



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 200 070**

⑤ Int. Cl.?: **C11D 3/386**
D06M 16/00
//C12N 9/42

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- ⑧ Número de solicitud : **96928351 .4**
⑧ Fecha de presentación : **03.09.1996**
⑧ Número de presentación de la solicitud: **0850295**
⑧ Fecha de publicación de la solicitud: **01.07.1998**

⑤ Título: **Prevención de la coloración retroactiva en el lavado a la piedra.**

③ Prioridad: **08.09.1995 DK 99395**

④ Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.03.2004

④ Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.03.2004

⑦ Titular/es: **Novozymes A/S**
Krogshoejvej 36
2880 Bagsvaerd, DK

⑦ Inventor/es: **Onishi, Masahiro;**
Fich, Merete;
Toft, Annette, Hanne y
Schülein, Martin

⑦ Agente: **Tomás Gil, Tesifonte-Enrique**

ES 2 200 070 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Prevención de la coloración retroactiva en el lavado a la piedra.

5 **Campo técnico**

Esta invención se refiere a un método para provocar una variación localizada de la densidad del color en la superficie de un tejido celulósico teñido, y a una composición para dicho método.

10 **Antecedentes de la invención**

En la fabricación de prendas hechas de tejidos celulósicos teñidos, p. ej., vaqueros hechos a partir de denim teñido de azul índigo, es común el tratamiento del denim para proporcionar un estilo de "lavado a la piedra" (abrasión del color localizada en la superficie del denim). Esto se puede conseguir agitando el denim en un medio acuoso que contiene un agente de abrasión mecánica, como la piedra pómez, una celulasa abrasiva o una combinación de ambos. Es preferible realizar el proceso con un pH prácticamente neutro, de modo que se prefiere utilizar una celulasa con una alta actividad para esta gama de pH. En el pasado, las preparaciones de celulasa se producían generalmente mediante el cultivo de microorganismos de origen natural, y dichas preparaciones contenían de forma invariable una mezcla de muchos componentes de celulasa. En la patente US 4,832,864 (de Ecolab) se describe un proceso que utiliza una preparación de mezcla de celulasa de este tipo.

Los rápidos avances en las técnicas del ADN recombinante han hecho posible la producción de enzimas monocómpo- nentes con un rendimiento elevado y, en consecuencia, los procesos que utilizan celulasas monocómpo- nentes han adquirido un mayor interés. Así, las patentes WO 91/17243 y WO 95/09225 (Novo Nordisk) describen un proceso que utiliza una endoglucanasa monocómpo- nente denominada EG V con un peso molecular de ~43 kD, derivada de la cepa *Humicola insolens* DSM 1800, con una actividad óptima en un pH prácticamente neutro. La patente WO 94/21801 (Genencor) describe la utilización en el "lavado a la piedra" de una celulasa monocómpo- nente denominada EG III derivada de la *Trichoderma longibrachiatum*, conocida por tener un pH óptimo entre 5.5 y 6.0, y por mantener una actividad significativa con un pH alcalino. La patente WO 95/16782 (Genencor International) sugiere la utilización de otras celulasas monocómpo- nentes derivadas de la *Trichoderma* en el "lavado a la piedra", pero estas celulasas son acídicas y no presentan prácticamente actividad alguna con un pH neutro.

Un problema general en los métodos conocidos como "lavado a la piedra" es la coloración retroactiva, es decir, un fenómeno mediante el cual el tinte ya eliminado por abrasión se deposita sobre algunas partes del tejido o la prenda de manera que iguala la variación deseada de densidad del color o decolora cualquier zona de la prenda teñida en un color claro.

Exposición de la invención

Hemos descubierto que, sorprendentemente, la adición de un tipo determinado de celulasa (a partir de ahora denominada primer componente) reduce la coloración retroactiva. La celulasa en cuestión no tiene un efecto abrasivo significativo en sí mismo.

En consecuencia, la invención proporciona un método para provocar una variación localizada de la densidad del color en la superficie de un tejido celulósico teñido, que comprende la agitación del tejido en un medio acuoso con un pH dentro de la gama entre 6.5 y 9 y conteniendo:

un primer componente que puede ser

50 (a) una celulasa de la Familia 5 capaz de hidrolizar celotriosa y/o p-nitrofenil-b-1,4-celobiosida, o bien

(b) una celulasa de la Familia 7,

y un segundo componente que puede ser

55 (a) un agente abrasivo mecánico, o bien

(b) una celulasa con actividad abrasiva,

60 donde cada celulasa exhibe al menos un 30% de su actividad máxima con un pH 7.

Otro aspecto de la invención proporciona una composición para usar en dicho método, incluyendo el primer y segundo componente mencionados.

65 **Definiciones**

En esta especificación junto con las reivindicaciones, son de aplicación las siguientes definiciones:

ES 2 200 070 T3

El término "celulasa" se refiere a un enzima que contribuye a la hidrólisis de la celulosa, como una celobiohidrolasa (según la nomenclatura de las enzimas: *Enzyme Nomenclature* E.C. 3.2.1.91), una endoglucanasa (denominada con la abreviatura "EG", E.C. 3.2.1.4), o una β -glucosidasa (E.C. 3.2.1.21).

5 Las celulasas están clasificadas por familias basándose en las similitudes de las secuencias de aminoácidos según el sistema de clasificación descrito en Henrissat, B. et al.: *Biochem. J.*, (1991), 280, p. 309-16, y Henrissat, B. et al.: *Biochem. J.*, (1993), 293, p.781-788.

10 Las celulasas empleadas en esta invención son preferiblemente monocomponentes, es decir, el medio acuoso empleado en la invención debería estar libre de otros componentes de celulasas distintos de los especificados. Las enzimas monocomponentes pueden ser preparadas de forma económica mediante tecnología de ADN recombinante, es decir, se pueden producir mediante la clonación de una secuencia de ADN codificadora del monocomponente, transformando posteriormente la célula huésped apropiada con la secuencia de ADN y expresando el componente en la célula huésped.

15 En consecuencia, la secuencia de ADN que codifica una celulasa útil puede ser aislada mediante un método general que implica:

20 - clonación de un banco de ADN en vectores adecuados, p. ej. a partir de uno de los microorganismos indicados más adelante en esta invención,

- transformación de las células huéspedes de levadura adecuadas mediante estos vectores,

25 - cultivo de las células huéspedes bajo condiciones adecuadas para expresar cualquier enzima de interés codificada por un clon en el banco de ADN,

- selección de los clones positivos determinando cualquier actividad celulasa de la enzima producida por estos clones, y

30 - aislamiento del ADN codificador de la enzima de estos clones.

Este método general se describe mejor en la patente WO 94/14953 (Novo Nordisk).

35 Una secuencia de ADN que codifica una celulasa útil puede ser aislada, por ejemplo, seleccionando un banco de ADNc del microorganismo en cuestión y seleccionando los clones que expresan la actividad enzimática apropiada (es decir, la actividad celulasa).

40 Se puede obtener una secuencia de ADN codificadora de un enzima homóloga, es decir, una secuencia de ADN análoga, a partir de otros microorganismos. Por ejemplo, la secuencia de ADN puede obtenerse mediante una selección similar de un banco de ADNc de otro hongo, como una cepa de *Aspergillus sp.*, en particular una cepa de *A. aculeatus* o de *A. niger*, una cepa de *Trichoderma sp.*, en particular una cepa de *T. reesei*, *T. viride*, *T. longibrachiatum*, *T. harzianum* o *T. Koningii*, o bien una cepa de *Neocallimastix sp.*, de *Piromyces sp.*, de *Penicillium sp.*, de *Agaricus sp.*, o de *Phanerochaete sp.*.

45 De forma alternativa y según unos procedimientos bien conocidos, el ADN que codifica una celulasa útil puede ser aislado convenientemente del ADN de una fuente adecuada, como puede ser cualquiera de los organismos anteriormente mencionados, usando sondas sintéticas de oligonucleótidos preparadas en base a una secuencia de ADN conocida.

50 Posteriormente, la secuencia de ADN puede ser introducida en un vector de expresión recombinante. Este podrá ser cualquier vector que pueda ser convenientemente sometido a procedimientos de ADN recombinante, y la elección del vector dependerá a menudo de la célula huésped en la que vaya a ser introducido. De esta manera, el vector podrá ser un vector de replicación autónoma, es decir, un vector que existe como una entidad extracromosomal, cuya replicación es independiente de la replicación cromosómica, p. ej. un plásmido. De forma alternativa, el vector podrá ser uno que, al ser introducido en una célula huésped, se integre en el genoma huésped celular y se replique con los cromosomas en los que haya sido integrado.

60 En el vector, la secuencia de ADN codificadora de la celulasa debería estar conectada de forma operativa a un promotor y a una secuencia de terminación adecuados. El promotor puede ser cualquier secuencia de ADN que muestre una actividad transcripcional en la célula huésped seleccionada y podrá proceder de genes codificadores de proteínas, ya sean homólogos o heterólogos de la célula huésped. Los procedimientos empleados para enlazar las secuencias de ADN que codifican la celulasa, el promotor y el terminador, respectivamente, y para insertarlos en vectores adecuados son bien conocidos para los expertos en la técnica (ver, por ejemplo, Sambrook et al., *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, NY, 1989).

65 La célula huésped transformada con la secuencia de ADN es preferiblemente una célula eucariótica, en particular una célula micótica, como una levadura, o una célula micótica filamentosas. En particular, la célula puede pertenecer a una especie de *Aspergillus* o de *Trichoderma*, más preferiblemente *Aspergillus oryzae* o *Aspergillus niger*. Las células

micóticas pueden ser transformadas mediante un proceso que implica la formación de protoplastos y la transformación de los protoplastos, seguida de la regeneración de la membrana celular según un modo conocido *per se*. La utilización del *Aspergillus* como microorganismo huésped se describe en la patente EP 238 023 (Novo Nordisk NS), cuyos contenidos están incorporados en la presente como referencia. La célula huésped también puede ser una célula de levadura, p. ej. una cepa de *Saccharomyces*, en particular *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces kluyveri* o *Saccharomyces uvarum*, una cepa de *Schizosaccharomyces sp.*, como *Schizosaccharomyces Pombe*, una cepa de *Hansenula sp.*, de *Pichia sp.*, de *Yarrowia sp.*, como *Yarrowia lipolytica*, o bien de *Kluyveromyces sp.*, como *Kluyveromyces lactis*.

En este contexto, el término “homólogo” o “secuencia homóloga” indica una secuencia de aminoácidos que difiere en uno o más residuos de aminoácidos de las que se muestran en cada uno de los dos listados de secuencias mostrados posteriormente, respectivamente. La secuencia homóloga puede ser resultado de la modificación de una de las secuencias de aminoácidos mostradas en estos listados, p. ej. implicando la sustitución de uno o más residuos de aminoácidos en uno o más sitios diferentes en la secuencia de aminoácidos, la eliminación de uno o más residuos de aminoácidos en ambos extremos de la enzima o en uno o más sitios de la secuencia de aminoácidos, o la inserción de uno o más residuos de aminoácidos en uno o más sitios de la secuencia de aminoácidos.

No obstante, como será evidente para el experto en la técnica, los cambios en los aminoácidos son preferiblemente de naturaleza inferior, es decir sustituciones de aminoácidos conservadoras que no influyen significativamente en el plegamiento o en la actividad de la proteína, pequeñas eliminaciones, normalmente de aproximadamente entre uno y 30 aminoácidos; pequeñas extensiones de terminales amino- o carboxilo-, tales como un residuo de metionina con terminal amino-, un péptido de enlace pequeño de hasta aproximadamente 20-25 residuos o una pequeña extensión que facilite la purificación, como una vía de poli-histidina, un epitopo antigénico o un dominio de enlace. Ver en general Ford et al., *Protein Expression and Purification 2*: 95-107, 1991. Algunos ejemplos de sustituciones conservadoras se encuentran dentro del grupo de aminoácidos básicos (como arginina, lisina, histidina), de aminoácidos ácidos (como ácido glutámico y ácido aspártico), de aminoácidos polares (como glutamina y asparaguina), de aminoácidos hidrofóbicos (como leucina, isoleucina, valina), de aminoácidos aromáticos (como fenilalanina, triptófano, tirosina) y de aminoácidos pequeños (como glicina, alanina, serina, treonina, metionina).

También será evidente para los expertos en la técnica que estas sustituciones pueden realizarse fuera de las regiones fundamentales para el funcionamiento de la molécula y todavía dar como resultado un polipéptido activo. Se pueden identificar los aminoácidos esenciales para la actividad del polipéptido codificados por la construcción del ADN de la invención y, en consecuencia, preferiblemente no sometidos a sustituciones, mediante procedimientos conocidos en la técnica, como por ejemplo la mutagénesis sitio-dirigida o la mutagénesis por análisis de alanina (Cunningham and Wells, *Science* 244, 1081-1085, 1989). En esta última técnica se introducen mutaciones en todos los residuos de la molécula, y las moléculas mutantes resultantes son evaluadas por su actividad biológica (es decir, celulasa) para identificar los residuos de aminoácidos fundamentales para la actividad de la molécula. También se pueden determinar los sitios de interacción del sustrato enzimático mediante el análisis de la estructura cristalina, tal y como se determina por técnicas, como por ejemplo, resonancia magnética nuclear, cristalografía o marcaje por fotoafinidad. Ver, por ejemplo, de Vos et al., *Science* 255: 306-312, 1992; Smith et al., *J. Mol. Biol.* 224: 899-904, 1992; Wlodaver et al., *FEBS Lett.* 309: 59-64, 1992.

La modificación de la secuencia de aminoácidos puede ser realizada idóneamente mediante la modificación de la secuencia de ADN que codifica la enzima, p. ej. por mutagénesis sitio-dirigida o por mutagénesis aleatoria o por una combinación de ambas, según procedimientos bien conocidos. De forma alternativa, la secuencia homóloga puede ser la de una enzima derivada de otro origen distinto al de las celulastas correspondientes a las secuencias de aminoácidos mostradas en cada listado de secuencias mostrado posteriormente, respectivamente. De esta manera, “homólogo” puede p. ej. referirse a un polipéptido codificado por el ADN que hibrida la misma sonda que el ADN codificador de la celulasa, con la secuencia de aminoácidos en cuestión, bajo unas condiciones específicas determinadas (como prerremojado en 5 x SSC y prehibridación durante 1 h a ~40°C en una solución del 20% de formamida, 5 x solución Denhardt's, fosfato sódico 50 mM, pH 6.8, y 50 Mg de ADN de timo de ternero desnaturalizado ultrasónico, seguido de la hibridación en la misma solución completada con 100 mM ATP durante 18 h a ~40°C). La secuencia homóloga normalmente muestra un grado de homología (en cuanto a identidad) de al menos el 50%, así como al menos el 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o incluso el 95% con las secuencias de aminoácidos mostradas en los listados de secuencias mostrados posteriormente, respectivamente.

La homología a la que se hace referencia arriba está determinada según el grado de identidad entre las dos secuencias, indicando una derivación de la primera secuencia de la segunda. La homología puede ser determinada de forma idónea mediante programas informáticos conocidos en la técnica, como por ejemplo el GAP, proporcionado en el paquete de programas GCG (Needleman, S.B. y Wunsch, C.D., *Journal of Molecular Biology*, 48: 443-453, 1970).

Descripción detallada de la invención

Tejido celulósico teñido

El procedimiento de la invención puede aplicarse a cualquier tipo de tejido celulósico teñido en el que se desee provocar una variación localizada de la densidad del color en superficie. Un ejemplo de interés comercial en particular es el denim, en particular el denim teñido de azul índigo para utilizar en vaqueros etc.

ES 2 200 070 T3

El tejido puede ser tratado en forma de una tela sin coser o una prenda cosida hecha de este tejido. Es particularmente interesante aplicar el proceso de la invención en una tela o prenda nueva y limpia.

Componente 1

El primer componente es una celulasa de la Familia 5 ó 7 que exhibe al menos el 30% de su actividad óptima con un pH 7. Está presente en una cantidad efectiva para impedir la coloración retroactiva, normalmente entre 0.05 y 5 mg/l (como una proteína enzimática pura), en particular entre 0.1 y 0.5 mg/l; normalmente correspondiendo a una actividad de 10-1000 ECU/l, en particular de 100-1000 ECU/l; o a una actividad de 0.5-100 ECU/g de tejido.

Celulasa de la Familia 5

La celulasa de la Familia 5 empleada en la invención es capaz de hidrolizar celotriosa y/o p-nitrofenil-b-1,4-celobiosida (PNP-Cel); la celulasa puede tener una acción indirecta en la celotriosa, hidrolizándola para formar una celobiosa sin formación alguna de glucosa. La capacidad de la celulasa para hidrolizar PNP-Cel puede ser determinada por el método de ensayo descrito a continuación, y se considera que la celulasa tiene esta condición si este ensayo da como resultado más de 0.1 micromoles de PNP por minuto por ECU.

La celulasa de la Familia 5 no tiene preferiblemente ningún dominio de enlace de celulosa. La celulasa de la Familia 5 puede ser una celulasa alcalina (p. ej. una endoglucanasa) derivada de una cepa bacteriana como *Bacillus* o *Clostridium*.

Una celulasa de la Familia 5 es la endoglucanasa de la cepa de *Bacillus* KSM-64 (FERM BP-2886). La celulasa y su secuencia de aminoácidos están descritas en la patente JP-A 4-190793 (Kao) y Sumitomo et al., *Biosci. Biotech. Biochem.*, 56 (6), 872-877 (1992).

Otra celulasa de la Familia 5 es la endoglucanasa de la cepa KSM-635 (FERM BP-1485). La celulasa y su secuencia de aminoácidos se describen en la patente JP-A 1-281090 (Kao), US 4,945,053 y en Y. Ozaki et al., *Journal of General Microbiology*, 1990, Vol. 136, p. 1973-1979. Tiene una actividad en la PNP-Cel de 0.18 micromoles de PNP/min/ECU según el ensayo anterior.

Una tercera celulasa de la Familia 5 es la endoglucanasa de la cepa 1139. La celulasa y su secuencia de aminoácidos se describen en Fukumori F. et al., *J. Gen. Microbiol.*, 132:2329-2335 (1986) y en la patente JP-A 62-232386 (Riken).

Una cuarta celulasa de la Familia 5 es la endoglucanasa Endo 3A de *Bacillus lautus* NCIMB 40250 descrita en la patente WO 91/10732 (Novo Nordisk). Posteriormente se descubrió que la secuencia de aminoácidos descrita era incorrecta, y la secuencia correcta se muestra en la SEQ ID N°: 1. La celulasa tiene una actividad en la PNP-Cel de 0.44 micromoles de PNP/min/ECU.

Una quinta celulasa de la Familia 5 es la celulasa de *Bacillus sp.* NCIMB 40482, que tiene un peso molecular aparente de aproximadamente 45 kD, está descrita en la patente WO 94/01532 (Novo Nordisk). Su actividad en la PNP-Cel es de 0.22 micromoles de PNP/min/ECU.

Una sexta celulasa de la Familia 5 es la endoglucanasa A de *Clostridium cellulolyticum* descrita en E. Faure et al., *Gene*, 84 (1), 39-46 (1989) y Fierobe H-P et al., *J. Bacteriol.*, 173 (24), 7956-7962 (1991).

Celulasa de la Familia 7

La celulasa de la Familia 7 que se utilizará en la invención puede derivar de una cepa micótica y es normalmente capaz de hidrolizar celotriosa directamente en celobiosa y glucosa, y es capaz de hidrolizar PNP-Cel, como se determina, p. ej. mediante el método de ensayo descrito posteriormente.

La celulasa de la Familia 7 puede derivar de una cepa de *Hemicola*, preferiblemente de *H. insolens*. Un ejemplo es la endoglucanasa EG I derivada de la cepa de *H. insolens* DSM 1800, descrita en la patente WO 91/17244 (Novo Nordisk). La celulasa madura contiene una secuencia con los 415 aminoácidos mostrados en las posiciones 21-435 de la Fig. 14 y tiene una actividad específica de 200 ECU/Mg (basada en una proteína enzimática pura). Esta celulasa puede adicionalmente estar truncada en el terminal C hasta en 18 aminoácidos, conteniendo al menos 397 aminoácidos. A modo de ejemplo, la celulasa puede estar truncada en 402, 406, 408 ó 412 aminoácidos. Otro ejemplo es una variante de la misma denominada endoglucanasa EG I* descrita en la patente WO 95/24471 (Novo Nordisk) que tiene una secuencia de 402 aminoácidos mostrada en la Fig. 3.

De forma alternativa, la celulasa de la Familia 7 puede derivar de una cepa de *Myceliophthora*, preferiblemente de la *M. thermophila*, más preferiblemente de la cepa CBS 117.65. Un ejemplo es una endoglucanasa descrita en la patente WO 95/24471 (Novo Nordisk) que comprende los aminoácidos 21-420, y opcionalmente también los aminoácidos 1-20 y/o 421-456, de la secuencia mostrada en la Fig. 6.

Como otra alternativa, la celulasa de la Familia 7 puede derivar de una cepa de *Fusarium*, preferiblemente de *F. oxysporum*. Un ejemplo es una endoglucanasa derivada de *F. oxysporum* descrita en la patente WO 91/17244 (Novo

ES 2 200 070 T3

Nordisk) y en Sheppard, P.O. et al., *Gene*. 150:163-167, 1994. La secuencia de aminoácidos correcta viene dada en la última referencia. Esta celulasa tiene una actividad específica de 350 ECU/mg.

Componente 2

5 El segundo componente es un agente abrasivo mecánico y/o una celulasa abrasiva. Una forma de realización preferida de la invención emplea una combinación de un agente abrasivo mecánico y de una celulasa abrasiva como segundo componente.

10 Algunos ejemplos de agentes abrasivos mecánicos son la piedra pómez, la perlita expandida por el calor y elementos abrasivos (p. ej. bolas abrasivas).

15 La celulasa abrasiva es la que ejerce una actividad abrasiva o de aclaración del color, descrita por ejemplo en la patente EP 220016 (Novo Nordisk NS), y exhibe al menos el 30% de su actividad óptima con un pH 7. Puede tratarse de una celulasa de la familia 12 ó 45 con un dominio de enlace de la celulosa.

20 La celulasa de la familia 45 utilizada en la invención puede derivar de una cepa de *Humicola*, preferiblemente de *H. insolens*. Un ejemplo es una endoglucanasa denominada EG V derivada de la cepa de *H. insolens* DSM 1800 con un peso molecular de ~43 kD. La celulasa y su secuencia de aminoácidos se describen en la patente WO 91/17243 (Novo Nordisk). Tiene una actividad específica de 430 ECU/mg.

25 La celulasa de la familia 12 utilizada en la invención puede derivar de una cepa de *Trichoderma*, preferiblemente de *T. longibrachiatum*. Un ejemplo es una endoglucanasa EG III descrita en la patente WO 94/21801 (Genencor) en la que se muestra la secuencia de aminoácidos.

30 El segundo componente está presente en una cantidad eficaz para que la abrasión provoque una variación localizada de la densidad del color. Si el segundo componente es una celulasa abrasiva, estará presente normalmente en una cantidad de 0.05-5 mg/l (en forma de una proteína enzimática pura), particularmente de 0.1-0.5 mg/l; normalmente correspondiendo a una actividad de 10-1000 ECU/l, particularmente de 100-1000 ECU/l; o una actividad de 0.1-100 ECU/g de tejido, particularmente de 0.5-10 ECU/g.

Condiciones del proceso

35 El proceso de la invención puede realizarse bajo condiciones convencionales en una máquina de lavado usada de forma convencional para el lavado a la piedra (p. ej. una lavadora-extractora). Unas condiciones típicas son una temperatura de entre 40 y 60°C y una proporción tejido: solución entre 1:3 y 1:20 durante 15 minutos a 2 horas. De forma opcional, se pueden emplear aditivos convencionales, p. ej. un tampón, un agente tensioactivo (aniónico y/o no-iónico) y/o un polímero (por ejemplo: PVP, poliacrilato y poliacrilamida).

40 Ensayo de la actividad celulasa

La endo-actividad de la celulasa se determina por la reducción de la viscosidad de la CMC (celulosa carboximetilica) en un viscosímetro de vibración. Una ECU (unidad de endo-celulasa) es la cantidad de actividad que causa una reducción de la viscosidad diez veces menor cuando se incuba con 1 ml de una solución de 34.0 g/l de CMC (nombre comercial Aqualon 7LFD) en un tampón de fosfato 0.1 M (pH 7.5), a 40°C durante 30 minutos.

Ensayo de la hidrólisis de PNP-Cel

50 La capacidad de una celulasa para hidrolizar la p-nitrofenil-b-1,4-celobiosida (PNP-Cel) se determina por la detección directa por cinética estable del color amarillo del producto de p-nitrofenol (PNP) por absorción a 405 nm. Las condiciones del ensayo son 37°C, pH 7.5 (tampón de fosfato 0.1 M). El nivel de hidrólisis (en micromoles de PNP por minuto) es comparado con la actividad celulasa (ECU) y el resultado se expresa en micromoles de PNP por minuto por ECU.

55 Ejemplos

Ejemplo 1

60 Se trató un denim teñido de azul indigo junto con muestras de algodón blanco usando varias combinaciones de celulasa, de la manera siguiente:

pH 7	(tampón de fosfato en agua corriente)
Temperatura	55°C
Equipamiento	Launderómetro (recipientes de 150 ml)
Componente 1	EG I derivada de <i>Humicola insolens</i> DSM 1800 0-2.3 ECU/ml como se indica más abajo

ES 2 200 070 T3

Componente 2 EG V derivada de *Humicola insolens* DSM 1800
0 ó 0.27 ECU/ml
Denim 5 g/recipiente
Algodón blanco 2 muestras/recipiente
Duración 2 horas

Después del tratamiento, la fibra de algodón fue recogida y medida como una expresión de la acción abrasiva de la (s) celulasa(s). Se determinó la remisión de las muestras blancas después del tratamiento (D R a 680 nm, en relación a un experimento sin celulasa) y se consideró como una expresión de la coloración retroactiva.

Resultados

	Componente 1 ECU/ml	Componente 2 ECU/ml	Abrasión (mg fibra de algodón)	Reducción de la coloración retroactiva (D R)
Referencia	0	0	-	0
	0	0.27	33	-3.8
Invención	0.115	0.27	42	-0.7
	0.23	0.27	36	3.0
	1.15	0.27	38	8.2
	2.3	0.27	62	10.4

Se obtuvo una buena abrasión con la celulasa del componente 2. La adición de la celulasa del componente 1 redujo significativamente la coloración retroactiva.

Ejemplo 2

Las siguientes celulasas fueron evaluadas con las mismas condiciones del ejemplo 1:

Componente 1 EG I o EG I* derivada de *Humicola insolens* DSM 1800
0, 0.67 ó 1.33 ECU/ml

Componente 2 EG I derivada de *Humicola insolens* DSM 1800, 0.7 ECU/ml

Se evaluó la abrasión midiendo la cantidad de fibra de algodón después de cada tratamiento. Se obtuvo una buena abrasión en cada experimento, con un ligero aumento causado por la adición de EG I o EG I*.

Se determinó la inhibición de la coloración retroactiva por el aumento de la absorbancia del filtrado a 680 nm y por aumento de la remisión del tejido blanco a 420 nm. Los resultados indicaron que se había obtenido esencialmente la misma inhibición de la coloración retroactiva con la EG I que con la EG I*.

Ejemplo 3

En el primer paso, se preparó una solución de color azul de denim agitando 12 partes (5 x 5 cm) de denim azul con 800 ml de tampón de fosfato (pH 7.0) y 0.8 ml de un agente tensioactivo no-iónico a 50°C durante 30 minutos, seguido de una filtración.

En el segundo paso, se incubaron 5 piezas de algodón blanco con 200 ml de la solución azul a 50°C durante 30 minutos con 0-100 ECU/L de celulasa. La celulasa evaluada fue una mezcla de la EG I derivada de *Humicola insolens* DSM 1800 truncada en los aminoácidos 406, 408 y 412.

Tras el aclarado y secado, se determinó la inhibición de la coloración retroactiva según el aumento de la claridad (L*) de las muestras blancas determinada por el Micro Color Data Station del Dr. Lange.

ES 2 200 070 T3

Resultados (promedio para 5 muestras)

	ECU/L	Claridad (L*) media
5	0	83.42
	1	84.02
10	10	86.16
	100	92.58

Los resultados demuestran que la EG I es eficaz para reducir la coloración retroactiva de denim azul en algodón blanco.

Ejemplo 4

Una celulasa *Bacillus* alcalina de la Familia 5 fue evaluada según la invención de forma similar al ejemplo 3. Los resultados fueron los siguientes:

	ECU/L	Claridad (L*)
25	0	82.52
	90	83.82

Los resultados demuestran que esta celulasa también resulta eficaz para reducir la coloración retroactiva.

Ejemplo 5

Se agitaron 4 piezas (5 x 5 cm) de denim azul descolado y 8 piezas (5 x 5 cm) de algodón blanco mercerizado en 400 ml de un tampón de fosfato 50 mM (pH 7.0) que contenía una celulasa de la familia 5 ó 7, junto con una celulasa de la familia 45 según la invención (200 ECU/l de cada celulasa). Transcurridos 30 minutos, los tejidos fueron aclarados con agua corriente y secados con aire.

La celulasa de la Familia 5 era una celulasa de *Bacillus* alcalina. La celulasa de la Familia 7 era la EG I derivada de *Humicola insolens* truncada en 408 aminoácidos. La celulasa de la Familia 45 era la EG V derivada de *Humicola insolens* DSM 1800.

Se midió la claridad (L*) de ambos tejidos y la absorbancia a 680 nm del sobrenadante.

Resultados

Familia de la celulasa		Claridad (L*)		A ₆₈₀
Primer componente	Segundo componente	Algodón mercerizado	Denim	
Ninguno	Familia 45	84.8	22.83	0.132
Familia 7	Familia 45	86.3	23.55	0.212
Familia 5	Familia 45	86.2	23.50	0.238

Los resultados para el algodón mercerizado indican una mayor claridad, es decir, una menor coloración retroactiva, provocada por la adición de la celulasa del segundo componente de la invención.

Los resultados también indican una mayor claridad, es decir, una menor coloración retroactiva, para el denim azul. Una inspección visual indicó que el denim tratado según la forma descrita en la invención tenía una variación localizada más pronunciada de la intensidad del color, tal y como era deseado.

Los datos de la absorbancia del sobrenadante indican que la mayor parte del pigmento permanece en el líquido después del tratamiento.

ES 2 200 070 T3

REIVINDICACIONES

1. Método para provocar una variación localizada de la densidad del color en la superficie de un tejido celulósico teñido, que comprende la agitación del tejido en un medio acuoso con un pH en una gama entre 6.5 y 9, y que contiene:

un primer componente que puede ser

(a) una celulasa de la Familia 5 capaz de hidrolizar p-nitrofenil-b-1,4-celobiosida, o bien

(b) una celulasa de la Familia 7,

y un segundo componente que puede ser

(a) un agente abrasivo mecánico, o bien

(b) una celulasa con actividad abrasiva.

donde cada celulasa exhibe al menos un 30% de su actividad máxima con un pH 7.

2. Método según la reivindicación 1 según el cual el tejido es denim teñido de azul índigo.

3. Método según la reivindicación 1 ó 2, según el cual el primer componente es una celulasa de la Familia 5 sin un dominio de enlace de la celulosa, derivada de una cepa bacteriana, preferiblemente de una cepa de *Bacillus*.

4. Método según la reivindicación 3 según el cual la celulasa de la Familia 5 deriva de una cepa de *Bacillus* seleccionada del grupo compuesto por *Bacillus sp.* KSM-64, 1139, KSM-635, NCIMB 40482 y *Bacillus lautus* NCIMB 40250, o es una celulasa con al menos un 60% de homología con esta celulasa.

5. Método según la reivindicación 1 ó 2 según el cual el primer componente es una celulasa de la Familia 7 derivada de una cepa micótica, preferiblemente de una cepa de *Hemicol*, más preferiblemente de *H. insolens*.

6. Método según la reivindicación 5, según el cual la celulasa de la Familia 7 es una endoglucanasa EG I derivada de una cepa de *H. insolens* DSM 1800, o es una celulasa con al menos un 60% de homología con dicha EG I.

7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el primer componente está presente en una cantidad de 0.1-0.5 mg/l o en una concentración de 100-1000 ECU/l.

8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-7 en el que el segundo componente consta de un agente abrasivo mecánico, así como de una celulasa abrasiva.

9. Método de cualquiera de las reivindicaciones 1-8 en el que el segundo componente es una celulasa de la Familia 45 con un dominio de enlace de la celulosa, derivada de una cepa micótica, preferiblemente una cepa de *Hemicol*, más preferiblemente de *H. insolens*.

10. Método según la reivindicación 9 en el que la celulasa de la Familia 45 es una endoglucanasa EG V derivada de una cepa de *H. insolens* DSM 1800, o es una celulasa con al menos un 60% de homología con dicha EG V.

11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-13 en el que no se encuentra presente esencialmente ninguna celulasa diferente del primer y segundo componente específico.

12. Composición de celulasa que comprende:

un primer componente que puede ser

(a) una celulasa de la Familia 5 capaz de hidrolizar p-nitrofenil-b-1,4-celobiosida, o bien

(b) una celulasa de la Familia 7,

y un segundo componente que puede ser

(a) un agente abrasivo mecánico o bien

(b) una celulasa con actividad abrasiva.

donde cada celulasa exhibe al menos un 30% de su actividad máxima con un pH 7.

ES 2 200 070 T3

13. Composición de celulasa según la reivindicación 12, **caracterizada** de la misma manera que en cualquiera de las reivindicaciones 2-11.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

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.

ES 2 200 070 T3

LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

- 5 (i) SOLICITANTE:
- (A) NOMBRE: Novo Nordisk A/S
 - (B) CALLE: novo Alle
 - (C) CIUDAD: Bagsvaerd
 - 10 (E) PAÍS: Dinamarca
 - (F) CÓDIGO POSTAL (ZIP): DK-2880
 - (G) TELÉFONO: +45-4444-8888
 - (H) FAX: +45-4449-3256
- 15
- (ii) TITULO DE LA INVENCION: Prevención de la coloración retroactiva en el lavado a la piedra
- 20 (iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 1
- (iv) FORMATO INFORMÁTICO:
- (A) TIPO DE MEDIO: disquete
 - 25 (B) ORDENADOR: PC IBM Compatible
 - (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS-MS-DOS
 - (D) SOFTWARE: Patentin Release #1.0, versión #1.30 (EPO)
- 30 (2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID N°: 1:
- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 551 aminoácidos
 - 35 (B) TIPO: aminoácido
 - (C) TIPO DE CADENA:
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
- 40 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína
- (vi) FUENTE DE ORIGEN:
- (A) ORGANISMO: *Bacillus lautus*
 - 45 (B) CEPA: NCIMB 40250
- 50
- 55
- 60
- 65

ES 2 200 070 T3

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID Nº: 1:

5	Ala	Pro	Ala	Val	Pro	Phe	Gly	Gln	Leu	Lys	Val	Gln	Gly	Asn	Gln	Leu
	1				5					10						15
	Val	Gly	Gln	Ser	Gly	Gln	Ala	Val	Gln	Leu	Val	Gly	Met	Ser	Ser	His
				20					25					30		
10	Gly	Leu	Gln	Trp	Tyr	Gly	Asn	Phe	Val	Asn	Lys	Ser	Ser	Leu	Gln	Trp
			35					40					45			
15	Met	Arg	Asp	Asn	Trp	Gly	Ile	Asn	Val	Phe	Arg	Ala	Ala	Met	Tyr	Thr
		50					55					60				
20	Ala	Glu	Asp	Gly	Tyr	Ile	Thr	Asp	Pro	Ser	Val	Lys	Asn	Lys	Val	Lys
	65					70					75					80
25	Glu	Ala	Val	Gln	Ala	Ser	Ile	Asp	Leu	Gly	Leu	Tyr	Val	Ile	Ile	Asp
					85					90					95	
30	Trp	His	Ile	Leu	Ser	Asp	Gly	Asn	Pro	Asn	Thr	Tyr	Lys	Ala	Gln	Ser
				100					105					110		
35	Lys	Ala	Phe	Phe	Gln	Glu	Met	Ala	Thr	Leu	Tyr	Gly	Asn	Thr	Pro	Asn
			115					120					125			
40	Val	Ile	Tyr	Glu	Ile	Ala	Asn	Glu	Pro	Asn	Gly	Asn	Val	Ser	Trp	Ala
		130					135					140				
45	Asp	Val	Lys	Ser	Tyr	Ala	Glu	Glu	Val	Ile	Thr	Ala	Ile	Arg	Ala	Ile
	145					150					155					160
50	Asp	Pro	Asp	Gly	Val	Val	Ile	Val	Gly	Ser	Pro	Thr	Trp	Ser	Gln	Asp
				165						170					175	
55	Ile	His	Leu	Ala	Ala	Asp	Asn	Pro	Val	Ser	His	Ser	Asn	Val	Met	Tyr
				180					185					190		
60	Ala	Leu	His	Phe	Tyr	Ser	Gly	Thr	His	Gly	Gln	Phe	Leu	Arg	Asp	Arg
			195					200					205			
65	Ile	Thr	Tyr	Ala	Met	Asn	Lys	Gly	Ala	Ala	Ile	Phe	Val	Thr	Glu	Trp
		210					215					220				
70	Gly	Thr	Ser	Asp	Ala	Ser	Gly	Asn	Gly	Gly	Pro	Tyr	Phe	Pro	Gln	Ser
						230					235					240
75	Lys	Glu	Trp	Ile	Asp	Phe	Leu	Asn	Ala	Arg	Lys	Ile	Ser	Trp	Val	Asn
				245						250					255	
80	Trp	Ser	Leu	Ala	Asp	Lys	Val	Glu	Thr	Ser	Ala	Ala	Leu	Met	Pro	Gly
				260					265					270		
85	Ala	Ser	Pro	Thr	Gly	Gly	Trp	Thr	Asp	Ala	Gln	Leu	Ser	Glu	Ser	Gly
			275					280					285			

ES 2 200 070 T3

5	Lys Trp Val Arg Asp Gln Ile Arg Gln Ala Thr Gly Gly Gly Ser Gly 290 295 300
	Asn Pro Thr Ala Pro Ala Ala Pro Thr Asn Leu Ser Ala Thr Ala Gly 305 310 315 320
10	Asn Ala Gln Val Ser Leu Thr Trp Asn Ala Val Ser Gly Ala Thr Ser 325 330 335
15	Tyr Thr Val Lys Arg Ala Thr Thr Ser Gly Gly Pro Tyr Thr Asn Val 340 345 350
	Ala Thr Gly Val Thr Ala Thr Ser Tyr Thr Asn Thr Gly Leu Thr Asn 355 360 365
20	Gly Thr Thr Tyr Tyr Tyr Val Val Ser Ala Ser Asn Ser Ala Gly Ser 370 375 380
25	Ser Ala Asn Ser Ala Gln Ala Ser Ala Thr Pro Ala Ser Gly Gly Ala 385 390 395 400
30	Ser Thr Gly Asn Leu Val Val Gln Tyr Lys Val Gly Asp Thr Ser Ala 405 410 415
	Thr Asp Asn Gln Met Lys Pro Ser Phe Asn Ile Lys Asn Asn Gly Thr 420 425 430
35	Thr Pro Val Asn Leu Ser Gly Leu Lys Leu Arg Tyr Tyr Phe Thr Lys 435 440 445
40	Asp Gly Thr Ala Asp Met Ser Ala Ser Phe Asp Trp Ala Gln Ile Gly 450 455 460
	Ala Ser Asn Val Ser Ala Ala Phe Ala Asn Phe Thr Gly Ser Asn Thr 465 470 475 480
45	Asp Thr Tyr Val Glu Leu Ser Phe Ser Ala Gly Ser Gly Ser Ile Pro 485 490 495
50	Ala Gly Gly Gln Thr Gly Asp Ile Gln Leu Arg Met Tyr Lys Thr Asp 500 505 510
55	Trp Ser Asn Phe Asn Glu Ala Asn Asp Tyr Ser Tyr Asp Gly Ala Lys 515 520 525
	Thr Ala Tyr Ala Asp Trp Asn Arg Val Thr Leu His Gln Asn Gly Thr 530 535 540
60	Leu Val Trp Gly Thr Thr Pro 545 550
65	