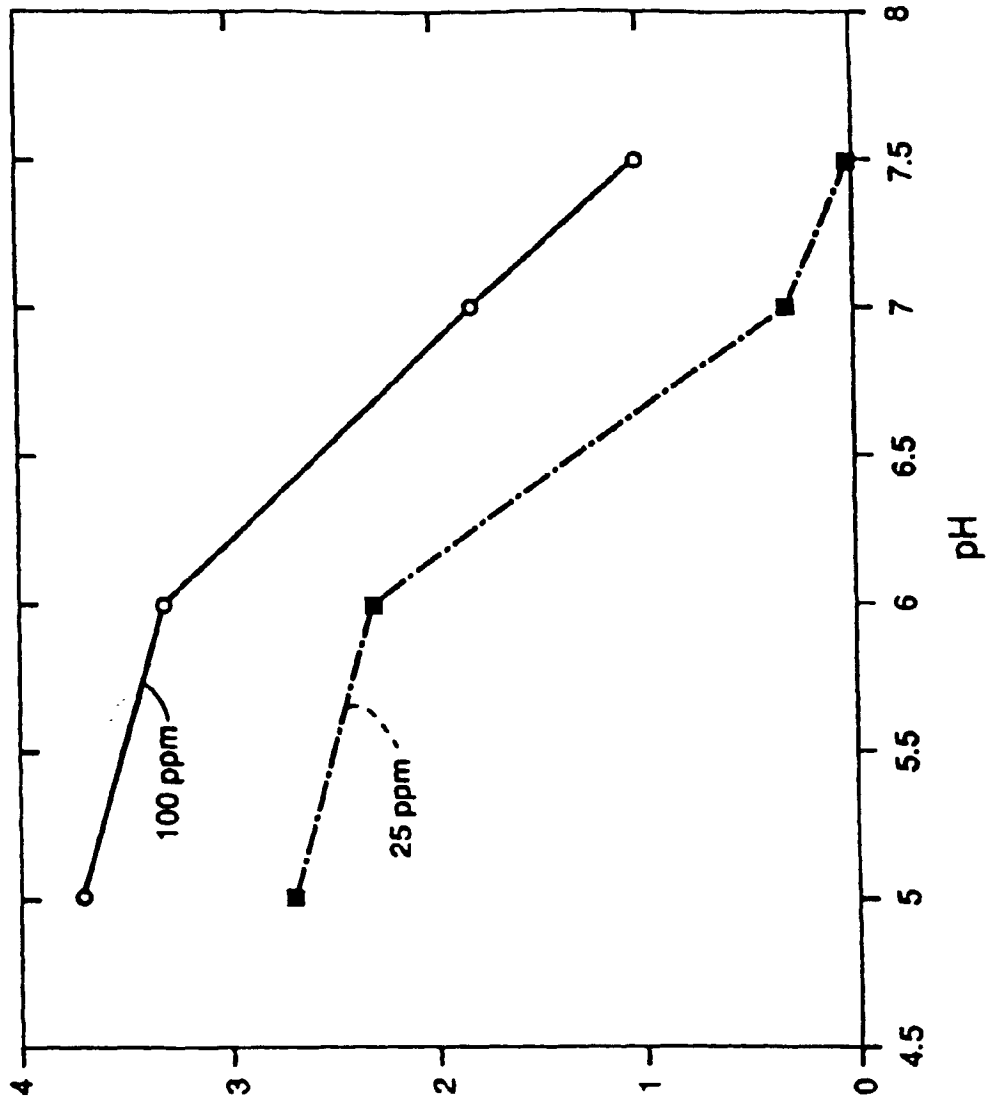


FIG.-10



UNIDADES DE PUNTUACION DE PANEL

**FIG.-11**



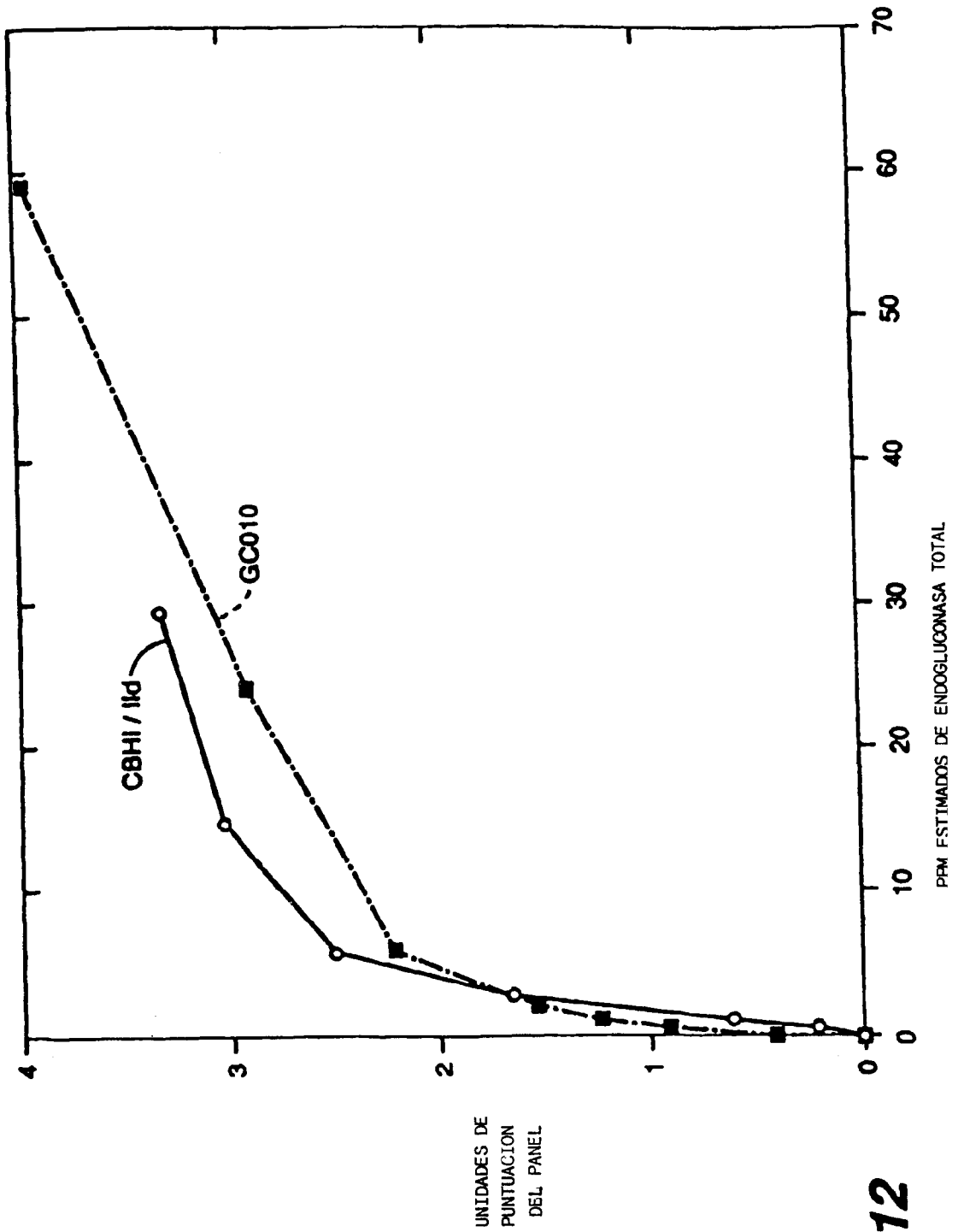
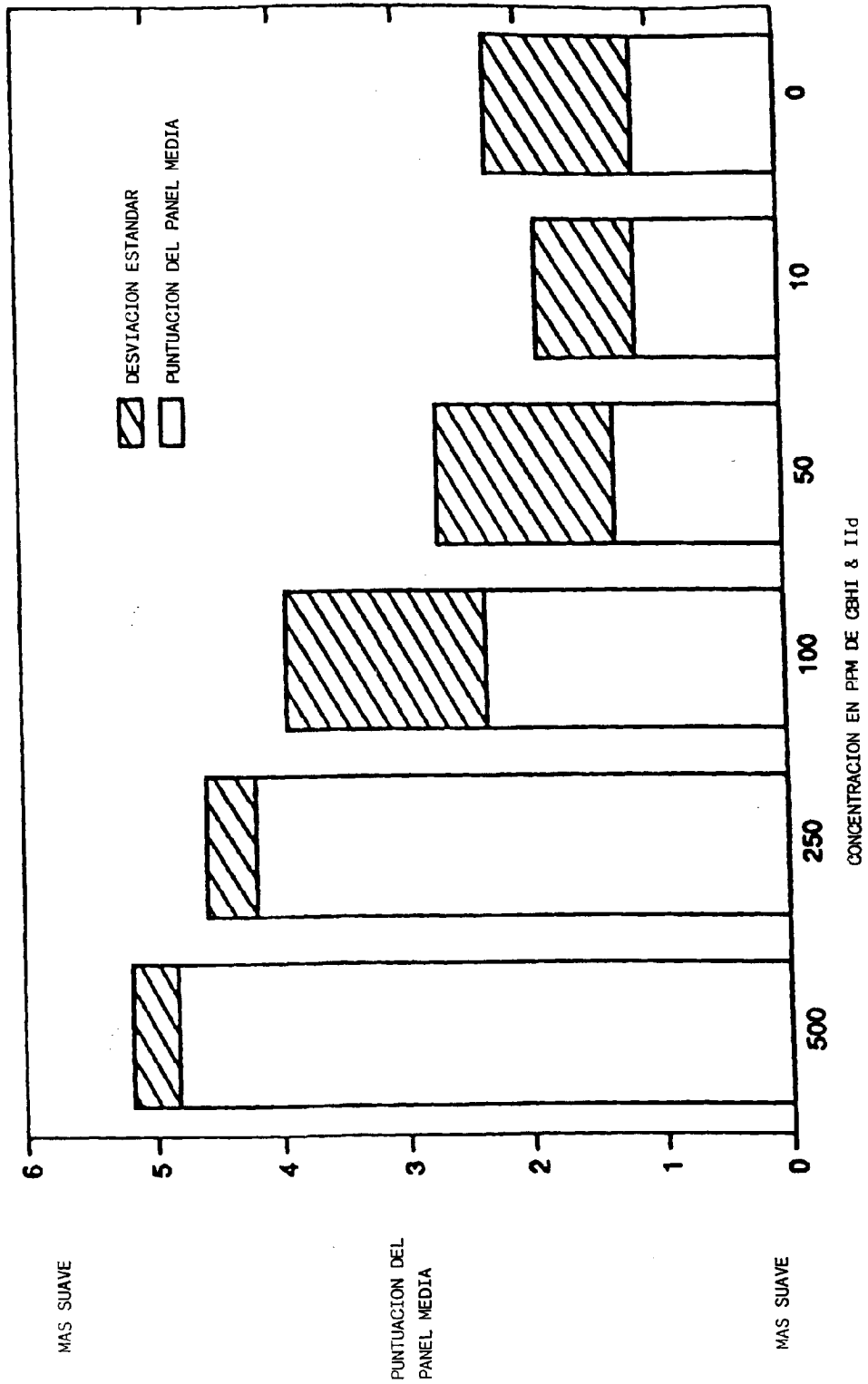


FIG.--12



**FIG.- 13**

ES 2 144 401 T3

cbh1

AAACCCAATAGTCAACCGCGGACTGGCAT ATG TAT CGG

G T A

AAACCCAATAGTGATCAGCGGACTGGCAT ATG TAT CGG

BclI

Primeros 3 codones

egl1

TAGTCCTTCTTGTTGTCCCAA ATG GCG CCC

GGA

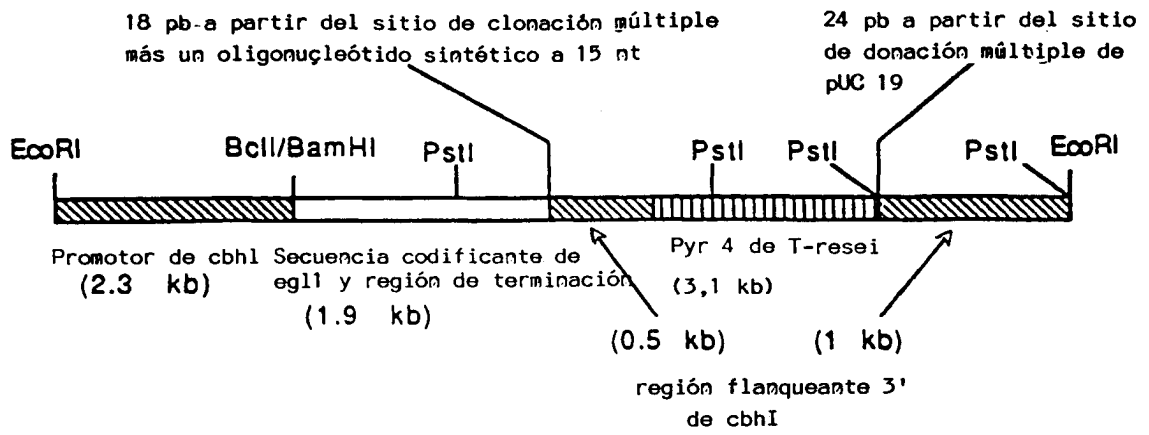
TAGTCCTTCTTGGGATCCCAA ATG GCG CCC

BamHI

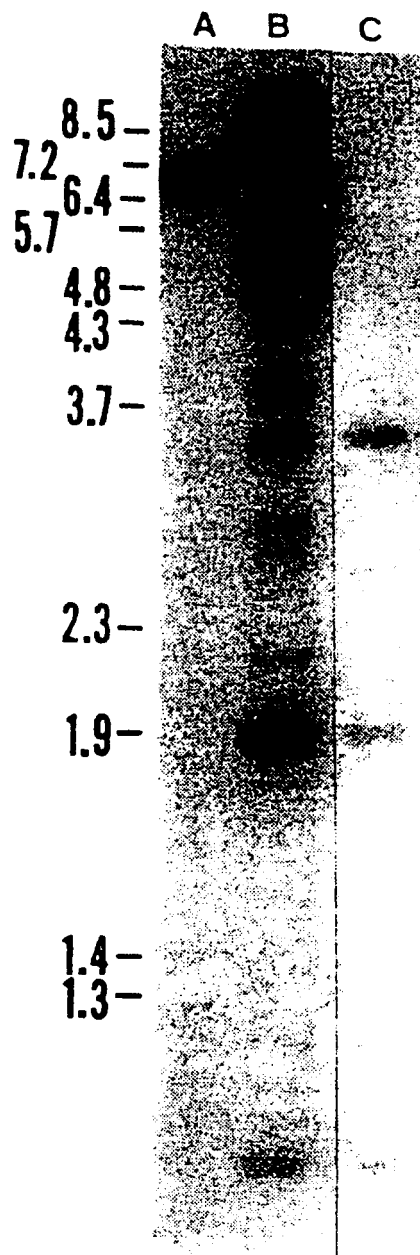
Primeros 3 codones

**FIG. 14**

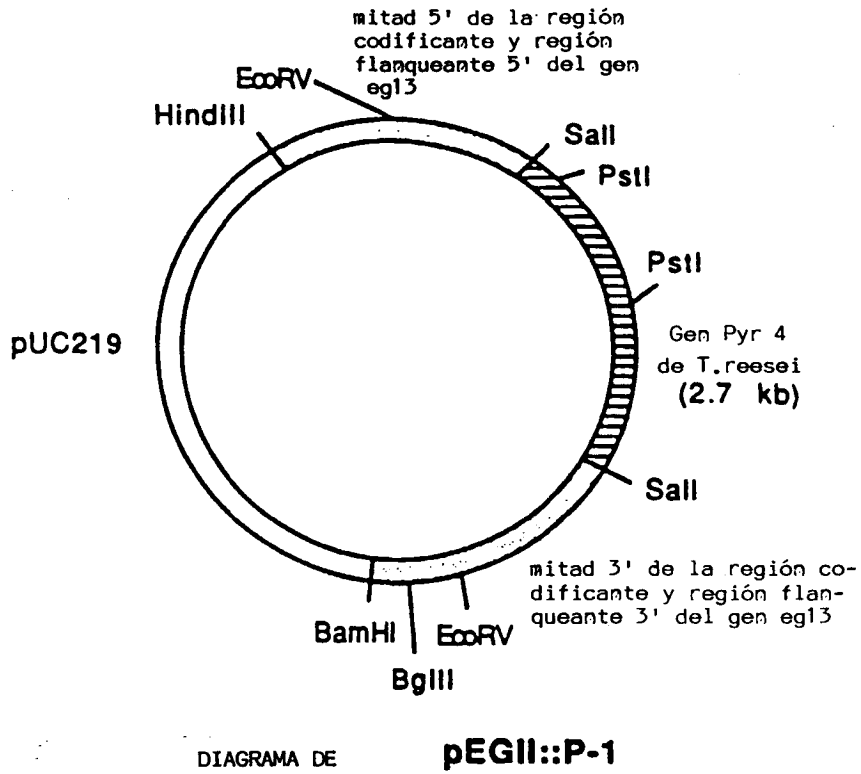
FRAGMENTO LINEAL DE ADN OBTENIDO A PARTIR DE pCEPCI MEDIANTE DIGESTION CON EcoRI



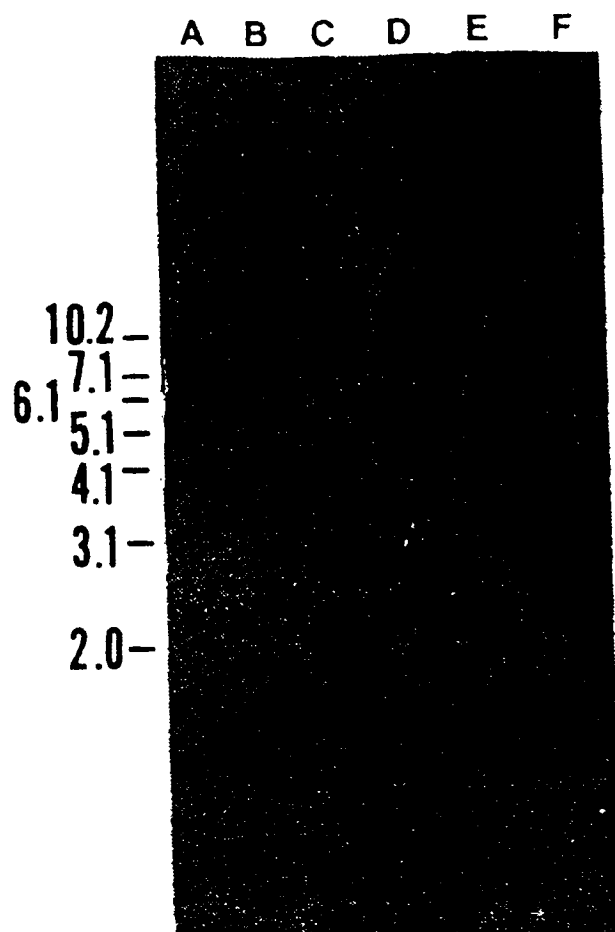
**FIG. 15**



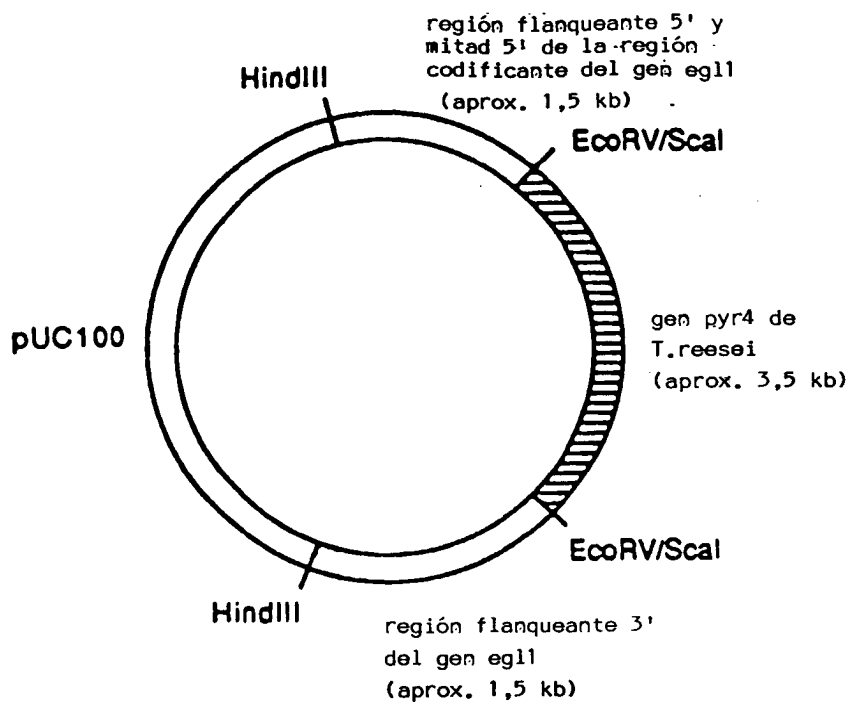
FIG\_16



**FIG. 17**

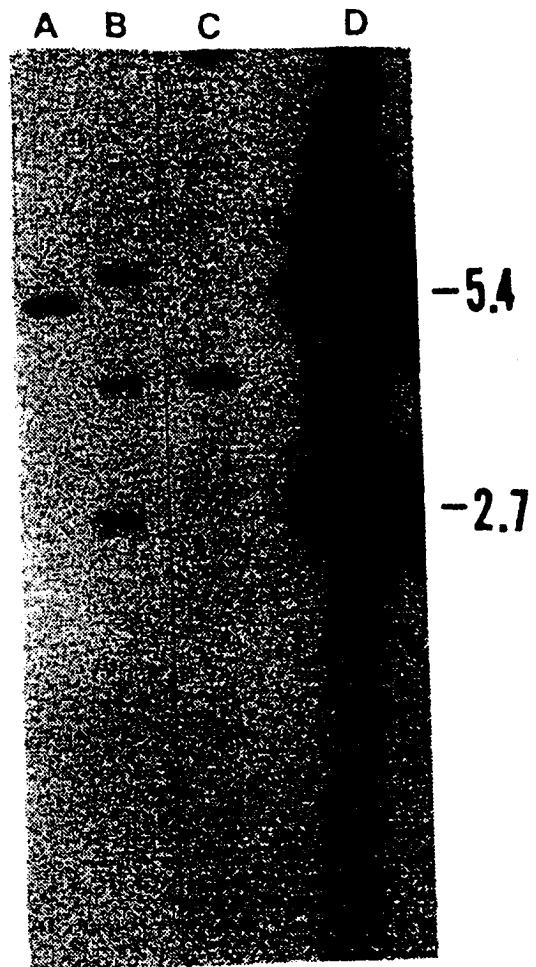


FIG\_18



**FIG. 19**





FIG\_20