



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 357 137**

(51) Int. Cl.:

C12N 9/42 (2006.01)

C11D 3/386 (2006.01)

D06M 16/00 (2006.01)

D21C 5/00 (2006.01)

A23K 1/165 (2006.01)

C12N 15/55 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **05854547 .6**

(96) Fecha de presentación : **16.12.2005**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1828380**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **05.09.2007**

(54) Título: **Núcleo catalítico de celulasa neutro y procedimiento para producirlo.**

(30) Prioridad: **23.12.2004 US 638953 P**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
19.04.2011

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
19.04.2011

(73) Titular/es: **GENENCOR INTERNATIONAL, Inc.**
925 Page Mill Road
Palo Alto, California 94304, US

(72) Inventor/es: **Bao, Kai y**
Wang, Huaming

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

DESCRIPCIÓN

CAMPO DE LA INVENCION

- 5 [0001] Esta invención se refiere a un procedimiento para producir altos niveles de novedosas proteínas de celulosa truncadas en una célula hospedadora, a transformantes de una célula hospedadora producidas mediante técnicas de ingeniería genética; y a nuevas proteínas de celulosa producidas mediante dichos transformantes. Las nuevas proteínas de celulosa son nuevos núcleos catalíticos de celulosa. Se desvela un tratamiento de tejidos que contienen celulosa con los dominios de núcleo de celulosa de la invención para ofrecer unas ventajas específicas de una redistribución reducida de pigmento y un incremento en la abrasión.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- 10 [0002] Las celulasas son enzimas que hidrolizan los enlaces β -D-glucosídicos de las celulosas. Las enzimas celolíticas se han dividido tradicionalmente en tres clases principales: endoglucanasas, exoglucanasas o celobiohidrolasas y β -glucosidasas (Knowles, J. y col., TIBTECH 5: 255-261 (1987)). Se sabe que las celulasas son producidas por un gran número de bacterias, levaduras y hongos.

- 15 [0003] Entre las principales aplicaciones que se han desarrollado para el uso de enzimas celolíticas están aquellas implicadas en la degradación de pulpa de celulosa (madera) en azúcares para la producción de (bio)etanol, tratamientos textiles, como "lavado a la piedra" y "biopulido," y en composiciones detergentes. También se sabe que las celulasas son útiles en composiciones detergentes para eliminar la suciedad, es decir, para la limpieza. Por ejemplo, las Solicitudes de Gran Bretaña N^{os} 2.075.028, 2.095.275 y 2.094.826 ilustran un comportamiento limpiador mejorado con detergentes que tienen incorporados celulasas. Adicionalmente, la Solicitud de Gran Bretaña N^o 1.358.599 ilustra el uso
20 de celulosa en detergentes para reducir el tacto áspero de los tejidos que contienen algodón.

- [0004] Otra característica útil de las celulasas en el tratamiento de textiles es su capacidad de reacondicionar tejidos usados haciendo sus colores más vivos. Por ejemplo, el lavado repetido de tejidos que contienen algodón da como resultado un engrisamiento del tejido. Se cree que esto es debido a fibrillas desorganizadas y desordenadas, denominadas a menudo "bolitas," producidas por una acción mecánica. Este engrisamiento es particularmente
25 apreciable en tejidos de color. Como consecuencia, se ha encontrado que es valiosa la capacidad de la celulasa de eliminar la desordenada capa superior de la fibra, y mejorar por tanto el aspecto global de la tela. Dado que los detergentes, que son una aplicación principal de la celulasa, operan generalmente en condiciones alcalinas, hay una fuerte demanda de celulasas que muestren una alta actividad a pH 7-10. Algunas celulasas fúngicas bien caracterizadas, tales como las de *Humicola insolens* y *Trichoderma reesei*, trabajan adecuadamente a un pH neutro y
30 alcalino bajo. Se han aislado numerosas enzimas que muestran una actividad de celulasa a un pH altamente alcalino a partir de *Bacillus* y otros procariotas, véanse, por ejemplo, las publicaciones PCT N^{os} WO96/34092 y WO96/34108. Por lo tanto, se han investigado tanto celulasas fúngicas como bacterianas profundamente. Sin embargo, un tercer grupo de celulasas, las aisladas a partir de *Actinomycetes*, ha atraído sólo una exigua atención. Wilson, y col., Critical Reviews in Biotechnology, 12: 45-63 (1992), han estudiado las celulasas producidas por *Thermomonospora fusca*,
35 *Thermomonospora curvata* y *Microbispora bispora* y han demostrado que muchas de estas celulasas muestran amplios perfiles de pH y una buena estabilidad frente a la temperatura. De forma similar, Nakai, y col., Agric. Biol. Chem., 51: 3061-3065 (1987) y Nakai, y col., Gene, 65: 229-238 (1988) han mostrado la celulasa alcalinotolerante *casA* de la cepa KSM-9 de *Streptomyces*. Esta celulasa posee un pH óptimo alcalino y una excelente estabilidad frente a la temperatura.

- [0005] A pesar de los conocimientos en la materia relacionados con muchas composiciones de celulasa con
40 propiedades deseables, incluyendo algunos ejemplos procedentes de *Actinomycetes*, hay una continua necesidad de nuevas celulasas con un espectro variable de características útiles como, por ejemplo, tratamientos textiles, coadyuvantes de composiciones detergentes, tratamientos de pulpa y papel, complementos alimenticios para animales, coadyuvantes del procesado en panadería, y convertidores de biomasa. Los solicitantes han descubierto celulasas que poseen dicho complemento de características y que son útiles en dichas aplicaciones conocidas de las celulasas.

45 BREVE RESUMEN DE LA INVENCION

[0006] La presente invención se refiere a un dominio de núcleo catalítico de celulasa, a construcciones, vectores y células hospedadoras que comprenden una o más de las secuencias promotoras unidas operativamente a una secuencia codificante heteróloga.

- 50 [0007] Consecuentemente, en un aspecto, la presente invención proporciona una celulasa aislada con una secuencia de aminoácidos consistente en la secuencia de aminoácidos según se establece en la Figura 1E. Esta celulasa tiene excelentes propiedades para su uso en detergentes, el tratamiento de textiles, como complemento alimenticio y en la elaboración de pulpa y papel, según se desvelará posteriormente en este documento.

- [0008] En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una secuencia de ADN que codifica la celulasa que tiene la secuencia de ácidos nucleicos según se establece en la Figura 2. En aspectos adicionales, la presente
55 invención proporciona la expresión que comprende el ADN establecido en la Figura 2, tal como es el vector pKB107, y células hospedadoras que han sido transformadas con un vector que comprende el ADN que codifica la secuencia de aminoácidos presentada en la Figura 2. En una realización, cuando la célula hospedadora es de una especie de

Streptomyces, la célula hospedadora puede tener opcionalmente delecionado el gen *cyc2* (gen de la vía de la geosmina).

5 [0009] La presente invención también se refiere a procedimientos y usos de las celulasas reivindicadas. Los procedimientos pueden usarse para el tratamiento de tejidos que contienen celulosa con dominios del núcleo de celulasa según se define en la reivindicación 1. Los procedimientos y usos proporcionan las ventajas específicas de una red deposición reducida de pigmento, un incremento en la abrasión, un tacto mejorado del tejido (es decir, un ablandamiento), una superficie del tejido más suave, la eliminación de bolitas y/o la prevención de bolitas.

10 [0010] En otros aspectos, los procedimientos y usos de las celulasas reivindicadas son para incrementar la digestibilidad de alimento para animales, en detergentes, en el tratamiento de pulpa y papel, y en la producción de almidón y el tratamiento de subproductos del mismo.

[0011] Sin embargo, debería entenderse que la descripción detallada y los ejemplos específicos, aunque indican las realizaciones preferidas de la invención, se dan únicamente a modo de ilustración, dado que a partir de esta descripción detallada el experto en la materia apreciará diversos cambios y modificaciones dentro del ámbito y el espíritu de la invención.

15 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0012] La **Figura 1** ilustra las diversas proteínas celulasas. La Figura 1A es la pre-proteína.

20 La **Figura 1B** es la proteína celulasa 11 AG8 madura. La **Figura 1C** es la proteína celulasa de 233 aminoácidos 11AG8 sin el CBD. La **Figura 1D** es la proteína celulasa de 230 aminoácidos 11AG8 sin el CBD. La **Figura 1E** es el núcleo catalítico de celulasa de 221 aminoácidos 11AG8, es decir, sin el CBD o el conector. La secuencia de señalización está en rosa. El conector tiene 12 aminoácidos de longitud con 9 residuos en marrón y 3 en rojo. Los tres aminoácidos que en la proteína de 233 aminoácidos (y subrayados sólo en la Fig. 1A) están en rojo. El CBD está en azul.

La **Figura 2** es una secuencia de ADN que codifica el núcleo catalítico de 221 aminoácidos de la celulasa 11AG8.

La **Figura 3** muestra el vector pSEGCT11 AG8 que incluye:

- un promotor de glucosa isomerasa derivado de *Actinoplanes missouriensis*,
- 25 una secuencia de señalización de la celulasa de *S. lividans*, celA,
- un polinucleótido que codifica el gen de la celulasa 11AG8 de una especie de *Actinomyces*,
- una secuencia terminadora de la celulasa 11 AG3.

La **Figura 4** muestra el vector pSEA4CT-11AG8 que incluye:

- un promotor A4 derivado de *Aspergillus niger*,
- 30 una secuencia de señalización de la celulasa de *S. lividans*, celA,
- un polinucleótido que codifica el gen de la celulasa 11 AG8 de una especie de *Actinomyces*,
- una secuencia terminadora de la celulasa 11AG3.

El promotor GI de pSEGCT11 AG8 se ha sustituido por el promotor A4 de *Aspergillus niger*.

La **Figura 5** muestra la estrategia de construcción de pKB105.

35 La **Figura 6** es el vector pKB105 que incluye:

- un promotor A4 derivado de *Aspergillus niger*,
- una secuencia de señalización de la celulasa de *S. lividans*, celA,
- un polinucleótido que codifica el núcleo catalítico de 221 a.a. de la celulasa 11AG8 de una especie de *Actinomyces*,
- una secuencia terminadora de la celulasa 11AG3.

40 [0013] La **Figura 7** muestra el vector pKB107, que es pKB105 una vez eliminadas las secuencias de *E. coli*.

[0014] La **Figura 8** muestra la actividad de varias muestras de celulasa en el ensayo NPC descrito en este documento. 50R6 es la muestra proteica procedente de la cepa de producción comercial para IndiAge® Neutra L. pKB105 y pKB107 son nuestras proteicas expresadas a partir de sus respectivos vectores. El núcleo catalítico muestra una actividad mayor que el producto comercial.

[0015] La **Figura 9** es un gráfico que muestra el comportamiento de abrasión de la nueva Neutra G (en comparación con el comportamiento del producto comercial, IndiAge® Neutra G. La nueva Neutra G dosificada al 65% de la actividad NPC, mostró un comportamiento de abrasión muy cercano al de IndiAge® Neutra G a una actividad del 100% independientemente del tipo de tela vaquera. La nueva Neutra G mostró un comportamiento de abrasión

[0016] [0016] La **Figura 10** es un gráfico que muestra el comportamiento de retroteñido de la nueva Neutra G en comparación con el comportamiento del producto comercial, IndiAge® Neutra G. No se observaron comportamientos significativos de retroteñido entre la nueva Neutra G y la actual IndiAge® Neutra G comercial a un nivel de abrasión similar.

10 [0017] La **Figura 11** muestra los termogramas de DSC para IndiAge® Neutra L y KB107C. La molécula de KB107C tiene un punto de fusión (Tm) de 68,7°C con respecto a los 67,87°C para IndiAge® Neutra L, lo que indica que KB107C es más estable.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

15 [0018] La invención se describirá ahora con detalle a modo de referencia únicamente usando las siguientes definiciones y ejemplos.

[0019] Salvo que en este documento se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos de este documento tienen el mismo significado que el comprendido habitualmente por el experto habitual en la materia a la que pertenece esta invención. Singleton, y col., DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY, 2ª ED., John Wiley and Sons, Nueva York (1994), y Hale & Marham, THE HARPER COLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY, Harper Perennial, NY (1991), proporcionan al experto un diccionario general de muchos de los términos usados en esta invención. Aunque pueden usarse muchos procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en este documento en la práctica o las pruebas de la presente invención, se describen los procedimientos y materiales preferidos. Los intervalos numéricos incluyen las cifras que definen el intervalo. Salvo que se indique de otro modo, los ácidos nucleicos se describen de izquierda a derecha en sentido de 5' a 3'; las secuencias de aminoácidos se describen de izquierda derecha en sentido amino a carboxilo, respectivamente. Se aconseja a los expertos consultar Sambrook y col., 1989, y Ausubel FM y col., 1993, para las definiciones y términos de la materia. Debe entenderse que esta invención no está limitada a la metodología, protocolos y reactivos en particular descritos, ya que éstos pueden variar.

[0020] Los encabezamientos proporcionados en este documento no son limitaciones de los diversos aspectos o realizaciones de la invención, que pueden tenerse como referencia de la memoria descriptiva en su totalidad. Consecuentemente, los términos definidos inmediatamente a continuación se definen más completamente con referencia a la memoria descriptiva en su totalidad.

Definiciones

[0021] El término "molécula de ácido nucleico" incluye moléculas de ARN, ADN y ADNc. Se entenderá que, como resultado de la degeneración del código genético, puede producirse una multitud de secuencias de nucleótidos que codifican una proteína dada tal como una celulasa. La presente invención contempla cada posible variante de la secuencia de nucleótidos, que codifica la actualmente reivindicada celulasa, todas las cuales son posibles dada la degeneración del código genético.

[0022] El término "aminoácido" incluye la referencia a un aminoácido que está incorporado en una proteína, un polipéptido o un péptido (en conjunto "polipéptido"). El aminoácido puede ser un aminoácido natural o, salvo que se limite de otro modo, puede englobar análogos conocidos de aminoácidos naturales que funcionan de una forma similar a los aminoácidos naturales.

[0023] "Derivado" pretende indicar un péptido o una proteína que deriva de una proteína natural mediante la adición de uno o más aminoácidos en uno o ambos de los extremos C- y N-terminal de la proteína natural, la sustitución de uno o más aminoácidos en uno o en varios sitios diferentes de la secuencia de aminoácidos natural, la delección de uno o más aminoácidos en uno o ambos extremos de la proteína natural o en uno o más sitios de la secuencia de aminoácidos, o la inserción de uno o más aminoácidos en uno o más sitios de la secuencia de aminoácidos natural. La preparación de un derivado enzimático se consigue preferiblemente modificando la secuencia de ADN que codifica la proteína natural, la transformación de esa secuencia de ADN en un hospedador adecuado y la expresión de la secuencia de ADN modificada para formar la enzima derivada. Algunos medios alternativos para preparar derivados son bien conocidos en la materia e incluyen, por ejemplo, la escisión proteolítica de las proteínas naturales o sus derivados. Los derivados de las celulasas de esta invención incluyen péptidos que comprenden secuencias de aminoácidos alteradas en comparación con una secuencia de aminoácidos de una enzima precursora (*por ejemplo*, un enzima natural según la presente invención) que conservan una característica enzimática natural de la enzima precursora pero que tienen unas propiedades alteradas en algún aspecto específico. Por ejemplo, una celulasa alterada puede tener un pH óptimo incrementado o una resistencia a la temperatura incrementada, pero conservará su característica actividad celulolítica. Adicionalmente, según se usa en este documento, el término "derivado de", con respecto a componentes del vector de expresión, significa una secuencia que es idéntica a una secuencia de referencia, es una variante natural o modificada genéticamente, o una copia o variante de la misma sintetizada químicamente, que conserva la función deseada. Por lo

tanto, la referencia a una secuencia promotora derivada de un gen de glucosa isomerasa de *Actinoplanes* incluiría una secuencia promotora funcional del gen de la glucosa isomerasa de *A. missouriensis*, secuencias promotoras funcionales de derivados de proteínas modificadas genéticamente, tales como GIT y similares. (Véase la Solicitud de Patente Europea 351029). También, el (los) promotor(es) descrito(s) en la solicitud de patente USSN 10/992.149 en tramitación
5 junto con la presente encuentran uso en este documento.

[0024] "Sustituciones conservativas" de una secuencia de aminoácidos en particular se refiere a sustituciones de aminoácidos de aquellos aminoácidos que no son críticos para la actividad funcional, o la sustitución de aminoácidos por otros aminoácidos con propiedades similares (por ejemplo, ácido, básico, cargado positiva o negativamente, polar o no polar, etc.), de forma que incluso las sustituciones de aminoácidos críticos no alteren sustancialmente la actividad.
10 Las tablas de sustituciones conservativas proporcionan aminoácidos funcionalmente similares que son bien conocidos en la materia.

[0025] El término "promotor" se define en este documento como una secuencia de ADN que se une a la ARN polimerasa y dirige a la polimerasa al sitio correcto de inicio de la transcripción en la dirección 3' de una secuencia codificante de interés, dando como resultado la transcripción. También se entiende que el término "promotor" incluye la región 5' no codificante (entre el promotor y el inicio de la traducción) para la traducción después de la transcripción en ARNm, y elementos de control de la transcripción que actúan en cis, tales como potenciadores. El promotor será eficaz en *Streptomyces* para expresar una región codificante de interés.
15

[0026] Un ácido nucleico está "unido operativamente" cuando está ubicado en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el ADN que codifica un líder de secreción, es decir, un péptido de señalización, está
20 unido a un ADN de un polipéptido, si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está unido operativamente a una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión a ribosomas está unido operativamente a una secuencia codificante si está ubicado de forma que facilite la traducción. Generalmente, "unido operativamente" significa que las secuencias de ADN que se van a unir son contiguas, y en el caso de un líder de secreción, contiguas y en fase de lectura. Sin embargo, los
25 potenciadores no tienen por qué ser contiguos. La unión se consigue mediante ligadura en los sitios de restricción convenientes. Si tales sitios no existen, se usan los adaptadores o conectores oligonucleotídicos sintéticos según la práctica convencional.

[0027] Según se usa en este documento, el término "gen" significa el segmento de ADN implicado en la producción de una cadena polipeptídica, que puede incluir o no las regiones precedentes y siguientes a la región codificante, por
30 ejemplo, secuencias 5' no traducidas (5' UTR) o "líder" y secuencias 3' UTR o secuencias "traseras", así como secuencias interpuestas (intrones) entre segmentos codificantes individuales (exones).

[0028] El término "heterólogo", cuando se usa con respecto a porciones de un ácido nucleico, indica que el ácido nucleico comprende dos o más subsecuencias que no se encuentran normalmente en la misma relación entre sí en la naturaleza. Por ejemplo, el ácido nucleico se produce típicamente de manera recombinante con dos o más secuencias,
35 por ejemplo, a partir de genes no relacionados dispuestos de forma que creen un nuevo ácido nucleico funcional, por ejemplo, un promotor a partir de una fuente y una región codificante a partir de otra fuente. De forma similar, una proteína heteróloga se referirá a menudo a dos o más subsecuencias que no se encuentran en la misma relación entre sí en la naturaleza (por ejemplo, una proteína de fusión).

[0029] Los términos "aislado" o "purificado", según se usan en este documento, se refieren a un ácido nucleico o a un
40 aminoácido que es eliminado de al menos un componente con el que está asociado de forma natural.

[0030] En el presente contexto, el término "polipéptido sustancialmente puro" significa una preparación polipeptídica que contiene como mucho el 10% en peso de otro material polipeptídico con el que está asociado de forma natural (se prefieren unos porcentajes menores de otro material polipeptídico, por ejemplo, como mucho el 8% en peso, como mucho el 6% en peso, como mucho el 5% en peso, como mucho el 4%, como mucho el 3% en peso, como mucho el 2%
45 en peso, como mucho el 1% en peso y como mucho el 1/2% en peso). Por lo tanto, se prefiere que el polipéptido sustancialmente puro sea puro en al menos el 92%, es decir, que el polipéptido constituya al menos el 92% en peso del material polipeptídico total presente en la preparación, y se prefieren porcentajes mayores tales como al menos el 94% puro, al menos el 95% puro, al menos el 96% puro, al menos el 96% puro, al menos el 97% puro, al menos el 98% puro, al menos el 99% y como mucho el 99,5% puro. Los polipéptidos desvelados en este documento están preferiblemente
50 en una forma sustancialmente pura. En particular, se prefiere que los polipéptidos desvelados en este documento estén en una "forma esencialmente pura", es decir, que la preparación polipeptídica esté esencialmente exenta de otro material polipeptídico con el que está asociado de forma natural. Esto puede conseguirse, por ejemplo, preparando el polipéptido mediante procedimientos recombinantes bien conocidos en la materia. En este documento, el término "polipéptido sustancialmente puro" es sinónimo de los términos "polipéptido aislado" y "polipéptido en forma aislada".

[0031] El término "recombinante" cuando se usa con referencia, por ejemplo, a una célula o un ácido nucleico, una proteína o un vector, indica que la célula, el ácido nucleico, la proteína o el vector, han sido modificados mediante la introducción de un ácido nucleico o proteína heteróloga o la alteración de un ácido nucleico o proteína natural, o que la célula deriva de una célula así modificada. Por lo tanto, por ejemplo, las células recombinantes expresan genes que no se encuentran en la forma natural (no recombinante) de la célula, o expresan genes naturales que de otro modo se

expresarían anormalmente, se subexpresarían o no se expresarían.

[0032] El término "secuencia de señalización secretora" denota una secuencia de ADN que codifica un polipéptido (un "péptido secretor") que, como componente de un polipéptido mayor, dirige al polipéptido mayor a través de la vía secretora de una célula en la que es sintetizado. El péptido mayor habitualmente se escinde para eliminar el péptido secretor durante el tránsito a través de la vía secretora.

[0033] Un "vector" se refiere a una secuencia polinucleotídica diseñada para introducir ácidos nucleicos en uno o más tipos celulares. Algunos vectores incluyen vectores de clonación, vectores de expresión, vectores lanzadera, plásmidos, partículas fágicas, casetes y similares.

[0034] Un "vector de expresión" según se usa en este documento significa una construcción de ADN que comprende una secuencia de ADN que está unida operativamente a una secuencia de control adecuada capaz de efectuar la expresión del ADN en un hospedador adecuado. Dichas secuencias de control pueden incluir un promotor para efectuar la transcripción, una secuencia operadora opcional para controlar la transcripción, una secuencia que codifica los sitios de unión a ribosomas adecuados en el ARNm, potenciadores y secuencias que controlan la terminación de la transcripción y la traducción. El "vector de expresión" puede generarse recombinante o sintéticamente, con una serie de elementos de ácidos nucleicos específicos que permitan la transcripción de un ácido nucleico en particular en una célula objetivo.

[0035] El término "marcador selectivo" se refiere a un gen capaz de su expresión en un hospedador que permite seleccionar fácilmente aquellos hospedadores que contienen un ácido nucleico o un vector introducido. Algunos ejemplos de marcadores seleccionables incluyen, pero no se limitan a, antimicrobianos (por ejemplo, higromicina, bleomicina o cloranfenicol) y/o genes que confieren una ventaja metabólica, tal como una ventaja nutricional, en la célula hospedadora.

[0036] "Cepa hospedadora" o "célula hospedadora" significa un hospedador adecuado para un vector de expresión o una construcción de ADN que comprende un polinucleótido que codifica una celulasa según la invención. Específicamente, las cepas hospedadoras pueden ser bacterianas, tales como especies de *Streptomyces* o especies de *Bacillus*. En una realización de la invención, "célula hospedadora" significa tanto las células como los protoplastos creados a partir de células de una cepa fúngica filamentosa, y particularmente una de especies de *Trichoderma* o una de especies de *Aspergillus*.

Realizaciones preferidas

A. Organismos hospedadores

[0037] Las células hospedadoras que pueden usarse según la invención incluyen tanto células bacterianas como fúngicas. Las células hospedadoras fúngicas preferidas incluyen células fúngicas filamentosas tales como células de *Aspergillus* y *Trichoderma*. Algunas células hospedadoras bacterianas preferidas incluyen células de *Bacillus*, *Mycobacterium*, *Actinomyces* y *Streptomyces*. Las células hospedadoras particularmente preferidas incluyen *E. coli*, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. lentus*, *B. brevis*, *B. stearothermophilus*, *B. alkalophilus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. coagulans*, *B. circulans*, *B. lautus*, *B. megatherium* y *B. thuringiensis*. Algunas células hospedadoras particularmente preferidas también incluyen *Streptomyces* tales como *S. griseus*, *S. lividans*, *S. rubiginosis*, *S. natalensis*, *S. coelicolor* y *S. avermitilis*. En una forma particularmente preferida de la invención, la célula hospedadora es una cepa de *S. lividans*, y muy particularmente las cepas TK23 y/o TK24.

[0038] En una realización, las células hospedadoras se han modificado de forma que se ha reducido o eliminado la producción de geosmina o compuestos similares a la geosmina. La geosmina es una sustancia química producida por una bacteria común, *Streptomyces* sp. Es una palabra griega, y se traduce como "el olor de la tierra". Por lo tanto, la reducción o la eliminación de la geosmina o de compuestos similares a la geosmina dará como resultado una composición menos olorosa.

B. Construcciones y vectores de ADN

[0039] La construcción de ácido nucleico de la invención que comprende una secuencia que codifica la nueva celulasa puede prepararse sintéticamente mediante procedimientos estándar establecidos, por ejemplo, el procedimiento de la fosforamidita descrito por Beaucage y Caruthers, (1981) Tetrahedron Letters 22: 1859-1869, o el procedimiento descrito por Matthes y col., (1984) EMBO Journal 3: 801-805. La construcción de ácido nucleico puede ser de origen mixto, sintético y genómico, y puede prepararse ligando fragmentos de ADN sintético o genómico. La construcción de ácido nucleico también puede prepararse mediante una reacción en cadena de la polimerasa usando cebadores específicos, por ejemplo, según se describe en la Patente de EE.UU. N° 4.683.202, o en Saiki y col., Science 239 (1988), 487-491.

[0040] Una construcción de ADN de la invención puede insertarse en un vector, tal como un vector de expresión. Los expertos en la materia conocen una variedad de vectores adecuados para la clonación, la transformación y la expresión de polipéptidos en hongos, levaduras y bacterias. Típicamente, el vector o casete contendrá un promotor de la invención, opcionalmente una secuencia de señalización, una región codificante de interés y una secuencia terminadora. En las realizaciones preferidas, el vector incluirá uno o más sitios de clonación ubicados entre la secuencia

de señalización y las secuencias terminadoras.

- [0041] En algunas realizaciones preferidas, cuando se transfiere un gen de celulasa a una célula hospedadora de *Streptomyces*, la transformación incluye el uso de un vector que incluye un promotor de la invención, un ácido nucleico que codifica una secuencia de señalización derivada de un gen de celulasa de *Streptomyces*, preferiblemente un gen de celulasa de *Streptomyces lividans*, y un polinucleótido que codifica una celulasa bacteriana, particularmente un gen de celulasa derivado de una cepa de *Streptomyces*, muy particularmente un gen de celulasa de *S. lividans*. La secuencia de señalización también puede derivar de otras secuencias de señalización de una cepa de *Streptomyces*, y en particular, de *S. lividans*.
- [0042] Algunos ejemplos de vectores que pueden usarse en la práctica de la invención incluyen pSEGCT pSEGCT11 AG8 y pSEACT. La construcción de dichos vectores es bien conocida en la materia, y se hace referencia a la Patente de EE.UU. Nº 6.287.839; a la Patente de EE.UU. Nº 6.562.612 y a la Publicación Internacional Nº WO02/50245. La construcción de pSEGCT implica el uso de dos plásmidos pIJ486, que se describe en Ward y col., (1986) Mol. Gen. Genet. 203: 468-478, y pIJ488, que se describe en Yanisch-Perron y col., (1985) Gene 33: 103-119. Además, se hace referencia a Hopwood y col., (1983) J. Gen. Microbiol. 129: 2257-2260. Otros vectores que pueden usarse incluyen pSEA4CT-11AG8, pKB105 y pKB107 según se describe en los ejemplos.

C. Transformación de células hospedadoras

- [0043] Un vector de la invención se transformará en una célula hospedadora. Las técnicas de transformación generales son conocidas en la materia (Ausubel y col., 1994, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, y Campbell y col., 1989 Curr. Genet. 16: 53-56). Algunas de estas técnicas generales incluyen, pero no se limitan a, el uso de una partícula o una pistola génica (biobalística), la permeabilización de las paredes celulares de hongos filamentosos antes del procedimiento de transformación (por ejemplo, mediante el uso de altas concentraciones de álcali, por ejemplo, de 0,05 M a 0,4 M de CaCl₂ o acetato de litio), fusión de protoplastos, electroporación o transformación mediada por agrobacterium (Patente de EE.UU. Nº 6.255.115), y el tratamiento de los protoplastos o esferoplastos con polietilenglicol y CaCl₂ se describe en Campbell, y col., (1989) Curr. Genet. 16: 53-56, 1989, y Penttilä, M. y col., (1988) Gene, 63: 11-22.
- [0044] Los procedimientos de transformación y expresión de bacterias se desvelan en Brigidi, DeRossi, Bertarini, Riccardi y Matteuzzi, (1990), FEMS Microbiol. Lett. 55: 135-138. Un protocolo preferido para la transformación y la expresión generales en cepas de *Bacillus* delecionadas en proteasa se proporciona en Ferrari y col., Patente de EE.UU. Nº 5.264.366.
- [0045] La transformación y la expresión en *Streptomyces* puede encontrarse en Hopwood y col., GENETIC MANIPULATION OF STREPTOMYCETES: A LABORATORY MANUAL, (1985) John Innis Foundation, Norwich, Reino Unido.

- [0046] En otras realizaciones, la transformación y la expresión en *Aspergillus* y *Trichoderma* se describe en, por ejemplo, la Patente de EE.UU. Nº 5.364.770; la Patente de EE.UU. Nº 6.022.725; y Nevalainen y col., 1992, The Molecular Biology of *Trichoderma* and its Application to the Expression of Both Homologous and Heterologous Genes, in MOLECULAR INDUSTRIAL MYCOLOGY, Eds. Leon y Berka, Marcel Dekker, Inc. págs. 129-148.

D. Cultivo celular

- [0047] Las células hospedadoras y las células transformadas pueden cultivarse en un medio nutriente convencional. El medio de cultivo para las células hospedadoras transformadas puede modificarse según sea apropiado para activar promotores y seleccionar transformantes. Las condiciones específicas del cultivo, tales como temperatura, pH y similares, pueden ser aquellas que se usan para la célula hospedadora elegida para la expresión, y serán apreciables por los expertos en la materia. Además, pueden encontrarse las condiciones de cultivo preferidas en la bibliografía científica, tal como en Sambrook, (1982) *supra*; Kieser, T, MJ. Bibb, MJ. Buttner, KF Chater y D.A. Hopwood (2000) PRACTICAL STREPTOMYCETES GENETICS. John Innes Foundation, Norwich, Reino Unido; Harwood, y col., (1990) MOLECULAR BIOLOGICAL METHODS FOR BACILLUS, John Wiley y/o en la American Type Culture Collection (ATCC; www.atcc.org). Las transformantes estables de células hospedadoras fúngicas, tales como células de *Trichoderma*, pueden distinguirse generalmente de las transformantes inestables por su tasa de crecimiento más rápida o por la formación de colonias circulares con un contorno suave en lugar de irregular en un medio de cultivo sólido.

E. Recuperación de los polipéptidos expresados

- [0048] Un polipéptido producido por la célula hospedadora transformada puede recuperarse del medio de cultivo mediante procedimientos convencionales que incluyen la separación de las células hospedadoras del medio mediante centrifugación o filtración, o si fuera necesario, desorganizando las células y retirando el sobrenadante de la fracción celular y los desechos.

F. Procedimientos para purificar la proteína

- [0049] Típicamente, tras la clarificación, los componentes proteicos del sobrenadante o filtrado se precipitan mediante

una sal, por ejemplo, sulfato amónico. Las proteínas precipitadas se solubilizan entonces y pueden purificarse mediante una variedad de procedimientos cromatográficos, por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de filtración en gel, cromatografía de afinidad; y otros procedimientos reconocidos en la materia. En algunas realizaciones preferidas para la producción de una celulasa, se prefiere cultivar las células hospedadoras en condiciones alcalinas usando medios que contienen una fuente de energía basada en celulasa.

G. Utilidad

[0050] El tratamiento de textiles según la presente invención contempla el procesado o la limpieza textil con una composición que comprende una celulasa de esta invención. Dichos tratamientos incluyen, pero no se limitan a, lavado a la piedra, modificación de la textura, tacto y/o aspecto de tejidos que contienen celulosa, u otras técnicas usadas durante la fabricación o la limpieza/reacondicionamiento de tejidos que contienen celulosa. Adicionalmente, el tratamiento, en el contexto de esta invención, contempla la eliminación de algodón "inmaduro" o "muerto" de las fibras o tejidos celulósicos. El algodón inmaduro es significativamente más amorfo que el algodón maduro, y debido a, por ejemplo, una coloración no uniforme. Los tejidos se evalúan subjetivamente usando ciertos criterios tales como el espesor, la blandura, la rigidez, la suavidad y la plenitud del tejido. El tacto del tejido se refiere a la valoración subjetiva de una persona de un material textil obtenida a partir del sentido del tacto, en particular la blandura, y es evaluada por los individuos de un grupo dando como resultado una puntuación de grupo. Alternativamente, el tacto puede evaluarse objetivamente usando el sistema de evaluación de Kawabata. Véase, por ejemplo, Kawabata, S., "The Standardization and Analysis of Hand Evaluation," Textile Machinery Society of Japan, Osaka, 1980.

[0051] La composición contemplada en la presente invención incluye adicionalmente un componente de celulasa para su uso en el lavado de un tejido fabricado manchado que contiene celulosa. Por ejemplo, puede usarse una celulasa de esta invención en una composición detergente para lavandería. Las composiciones detergentes útiles según la presente invención incluyen formulaciones especiales tales como composiciones para prelavado, prerremojado y de uso doméstico con recuperación del color. Dichas composiciones de tratamiento, según se describe en este documento, pueden estar en forma de un concentrado que requiera una dilución o en forma de una disolución diluida, o en una forma que pueda ser aplicada directamente al tejido que contiene celulosa. Las técnicas generales de tratamiento para el tratamiento de textiles con celulasa se describen en, por ejemplo, la Publicación EP N° 220016 y las Solicitudes GB N° 1.368.599 y 2.095.275.

[0052] El tratamiento de un material celulósico según la presente invención contempla adicionalmente el tratamiento de alimento para animales, pulpa y/o papel, alimentos y grano para los propósitos conocidos en la materia. Por ejemplo, se sabe que las celulasas incrementan el valor del alimento para animales, mejoran la drenabilidad de la pulpa de madera, mejoran los productos alimenticios y reducen la fibra en el grano durante el procedimiento de molienda en húmedo o el procedimiento de molienda en seco del grano.

[0053] El tratamiento del papel usado con la celulasa descrita en este documento puede decolorar el papel. Por lo tanto, el uso de la celulasa descrita en este documento en el procedimiento de elaboración de papel reciclado a partir de papel usado puede reducir en gran medida la fibra con tinta remanente para mejorar así la blancura del papel usado. Algunos ejemplos de papel usado que pueden usarse en la invención incluyen papel impreso usado tal como periódicos usados, papel de revistas usadas y papel impreso usado de calidad baja o de calidad media que contiene pulpa mecánica y pulpa química; papel usado exento de madera formado por pulpa química; y papel revestido de los mismos. El término "agente de destintado" usado en este documento significa aquellos compuestos usados habitualmente en el destintado de papel usado, incluyendo álcalis tales como NaOH o Na₂CO₃ silicato de sosa, peróxido de hidrógeno, fosfatos, tensioactivos aniónicos o no iónicos, agentes capturadores tales como ácido oleico, estabilizantes del pH como coadyuvantes, agentes quelantes o dispersantes.

[0054] El tratamiento de la pulpa de papel con la celulasa descrita en este documento puede mejorar significativamente el refinado (drenaje) de la pulpa sin una reducción notable en su resistencia. Por lo tanto, la presente celulasa proporciona un procedimiento para mejorar el refinado de la pulpa de papel, que comprende una etapa de tratar la pulpa de papel con una celulasa descrita en este documento. Algunos ejemplos de pulpa que puede tratarse mediante el procedimiento de la invención incluyen pulpa de papel usado, pulpa de tableros reciclados, pulpa de kraft, pulpa de sulfito o pulpa tratada procesada/térmicamente, y otras culpas de alto rendimiento.

[0055] Adicionalmente, puede mejorarse la digestibilidad de los glucanos en alimentos para animales usando la celulasa descrita en este documento en dichos alimentos. Por lo tanto, en este documento se proporciona un procedimiento para mejorar la digestibilidad de los alimentos para animales, que comprende una etapa de tratar el alimento para animales con la celulasa descrita en este documento.

[0056] El tratamiento según la actual invención comprende preparar una disolución acuosa que contiene una cantidad eficaz de una celulasa o una combinación de celulasas junto con otros ingredientes opcionales que incluyen, por ejemplo, un tampón, un tensioactivo y/o un agente dispersante. Una cantidad eficaz de una composición de enzima celulasa es una concentración de enzima celulasa suficiente para su propósito pretendido. Así, por ejemplo, una "cantidad eficaz" de celulasa en una composición para el lavado a la piedra según la presente invención es aquella cantidad que proporciona el efecto deseado, por ejemplo, producir un aspecto usado y descolorido en las costuras y las piezas del tejido. De forma similar, una "cantidad eficaz" de celulasa en una composición destinada a mejorar el tacto

- y/o el aspecto de un tejido que contiene celulosa es la cantidad que produce una mejora mensurable en el tacto, por ejemplo, mejora en la suavidad del tejido, o en el aspecto, por ejemplo, eliminando bolitas y fibrillas que tienden a reducir la uniformidad en el aspecto de un tejido. La cantidad de celulosa empleada también depende del equipo empleado, de los parámetros del procedimiento empleado (la temperatura de la disolución de tratamiento de celulosa, el tiempo de exposición de la disolución de celulosa, y similares), la actividad de la celulasa (por ejemplo, una disolución en particular requeriría una menor concentración de celulosa cuando se use una composición de celulosa más activa en comparación con una composición de celulosa menos activa) y del tipo de tejido. La concentración exacta de celulosa que se añade en la disolución acuosa de tratamiento con la que se va a tratar el tejido puede ser fácilmente determinada por el artesano experto basándose en los anteriores factores, así como en el resultado deseado. En los procedimientos de lavado a la piedra, generalmente se ha preferido que la celulasa esté presente en la disolución acuosa de tratamiento en una concentración de aproximadamente 0,5 hasta 5.000 ppm, y muy preferiblemente aproximadamente de 10 a 200 ppm de proteína total. En las composiciones para la mejora del tacto y/o el aspecto de un tejido que contiene celulosa, generalmente se ha preferido que la celulasa esté presente en la disolución acuosa de tratamiento en una concentración de aproximadamente 0,1 hasta 2.000 ppm, y muy preferiblemente de aproximadamente 0,5 a 200 ppm de proteína total.
- 15 **[0057]** En una realización de tratamiento preferida, se emplea un tampón en la composición de tratamiento de tal manera que la concentración de tampón sea suficiente para mantener el pH de la disolución dentro del intervalo en el que la celulasa empleada muestra su actividad. El pH al cual la celulasa muestra su actividad depende de la naturaleza de la celulasa empleada. La concentración exacta del tampón empleado dependerá de varios factores que el técnico experto puede tener en cuenta fácilmente. Por ejemplo, en una realización preferida, el tampón, así como la
- 20 concentración de tampón, se eligen de forma que se mantenga pH de la disolución de celulasa final en el intervalo de pH requerido para la actividad óptima de la celulasa. La determinación del intervalo de pH óptimo de las celulastas de la invención puede averiguarse según técnicas bien conocidas. Los tampones adecuados al pH en el intervalo de actividad de la celulasa también son bien conocidos por los expertos en el campo de la materia .
- 25 **[0058]** Además de la celulasa y un tampón, la composición de tratamiento puede contener opcionalmente un tensioactivo. Los tensioactivos adecuados incluyen cualquier tensioactivo compatible con la celulasa y el tejido que se está utilizando incluyendo, por ejemplo, tensioactivos aniónicos, no iónicos y anfóteros. Algunos tensioactivos aniónicos adecuados incluyen, pero no se limitan a, sulfonatos de alquilbenceno lineales o ramificados; alquil o alquenil éter sulfatos con grupos alquilo o grupos alquenilo lineales o ramificados; sulfatos de alquilo o de alquenilo; sulfonatos olefínicos; sulfonatos de alcano y similares. Algunos contraiones adecuados para tensioactivos aniónicos incluyen, pero
- 30 no se limitan a, iones metálicos alcalinos tales como sodio y potasio; iones metálicos alcalinotérreos tales como calcio y magnesio; ión amonio; y alcanolaminas con de 1 a 3 grupos alcano con un número de carbonos de 2 ó 3. Algunos tensioactivos anfóteros incluyen, por ejemplo, sulfonatos de sales de amonio cuaternario y tensioactivos anfóteros del tipo betaína. Dichos tensioactivos anfóteros tienen grupos cargados tanto positiva como negativamente en la misma molécula. Los tensioactivos no iónicos comprenden generalmente éteres de polioxialquileno, así como alcanolamidas de
- 35 ácidos grasos superiores o aductos con óxido de alquileno de las mismas, y monoésteres de glicerina de ácidos grasos. También pueden emplearse mezclas de tensioactivos en las formas conocidas por los expertos en la materia.
- [0059]** Puede prepararse una composición concentrada de celulasa para su uso en los procedimientos descritos en este documento. Dichos concentrados contienen cantidades concentradas de la composición de celulasa descrita anteriormente, tampón y tensioactivo, preferiblemente en disolución acuosa. Cuando se fórmula así, el concentrado de
- 40 celulasa puede diluirse fácilmente con agua de forma que se preparen de forma rápida y precisa preparaciones de celulasa con la concentración requerida de cada constituyente. Cuando se formulan concentrados acuosos, estos concentrados pueden diluirse de forma que alcancen la concentración preferida de los componentes de la disolución de celulasa según se indicó anteriormente. Como es fácilmente apreciable, dichos concentrados de celulasa permiten una fácil formulación de las disoluciones de celulasa, así como permiten un transporte asequible de la composición hasta la
- 45 ubicación en la que se usará. El concentrado de tratamiento puede estar en cualquier forma reconocida en la materia, por ejemplo, líquida, en emulsión, en gel o en pasta. Dichas formas son bien conocidas por los expertos en la materia.
- [0060]** Cuando se emplea un concentrado de celulasa sólido, la composición de celulasa puede ser un gránulo, un polvo, un aglomerado o un disco sólido. Los gránulos pueden formularse de forma que contengan materiales para reducir la tasa de disolución de los gránulos en el medio de lavado. Dichos materiales y gránulos se desvelan en la
- 50 patente de EE.UU. Nº 5.254.283.
- [0061]** También pueden usarse otros materiales con, o ubicados en, la composición de celulasa de la presente invención según se desee, incluyendo piedras, piedra pómez, rellenos, disolventes, activadores enzimáticos y agentes antirredeposición, dependiendo del uso final de la composición.
- [0062]** A modo de ejemplo, se describirán con detalle los procedimientos de lavado a la piedra, sin embargo, los
- 55 parámetros descritos son fácilmente modificados por el técnico experto para otras aplicaciones, es decir, mejorar el tacto y/o el aspecto de un tejido. El tejido que contiene celulosa se pone en contacto con la composición de lavado a la piedra que contiene celulasa que contiene una cantidad eficaz de la celulasa entremezclando la composición de tratamiento con la composición de lavado a la piedra, y llevando así la enzima celulasa a las proximidades del tejido. Subsiguientemente, la disolución acuosa que contiene la celulasa y el tejido se agita. Si la composición de tratamiento
- 60 es una disolución acuosa, el tejido puede remojar directamente en la disolución. De forma similar, cuando la composición de lavado a la piedra es un concentrado, el concentrado se diluye en un baño de agua con el tejido que

contiene celulosa. Cuando la composición de lavado a la piedra está en forma sólida, por ejemplo, un gel de prelavado o una barra sólida, la composición de lavado a la piedra puede ponerse en contacto aplicando directamente la composición en el tejido o en la disolución de lavado.

5 **[0063]** El tejido que contiene celulosa se incuba con la disolución de lavado a la piedra en unas condiciones eficaces para permitir que la acción enzimática confiera un aspecto de lavado a la piedra al tejido que contiene celulosa. Por ejemplo, durante el lavado a la piedra, el pH, la proporción entre las disoluciones, la temperatura y el tiempo de reacción, pueden ajustarse para optimizar las condiciones en las que actúa la composición de lavado a la piedra. "Condiciones eficaces" se refiere necesariamente al pH, la proporción entre las disoluciones y la temperatura, que permiten que la enzima celulasa reaccione eficazmente con el tejido que contiene celulosa, en este caso para producir
10 el efecto de lavado a la piedra. Está en la pericia del experto en la materia maximizar las condiciones para usar las composiciones de lavado a la piedra según la presente invención.

[0064] La proporción entre las disoluciones durante el lavado a la piedra, es *decir*, la proporción en peso entre la disolución de la composición de lavado a la piedra (es *decir*, la disolución de lavado) y el peso del tejido, empleada en este documento, está generalmente en una cantidad suficiente para conseguir el efecto de lavado a la piedra deseado
15 en el tejido de tela vaquera, y depende del procedimiento usado. Preferiblemente, las proporciones entre las disoluciones son de aproximadamente 3:1 hasta aproximadamente 50:1; más preferiblemente de aproximadamente 5:1 hasta aproximadamente 20:1, y muy preferiblemente de aproximadamente 10:1 hasta aproximadamente 15:1.

[0065] Las temperaturas de reacción durante el lavado a la piedra con las presentes composiciones de lavado a la piedra están regidas por dos factores en competición. En primer lugar, las temperaturas más altas se corresponden
20 generalmente con cinéticas de reacción mejoradas, es decir, reacciones más rápidas, que permiten tiempos de reacción reducidos en comparación con los tiempos de reacción requeridos a temperaturas menores. Consecuentemente, las temperaturas de reacción son generalmente al menos de aproximadamente 10°C y mayores. En segundo lugar, la celulasa es una proteína que pierde su actividad a partir de una temperatura de reacción dada, temperatura que depende de la naturaleza de la celulasa usada. Por lo tanto, si se permite que la temperatura de reacción se eleve
25 demasiado, la actividad celulolítica se pierde como resultado de la desnaturalización de la celulasa. Aunque las temperaturas estándar para el uso de la celulasa en la materia están generalmente en el intervalo de 35°C a 65°C, y se esperaría que estas condiciones fueran adecuadas para la celulasa de la invención, las condiciones de temperatura óptimas deben averiguarse según las técnicas bien conocidas con respecto a la celulasa específica usada.

[0066] Los tiempos de reacción dependen de las condiciones específicas en las que se produce el lavado a la piedra.
30 Por ejemplo, el pH, la temperatura y la concentración de celulasa afectarán al tiempo de reacción óptimo. Generalmente, los tiempos de reacción son de aproximadamente 5 minutos hasta aproximadamente 5 horas, y preferiblemente de aproximadamente 10 minutos hasta aproximadamente 3 horas, y más preferiblemente de aproximadamente 20 minutos hasta aproximadamente 1 hora.

[0067] Según otra realización más preferida de la presente invención, la celulasa de la invención puede emplearse en
35 una composición detergente. Las composiciones detergentes según la presente invención son útiles como composiciones de prelavado, composiciones de prerremojado o para la limpieza durante el ciclo regular de lavado o aclarado. Preferiblemente, la composición detergente de la presente invención comprende una cantidad eficaz de celulasa, un tensioactivo, y opcionalmente incluye otros ingredientes descritos a continuación.

[0068] Una cantidad eficaz de celulasa empleada en las composiciones detergentes de esta invención es una cantidad
40 suficiente para impartir los efectos deseables conocidos que son producidos por la celulasa en tejidos que contienen celulosa, por ejemplo, eliminación de bolitas, ablandamiento, antibolitas, eliminación de las fibras superficiales, antiengrisamiento y limpieza. Preferiblemente, la celulasa de la composición detergente se emplea en una concentración de aproximadamente 10 ppm hasta aproximadamente 20.000 ppm de detergente.

[0069] La concentración de la enzima celulasa empleada en la composición detergente se elige preferiblemente de
45 forma que tras su dilución en el medio de lavado, la concentración de la enzima celulasa esté en un intervalo de aproximadamente 0,01 hasta aproximadamente 1.000 ppm, preferiblemente de aproximadamente 0,02 ppm hasta aproximadamente 500 ppm, y muy preferiblemente de aproximadamente 0,5 ppm hasta aproximadamente 250 ppm de proteína total. La cantidad de enzima celulasa empleada en la composición detergente dependerá del grado en el que se diluya el detergente tras la adición del agua, de forma que se forme una disolución de lavado.

[0070] Las composiciones detergentes de la presente invención pueden estar en cualquier forma reconocida en la
50 materia, por ejemplo, como un líquido, en gránulos, en emulsiones, en geles o en pastas. Dichas formas son bien conocidas por el técnico experto. Cuando se emplea una composición detergente sólida, la celulasa se formula preferiblemente como gránulos. Preferiblemente, los gránulos pueden formularse de forma que contengan adicionalmente un agente protector de la celulasa. El gránulo puede formularse de forma que contenga materiales para
55 reducir la tasa de disolución del granulado en el medio de lavado. Dichos materiales y gránulos se desvelan en la patente de EE.UU. Nº 5.254.283.

[0071] Las composiciones detergentes de esta invención emplean un agente activo de superficie, es decir, tensioactivo, incluyendo tensioactivos aniónicos, no iónicos y anfóteros bien conocidos para su uso en composiciones detergentes.

[0072] Algunos tensioactivos aniónicos para su uso en la composición detergente de esta invención incluyen alquilbenceno sulfonatos lineales o ramificados; éter sulfatos de alquilo o alquenilo con grupos alquilo o grupos alquenilo lineales o ramificados; sulfatos de alquilo o de alquenilo; sulfonatos olefínicos y sulfonatos de alcano. Algunos contraiones adecuados para tensioactivos aniónicos incluyen iones metálicos alcalinos tales como sodio y potasio; iones metálicos alcalinotérreos tales como calcio y magnesio; ión amonio; y alcanolaminas con de 1 a 3 grupos alcohol con un número de carbonos de 2 ó 3. Algunos tensioactivos anfóteros incluyen sulfonatos de sales de amonio cuaternario y tensioactivos anfóteros del tipo betaína. Dichos tensioactivos anfóteros tienen grupos cargados tanto positiva como negativamente en la misma molécula. Los tensioactivos no iónicos comprenden generalmente éteres de polioxialquilenos, así como alcanolamidas de ácidos grasos superiores o aductos con óxido de alquilenos de las mismas, monoésteres de glicerina de ácidos grasos, y similares. Los tensioactivos adecuados para su uso en esta invención se desvelan en la Solicitud de Patente Británica N° 2094826 A, cuya divulgación se incorpora al presente documento como referencia. También pueden usarse mezclas de dichos tensioactivos. El tensioactivo o una mezcla de tensioactivos se emplea generalmente en las composiciones detergentes de esta invención en una cantidad de aproximadamente el 1 por ciento en peso hasta aproximadamente el 95 por ciento en peso de la composición detergente total, y preferiblemente de aproximadamente el 5 por ciento en peso hasta aproximadamente el 45 por ciento en peso de la composición detergente total. Además de la composición de celulosa y el (los) tensioactivo(s), las composiciones detergentes de esta invención pueden contener opcionalmente uno o más de los siguientes componentes:

Hidrolasas excepto celulasa

[0073] Algunas hidrolasas adecuadas incluyen hidrolasa de éster carboxilato, hidrolasa de tioéster, hidrolasa de monoéster fosfato e hidrolasa de diéster fosfato, que actúan sobre el enlace éster; hidrolasa de glucósido, que actúa sobre compuestos de glucosilo; una enzima que hidroliza compuestos de N-glucosilo; hidrolasa de tioéter, que actúa sobre el enlace éter; y una hidrolasa de α -aminoácil-péptido, una hidrolasa de peptidilaminoácido, una hidrolasa de acilaminoácido, una hidrolasa de dipéptido y una hidrolasa de peptidilpéptido, que actúa sobre el enlace peptídico. De entre ellas son preferibles la hidrolasa de éster carboxilato, la hidrolasa de glucósido y la hidrolasa de peptidilpéptido.

[0074] Algunas hidrolasas adecuadas incluyen (1) proteasas pertenecientes a la hidrolasa de peptidilpéptido tales como pepsina, pepsina B, renina, tripsina, quimotripsina A, quimotripsina B, elastasa, enterocinasa, catepsina C, papaína, quimopapaína, ficina, trombina, fibrinolisisina, renina, subtilisina, aspergillopeptidasa A, collagenasa, clostridiopeptidasa B, caliceína, gastrisina, catepsina D., bromelina, queratinasa, quimotripsina C, pepsina C, aspergillopeptidasa B, urocinasa, carboxipeptidasa A y B, y aminopeptidasa; (2) hidrolasas de glucósido (la celulasa, que es un ingrediente esencial, está excluido de este grupo) α -amilasa, β -amilasa, glucoamilasa, invertasa, lisozima, pectinasa, quitinasa y dextranasa. De entre ellas son preferibles α -amilasa y β -amilasa. Funcionan en sistemas de ácidos α neutros, pero la que se obtiene a partir de bacterias muestra una gran actividad en un sistema alcalino; (3) hidrolasa de éster carboxilato, incluyendo esterasa de carboxilo, lipasa, esterasa de pectina y clorofilasa. De entre ellas es especialmente eficaz la lipasa.

[0074] La hidrolasa distinta a la celulasa se incorpora en la composición detergente tanto como se necesite según el propósito. Preferiblemente debería incorporarse en una cantidad del 0,001 al 5 por ciento en peso, y más preferiblemente del 0,02 al 3 por ciento en peso, en términos de proteína purificada. Esta enzima debería usarse en forma de gránulos hechos de enzima bruta sola o en combinación con otros componentes en la composición detergente. Los gránulos de enzima bruta se usan en una cantidad tal que la enzima purificada sea del 0,001 al 50 por ciento en peso en los gránulos. Los gránulos se usan en una cantidad del 0,002 al 20, y preferiblemente del 0,1 al 10 por ciento en peso. Como con las celulosas, estos gránulos pueden formularse de forma que contengan un agente protector de la enzima y un material retardante de la disolución.

Tensioactivos catiónicos y sales de ácidos grasos de cadena larga

[0075] Dichos tensioactivos 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 alquenilo, sales o ésteres de ácidos α -sulfograsos, tensioactivos de tipo aminoácido, tensioactivos de éster de fosfato, sales de amonio cuaternario, incluyendo aquellas con de 3 a 4 sustituyentes alquilo y hasta 1 sustituyente alquilo fenil sustituido. Los tensioactivos catiónicos y las sales de ácidos grasos de cadena larga adecuados se desvelan en la Solicitud de Patente Británica N° 2094826 A. La composición puede contener de aproximadamente el 1 hasta aproximadamente el 20 por ciento en peso de dichos tensioactivos catiónicos y sales de ácidos grasos de cadena larga.

Aditivos

A. Agentes secuestrantes divalentes

[0076] La composición puede contener de aproximadamente el 0 hasta aproximadamente el 50 por ciento en peso de uno o más componentes aditivos elegidos del grupo formado por sales de metales alcalinos y sales de alcanolamina de los siguientes compuestos: fosfatos, fosfonatos, fosfonocarboxilatos, sales de aminoácidos, electrolitos de aminopoliacetatos moleculares altos, polímeros no disociantes, sales de ácidos dicarboxílicos y sales de aluminosilicato. Algunos agentes secuestrantes divalentes adecuados se desvelan en la Solicitud de Patente Británica N° 2094826 A.

B. Electrolitos alcalinos o inorgánicos

- [0077]** La composición puede contener de aproximadamente el 1 hasta aproximadamente el 50 por ciento en peso, preferiblemente de aproximadamente el 5 hasta aproximadamente el 30 por ciento en peso, basado en la composición, de una o más sales de metales alcalinos de los siguientes compuestos como los electrolitos alcalinos o inorgánicos: silicatos, carbonatos y sulfatos, así como álcalis orgánicos tales como trietanolamina, dietanolamina, monoetanolamina y triisopropanolamina.

Agentes antirredeposición

- [0078]** La composición puede contener de aproximadamente el 0,1 hasta aproximadamente el 5 por ciento en peso de uno o más de los siguientes compuestos, agentes antirredeposición: polietilenglicol, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona y carboximetilcelulosa.

[0079] De entre ellos, una combinación de carboximetilcelulosa y/o polietilenglicol con la composición de celulasa de la presente invención proporciona una composición eliminadora de suciedad especialmente útil.

Agentes blanqueantes

- [0080]** El uso de la celulasa de la presente invención en combinación con un agente blanqueante tal como monopersulfato sódico, percarbonato sódico, perborato sódico, un aducto de sulfato sódico/peróxido de hidrógeno y/o un pigmento blanqueante fotosensible tal como una sal de cinc o de aluminio de ftalocianina sulfonada, mejora adicionalmente los efectos detergentes. De forma similar, pueden usarse los agentes blanqueantes y los catalizadores de blanqueado según se describe en el documento EP684304.

Agentes azulantes y pigmentos fluorescentes

- [0081]** En la composición pueden incorporarse varios agentes azulantes y pigmentos fluorescentes, si fuera necesario. Algunos agentes azulantes y pigmentos fluorescentes adecuados se desvelan en la Solicitud de Patente Británica N° 2094826 A.

Inhibidores del apelmazamiento

- [0082]** Pueden incorporarse los siguientes inhibidores del apelmazamiento en el detergente en polvo: sales del ácido p-toluensulfónico, sales del ácido xilensulfónico, sales del ácido acético, sales del ácido sulfosuccínico, talco, sílice finamente pulverizada, sílices amorfas, arcilla, silicato cálcico (tal como MicroCell de Johns Manville Co.), carbonato cálcico y óxido de magnesio.

Antioxidantes

- [0083]** Los antioxidantes incluyen, por ejemplo, terc-butil-hidroxitolueno, 4,4'-butilidenobis(6-terc-butil-3-metilfenol), 2,2'-butilidenobis(6-terc-butil-4-metilfenol), cresol monoestirenado, cresol diestirenado, fenol monoestirenado, fenol diestirenado y 1,1-bis(4-hidroxifenil)ciclohexano.

Solubilizantes

- [0084]** Los solubilizantes incluyen, por ejemplo, alcoholes inferiores tales como etanol, sales de sulfonato de benceno, sales de sulfonato de alquilbenceno inferior tales como sales de p-toluensulfonato, glicoles tales como propilenglicol, sales de sulfonato de acetilbenceno, acetamidas, amidas del ácido piridindicarboxílico, sales de benzoato y urea.

[0085] La composición detergente de la presente invención puede usarse en un amplio intervalo de pH, desde pH ácido hasta alcalino. En una realización preferida, la composición detergente de la presente invención puede usarse en un medio de lavado detergente medianamente ácido, neutro o alcalino, con un pH de desde aproximadamente 5 hasta no más de aproximadamente 12.

- [0086]** Aparte de los ingredientes anteriores, pueden usarse si se desea perfumes, tampones, conservantes, pigmentos y similares, con las composiciones detergentes de esta invención. Dichos componentes se emplean convencionalmente en las cantidades usadas hasta ahora en la materia.

- [0087]** Cuando una base detergente usada en la presente invención está en forma de un polvo, puede ser una que se prepare mediante cualquier procedimiento de preparación conocido, incluyendo un procedimiento de secado por pulverización y un procedimiento de granulación. Se prefieren las bases detergentes obtenidas particularmente mediante el procedimiento de secado por pulverización, el procedimiento de aglomerado, el procedimiento de mezcla en seco o los procedimientos de ruta fuera de torre. La base detergente obtenida mediante el procedimiento de secado por pulverización no está restringida con respecto a las condiciones de preparación. La base detergente obtenida mediante el procedimiento de secado por pulverización son gránulos huecos que se obtienen pulverizando una suspensión acuosa de ingredientes termorresistentes, tales como agentes activos de superficie y aditivos, en un espacio caliente. Tras el secado por pulverización pueden añadirse perfumes, enzimas, agentes blanqueantes, aditivos inorgánicos alcalinos. Con una base detergente altamente densa y granular, tal como mediante un procedimiento de granulación y

secado por pulverización, o de aglomeración, también pueden añadirse diversos ingredientes después de la preparación de la base.

[0088] Cuando la base detergente es un líquido, puede ser una disolución homogénea o una dispersión no homogénea. Para eliminar la descomposición de la carboximetil celulosa por parte de la celulasa del detergente, es deseable que la carboximetil celulosa esté granulada o recubierta antes de su incorporación en la composición.

[0089] Las composiciones detergentes de esta invención pueden incubarse con tejidos que contienen celulosa, por ejemplo, tejidos manchados, en usos industriales o domésticos, a las temperaturas, tiempos de reacción y proporción de las disoluciones empleadas convencionalmente en estos ámbitos.

[0090] Los detergentes según la presente invención pueden formularse adicionalmente como un prelavado en la disolución apropiada a un pH de intermedio en el que exista una actividad suficiente para proporcionar las mejoras deseadas de ablandamiento, eliminación de bolitas, prevención de bolitas, eliminación de las fibras superficiales o limpieza. Cuando la composición detergente es una composición de prerremojado (por ejemplo, de prelavado o de pretratamiento), ya sea como una composición líquida, en aerosol, en gel o en pasta, la enzima celulasa se emplea generalmente de aproximadamente el 0,0001 hasta aproximadamente el 1 por ciento en peso basado en el peso total de la composición de prerremojado o pretratamiento. En dichas composiciones puede emplearse opcionalmente un tensioactivo, y cuando se emplea, está presente generalmente a una concentración de aproximadamente el 0,005 hasta aproximadamente el 20 por ciento en peso basado en el peso total del prerremojado. El resto de la composición comprende componentes convencionales usados en el prerremojado, es decir, diluyentes, tampones, otras enzimas (proteasas) y similares, a sus concentraciones convencionales.

[0091] Se contempla que las composiciones que comprenden las enzimas celulasas descritas en este documento pueden usarse en un uso doméstico como la composición individual adecuada para restaurar el color de tejidos desteñidos (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N° 4.738.682), así como usarse en un eliminador de manchas y para eliminar bolitas y evitar bolitas (prevención de bolitas).

[0092] El uso de la celulasa según la invención puede ser particularmente eficaz en aditivos alimentarios y en el procesamiento de pulpa y papel. Estas aplicaciones industriales adicionales se describen, por ejemplo, en la Publicación PCT N° 95/16360 y en la Patente Finesa Concedida N° 87372, respectivamente.

[0093] Con objeto de ilustrar adicionalmente la presente invención y las ventajas de la misma, se dan los siguientes ejemplos específicos entendiendo que están siendo ofrecidos para ilustrar la presente invención y no deberían interpretarse en modo alguno como limitantes de su ámbito.

[0094] En la divulgación experimental que sigue, se aplican las siguientes abreviaturas: eq (equivalentes); M (Molar) M (micromolar); N (Normal); mol (moles); mmol (milimoles); μ mol (micromoles); nmol (nanomoles); g (gramos); mg (miligramos); kg(kilogramos); μ g (microgramos); L (litros); ml (mililitros); μ l (microlitros); cm (centímetros); mm (milímetros); μ m (micrómetros); nm (nanómetros); °C (grados Centígrados); h (horas); min (minutos); s (segundos); ms (milisegundos); Ci (Curios) mCi (milicurios); μ Ci (microcurios); TLC (cromatografía en capa fina); Ts (tosilo); Bn (benrilo); Ph (fenilo); Ms (mesilo); Et (etilo), Me (metilo).

EJEMPLOS

[0095] La presente invención se describe con más detalle en los siguientes ejemplos, que no pretenden en modo alguno limitar el ámbito de la invención, según se reivindica. Las Figuras anexas pretenden ser consideradas como partes integrantes de la memoria descriptiva en la descripción de la invención. Los siguientes ejemplos se ofrecen para ilustrar, pero no para limitar, la invención reivindicada.

Ejemplo 1

Construcción de vectores

[0096] Este ejemplo ilustra la construcción de plásmidos que comprenden el nuevo núcleo catalítico de celulasa.

[0097] Se usó un vector pSEGCT11AG8 que contiene un promotor GI según se muestra en este documento como la Figura 3 y se describe en el ejemplo 6 de la Patente de EE.UU. N° 6.562.612, como la base para la producción de los vectores usados en la presente invención. La construcción del vector pSEA4CT-11AG8 se describe en el Ejemplo 2 de la Solicitud de Patente de Estados Unidos con Número de Serie 10/992.149 (presentada el 18 de noviembre de 2004) y se hace referencia a la Figura 4 de la presente solicitud (cartografía de pSEA4CT-11 AG8).

[0098] Se construyó el plásmido pKB105 a partir del plásmido pSEA4CT-11 AG8 sustituyendo el segmento que codifica para la celulasa completa 11 AG8 por una secuencia que codifica para el nuevo núcleo catalítico de celulasa. Véase la Figura 5 (en la que la secuencia que codifica para el nuevo núcleo catalítico de celulasa se denomina "Núcleo I de 11AG8". La Figura 6 muestra el vector pKB105.

[0099] El vector de expresión del nuevo núcleo catalítico de celulasa, pKB107, derivaba de pKB105. La eliminación de las secuencias de ADN de *E. coli* en pKB105 produjo el plásmido pKB107. Para eliminar las secuencias de *E. coli*, se

digirió pKB105 con una digestión con SphI, EcoRI y HindIII durante la noche a 37°C. El ADN digerido se purificó usando un kit Qiagen y después se volvió a ligar para la transformación de células hospedadoras de *Streptomyces*. La Figura 7 muestra el vector pKB107.

Ejemplo 2

5 Expresión y actividad

[0100] El siguiente ejemplo describe la expresión y la actividad de la nueva celulasa.

2A. TRANSFORMACIÓN Y EXPRESIÓN

[0101] En este ejemplo se usaron los vectores de expresión, pSEA4CT-11AG8 y pKB107, construidos en el Ejemplo 1.

10 **[0102]** En estos experimentos se transformaron las células hospedadoras de *Streptomyces lividans* con los vectores descritos anteriormente. Las técnicas de transformación fueron el procedimiento del protoplasto descrito en Hopwood, y col., GENETIC MANIPULATION OF STREPTOMYCES, A LABORATORY MANUAL. The John Innes Foundation, Norwich, Reino Unido (1985).

15 **[0103]** Las células de *Streptomyces lividans* se transformaron con uno de los vectores de expresión según se describió anteriormente. Las células transformadas se colocaron en placas con azo-CMC y las colonias que expresaban una celulasa fueron identificadas mediante la producción de un "halo". Las colonias que producían un halo se hicieron crecer en TS en matraces de agitación durante 3 días en presencia de 50 µg/ml de tiostrepton a 30°C. Entonces las células se transfirieron a un medio de producción exento de antibióticos y se continuó el crecimiento durante otros tres días. Se tomaron muestras para el ensayo de actividad enzimática.

20 **[0104]** TS = 16 g de triptona de Difco, 4 g de soytone de Difco, 20 g de caseína (hidrolizado) sigma y 5 g de K₂HPO₄ llevados a 1 litro. Después del autoclave se añadió glucosa esterilizada filtrada al 50% hasta una concentración final del 1,5%.

25 **[0105]** Medio de producción: 2,4 g de ácido cítrico * H₂O; 8,3 g de extracto de levadura de Biospringer; 2,4 g de (NH₄)₂SO₄; 72,4 g de MgSO₄ * 7 H₂O; 0,1 g de CaCl₂ * 2 H₂O; 0,3 ml de Mazu DF204 (antiespumante); 5 ml de elementos traza modificados de *Streptomyces* (1 litro de disolución madre contiene: 250 g de ácido cítrico * H₂O; 3,25 g de FeSO₄ * 7 H₂O; 5 g de ZnSO₄ * 7 H₂O; 5 g de MnSO₄ * H₂O; 0,25 g de H₃BO₃); 10 g de glucosa, ajustar el volumen a 1 litro. Ajustar el pH a 6,9 con NaOH.

2B. RECUPERACIÓN

[0106] Se tomó un ml de muestra de cada matraz de agitación y se centrifugó a 14.000 rpm. Parte del sobrenadante se usó para el ensayo enzimático.

30 **[0107]** Adicionalmente se desarrollaron cultivos de fermentación con los cultivos transformados. En diversos puntos temporales se retiraron las muestras de los caldos de fermentación para su análisis. La materia celular se eliminó mediante centrifugación.

2C. ENSAYO MODIFICADO PARA COMPROBAR LA ACTIVIDAD DE CELULASA

35 **[0108]** Este ejemplo demuestra que puede usarse un ensayo simple, directo, fiable y ahorrador de tiempo para evaluar la actividad de la celulasa usando placas de microvaloración.

40 **[0109]** Se usó una enzima patrón de referencia de una muestra de fermentación previamente cuantificada con una actividad de 2201 Unidades/ml. Tampón de dilución: fosfato sódico 100 mM, pH 8,0 y se usó un filtro esterilizado de 0,2 µm para diluir las muestras y el sustrato. El tampón de dilución se preparó mezclando 12 g de NaH₂PO₄ en 800 ml de agua desionizada, y el pH se ajustó hasta un pH de 8,0 con NaOH 6N, se llevó a un volumen final de 1,0 l y después se filtró estéril en 0,2 µm.

45 **[0110]** La enzima patrón de referencia se diluyó 40x y después diluciones sucesivas de 2x entre tres y cinco veces. Las muestras del matraz de agitación se diluyeron sucesivamente 2x, entre tres y cinco veces. Las muestras de fermentado se diluyeron entre 20 y 50x, y posteriormente se diluyeron sucesivamente 2x, entre tres y cinco veces. Por lo tanto, había un total de 3 a 5 muestras con diferentes concentraciones proteicas para cada muestra experimental y la enzima estándar de referencia.

[0111] Para el ensayo se mezclaron 180 µL de 0,5 mg/ml de 2-nitrofenil β-D-celobiósido (Sigma) en tampón de dilución (véase anteriormente) con 20 µl de muestra en una placa de 96 pocillos (Modelo "9017", Costar, Cambridge, MA) a temperatura ambiente.

50 **[0112]** Las actividades de celulasa se midieron leyendo la absorbancia a 405 nm usando un espectrofotómetro Spectra MAX250 (Spectra, Sunnyvale, CA, EE.UU.) durante 8 minutos con intervalos de 9 segundos, y se determinó la cinética media.

[0113] Los resultados se muestran en la Figura 8. El eje Y es la NPC en unidades/ml. Como puede observarse, la eliminación del CBD incrementa considerablemente la actividad de la celulasa neutra en comparación con la celulasa intacta.

Ejemplo 3

5 Comportamiento durante el lavado

[0114] El siguiente ejemplo compara el comportamiento durante el lavado de una muestra del nuevo núcleo catalítico experimental granulado KB107C mezclada (95% de KB107C + 5% de IndiAge® Neutra L) frente a un producto comercial 11AG8, IndiAge® Neutra G (Genencor Intl.). Las enzimas se dosificaron usando la misma actividad total ONPC por desarrollo.

- 10 **[0115]** El procedimiento experimental para los 35 kg de sustrato de tela vaquera puede resumirse como sigue: Etapa 1: desaprestado (55°C/20 min)

Etapa 2: caída y aclarado

Etapa 3: tratamiento con celulasa (55°C/pH 6,5/ 60 min)

Etapa 4: aclarado en frío (1-2 min)

- 15 Etapa 5: aclarado en caliente (70°C/ 5 min)

Etapa 6: aclarado en frío (1-2 min)

Etapa 7: extracción en el extractor

Etapa 8: secado en secadora

Etapa 9: ensayos de evaluación

- 20 **[0116]** El desaprestado se realizó con 0,57 g/L de Optisize formulado y 0,25 g/L de Triton X-100 a 55°C durante 20 minutos.

[0117] Los sustratos de tela vaquera desaprestados se trataron con un gránulo nuevo (95% de KB107C + 5% de IndiAge® Neutra L) y IndiAge® Neutra G a una escala de producción de lavadora de tambor en las siguientes condiciones:

- 25 **▪** Proporción entre las disoluciones (LR): de 15 a 1 (525 l de agua, 35 Kg de unos tejanos de tela vaquera desaprestados)

▪ Tensioactivo: Lutensol AT80 a 0,14 g/L

▪ Temperatura de tratamiento: 55°C pH: 6,5 ± 0,2 (ajuste del pH con tampón de fosfato monosódico con ácido acético))

▪ Tiempo de tratamiento: 60 minutos

- 30 **▪** 3 aclarados

[0118] Se desarrollaron varios ensayos usando las siguientes dosis de enzimas: 1) IndiAge® Neutra G a 1.702×10^3 unidades/desarrollo; 2) 0,65X de gránulo a 1.106×10^3 unidades/desarrollo (65% de actividad del nº 1); 3) IndiAge® Neutra G a 1.702×10^3 unidades/desarrollo por duplicado nº #1; 4) 0,65X de gránulo a 1.106×10^3 nº 2; y 5) 0,65X de gránulo a 1.702×10^3 unidades/desarrollo.

- 35 **[0119]** Se seleccionaron aleatoriamente cinco perneras de tela vaquera tras el tratamiento con celulosa de cada desarrollo de los ensayos 1-5, y se blanquearon ligeramente para eliminar el retroteñido de la parte frontal de la tela vaquera. El blanqueado de todas las perneras de tela vaquera seleccionadas se realizó junto con 10 g/l de hipoclorito sódico (6,15% activo) y cenizas de sosa a 65°C durante 20 minutos en el Unimac, seguido de un lavado con el tensioactivo.

- 40 Evaluación del retroteñido y la abrasión:

[0120] Para cuantificar los niveles de retroteñido y abrasión después del tratamiento con celulasa, se tomaron 6 lecturas del reflectómetro de cada pernera de tela vaquera usando un Chroma Meter CR-200 de Minolta. Se usaron los valores de CIE L* para cuantificar la abrasión, y se usaron los valores de CIE b* para cuantificar el retroteñido. L* indica claridad y -b* indica azulado en el espacio de color CIELAB. Por lo tanto, una L* mayor indica una mayor abrasión, y una -b* mayor indica un mayor retroteñido.

[0121] Las medidas se realizaron según se describe en "Precise Color Communication", de Minolta Camera Co., Ltd,

1993, 2. Hunter, R. S. abd G + Harold, R. "The measurement of Appearance", J. Wiley and Sons, NY, 2ª edición, 1987).

Resultados

[0122] Los resultados del ensayo demuestran que la resistencia al lavado de 1X de actividad de la IndiAge® Neutra G comercial es aproximadamente igual a 0,65X de la actividad de la nueva Neutra G (95% de KB107C + 5% de IndiAge® Neutra L). Los resultados se presentan en la Tabla 1, a continuación, y en las Figuras 9 y 10.

Tabla 1: comportamientos de abrasión y retroteñido de IndiAge® Neutra G y 0,65X de la nueva Neutra G.

Ensayo nº	Enzimas	Dosis (NPCU/ desarrollo)	Abrasión (CIE L*)			Retroteñido (CIE lb*I)		
			SB/Añil	Añil	SB/I-BL	SB/Añil	Añil	SB/I-BL
1	IndiAge® Neutra G	1702 X 10 ³	30,82	22,73	n/a	3,88	3,40	n/a
2	Nueva Neutra G	1106 X 10 ³	30,18	22,40	n/a	3,08	2,71	n/a
3	IndiAge® Neutra G (DP T1)	1702 X 10 ³	31,21	23,42	37,48	4,02	3,92	3,89
4	Nueva Neutra G (DP T2)	1106 X 10 ³	31,12	23,45	37,35	3,75	3,63	3,90
5	Nueva Neutra G	1702 X 10 ³	32,73	24,25	39,14	4,43	4,26	3,93
Notas: *SB/Añil: tela vaquera con fondo de azufre/teñida de añil con el tratamiento con celulasa **Añil: tela vaquera teñida de añil con el tratamiento con celulasa ***SB/I-BL: tela vaquera con fondo de azufre/teñida de añil con el tratamiento con celulasa seguido por un blanqueamiento								

[0123] En las condiciones probadas, la nueva Neutra G (95% de KB107C + 5% de IndiAge® Neutra L) al 65% de actividad mostró un comportamiento de abrasión muy similar a IndiAge® Neutra G al 100% de actividad, y la nueva Neutra G al 100% de actividad mostró un comportamiento de abrasión significativamente mayor que IndiAge® Neutra G al 100% de actividad. No se observaron diferencias significativas en el comportamiento de retroteñido entre la nueva Neutra G y la IndiAge® Neutra G en unos comportamientos de abrasión similares.

Ejemplo 4

Calorimetría diferencial de barrido

[0124] El siguiente ejemplo describe la determinación de la termoestabilidad de la nueva celulasa.

[0125] Se preparó KB107C según se describe en el Ejemplo 2 anterior. Entonces el KB107C se formuló como sigue:

Sacarosa	40,0%
Citrato sódico dihidratado	2,84% (2,50% anhid.)
Fosfato sódico, heptahidrato dibásico	4,72% (2,50% anhid.)
Sorbato potásico	0,25%
Metilparabeno	0,03%
Propilparabeno	0,01 %
Total	47,85%
Actividad	7500 - 9000 U/g
pH	5,8 - 6,2

[0126] Los parabenos se añadieron como una disolución madre: 15% de metilo; 5% de propilparabeno; 80% de propilenglicol. La formulación anterior es la misma que el producto comercial, IndiAge® Neutra L.

[0127] Se precipitaron IndiAge® Neutra L y KB107C a partir de la formulación usando sulfato amónico 1,2 M. El precipitado se volvió a suspender y se dializó en fosfato sódico 20 mM, pH 6,8. Se usó un casete de diálisis Slide- A-

Lyzer 7K (Pierce, IL) para la diálisis, y la diálisis se realizó durante un periodo de 24 horas con cuatro cambios de tampón. El dializado final se usó para diluir las muestras proteicas. Se midió el exceso de capacidad térmica de las muestras con respecto al dializado final como referencia.

- 5 **[0128]** Las curvas de exceso de capacidad térmica se midieron usando un microcalorímetro de barrido ultrasensible VP-DSC E-2000 (Microcal, Inc., Northhampton, Ma.). Se aplicó una tasa de calentamiento de $90^{\circ}\text{C min}^{-1}$ y la concentración proteica estaba en el intervalo de 0,2 mg/ml. El procedimiento estándar para las medidas mediante DSC y la teoría de la técnica están publicados previamente (Freire, E. (1995) Differential Scanning Calorimetry Methods. Mol. Biol. 41, 191-218).
- 10 **[0129]** La estabilidad térmica de IndiAge® Neutra L y KB107C en función de la temperatura (20-100°C) indicó un punto medio térmico (T_m) para IndiAge® Neutra L y KB107C de $67,8^{\circ}\text{C}$ y $68,7^{\circ}\text{C}$, respectivamente (véase la Figura 11). La mayor temperatura de transición de 1°C para KB107C es significativa dada la sensibilidad de esta instrumentación. Esto sugiere que las propiedades termodinámicas de KB107C difieren de las IndiAge® Neutra L, y esto es coherente con el mejor comportamiento en los estudios de aplicación.
- 15 **[0130]** Se entiende que los ejemplos y realizaciones descritas en este documento son con propósito meramente ilustrativo, y que a la luz de las mismas, los expertos en la materia sugerirán varias modificaciones o cambios en las mismas.

REIVINDICACIONES

1. Una celulasa aislada con una secuencia de aminoácidos consistente en la secuencia de aminoácidos según se establece en la Figura 1 E.
- 5 2. La celulasa según la reivindicación 1, en la que dicha celulasa está codificada por una secuencia de ADN según se establece en la Figura 2.
3. Una secuencia de ADN aislado con la secuencia de ácidos nucleicos establecida en la Figura 2.
4. Un vector de expresión que comprende la molécula de ADN según la reivindicación 3.
5. El vector de expresión según la reivindicación 4, en el que el vector de expresión comprende adicionalmente un promotor aprE o un promotor glaA o un promotor A4 unido operativamente a la molécula de ADN.
- 10 6. El vector de expresión según la reivindicación 5, en el que el vector de expresión comprende el promotor A4 unido operativamente a la molécula de ADN.
7. Una célula hospedadora transformada con el vector de expresión según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6.
8. La célula hospedadora de la reivindicación 7, en la que la célula hospedadora es una especie de *Streptomyces* o una especie de *Bacillus*; o la célula hospedadora es una especie de *Streptomyces* en la que ha sido deletado el gen *cyc2* (gen de la vía de la geosmina); o la célula hospedadora es un hongo filamentoso tal como *Aspergillus* o *Trichoderma* o una levadura tal como *Saccharomyces*.
- 15 9. Una composición que comprende una celulasa según la reivindicación 1 o la reivindicación 2.
10. La composición según la reivindicación 9, en la que la composición es una composición detergente.
11. Una composición detergente que comprende una celulasa según la reivindicación 1 o la reivindicación 2.
- 20 12. Un procedimiento para producir una enzima con actividad celulasa, que comprende:
 - (a) transformar establemente una célula hospedadora aislada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido según se define en una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6;
 - (b) cultivar dicha célula hospedadora transformada en unas condiciones adecuadas para que dicha célula hospedadora produzca dicha enzima; y
 - 25 (c) a recuperar dicha enzima.
13. Un procedimiento para producir una celulasa según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, comprendiendo el procedimiento:
 - (a) hacer crecer una célula hospedadora transformada según la reivindicación 12 en unas condiciones adecuadas para la expresión de dicho ADN que codifica dicha celulasa; y
 - 30 (b) recoger la mezcla acuosa resultante que comprende dicha celulasa.
14. El procedimiento según la reivindicación 13, en el que dicha celulasa es adicionalmente purificada a partir de dicha mezcla acuosa.
15. El procedimiento según la reivindicación 13 o la reivindicación 14, en el que dicha célula hospedadora es una especie de *Bacillus* spp o una especie de *Streptomyces* spp.
- 35 16. Un procedimiento para tratar tejidos que contienen celulosa, que comprende una etapa de poner en contacto los tejidos que contienen celulosa con la celulasa según la reivindicación 1 o la reivindicación 2.
17. El procedimiento de la reivindicación 16, en el que:
 - (i) el tratamiento es lavado a la piedra; o
 - 40 (ii) el tratamiento es proporcionando una variación localizada en el color de tejidos coloreados que contienen celulosa; o
 - (iii) el tratamiento es proporcionando efectos de pulido superficiales en los tejidos que contienen celulosa; o
 - (iv) el tratamiento proporciona un tacto mejorado de los tejidos que contienen celulosa; o
 - (v) el tratamiento proporciona una clarificación del color de los tejidos que contienen celulosa; o

(vi) el tratamiento de los tejidos se realiza mediante remojo, lavado o aclarado de los tejidos.

18. Un procedimiento para tratar pulpa de papel, que comprende una etapa de poner en contacto la pulpa de papel con la celulasa según la reivindicación 1 o la reivindicación 2.

5 19. Un procedimiento para mejorar la digestibilidad de un alimento para animales, que comprende una etapa de tratar un alimento que contiene celulasa con la celulasa según la reivindicación 1 o la reivindicación 2.

20. El uso de la celulasa según la reivindicación 1 o la reivindicación 2 como un aditivo para alimento para animales, para el tratamiento de textiles, en el tratamiento de pulpa y papel o en una composición detergente.

**Figura 1A: Preproteína de 11AG8 (386 aa, PM 40.003,43,
pI 7,65)**

MGFGSAPIAL	CPLRTRRNAL	KRLALLATG	VSIUGLTALA	GPPAQANQQI	50
CDRYGTTTIQ	DRYVVQNNRW	GTSAQCINV	TNGGFEITQA	DGSVPTNGAP	100
KSYPSSVYDGC	HYGNCAPRTT	LPMRISSIGS	APSSVSRYRT	GNGVYNAAYD	150
IWLDPPTPRTN	GVNRTEIMIW	FNRVGPVQPI	GSPVGTAHVG	GRSWEVWTGS	200
NGSNDVISFL	APSAISSWSF	DVKDFVDQAV	SHGLATPDWY	LTSIQAGFEP	250
WEGGTGLAVN	SFSSAVNAGG	GNGGTPGTPA	ACQVSYSTHT	WPGGFTVDTT	300
ITNTGSTPVD	GWELDFTLPA	GHTVTSVWNA	LISPASGAVT	ARSTGSNGRI	350
AANGGTQSFQ	FQGTSSGAGF	TAPAGARLNG	TSCTVR		386

**Figura 1B: Proteína madura de 11AG8 (340 aa, núcleo natural
230 aa:233aa = 1:2)**

NQQICDRYGT	TTIQDRYVVQ	NNRWGTSATQ	CINVTGNGFE	ITQADGSVPT	50
NGAPKSYPSV	YDGCHYGNCA	PRTLPMRIS	SIGSAPSSVS	YRYTGNGVYN	100
AAVDIWLDP	PRTNGVNRTE	IMIWFNRVGP	VQPIGSPVGT	AHVGGRSWEV	150
WTGSNGSNDV	ISFLAPSAIS	SWSFDVKDFV	DQAVSHGLAT	PDWYLTSIQA	200
GFEPWEGGTG	LAVNSFSSAV	NAGGGNGGTP	GTPAACQVSY	STHTWPGGFT	250
VDTTITNTGS	TPVDGWELDF	TLPAGHTVTS	VWNALISPAS	GAVTARSTGS	300
NGRIAANGGT	QSFQFGTSS	GAGFTAPAGA	RLNGTSCTVR		340

Figura 1C: Núcleo de 11AG8 de 233 aa (233 aa, PM 24.727,17, pl 5,16)

NQQICDRYGT	TTIQDRYVVQ	NNRWGTSATQ	CINVTGNGFE	ITQADGSVPT	50
NGAPKSYPSV	YDGCHYGNCA	PRTLPMRIS	SIGSAPSSVS	YRYTGNGVYN	100
AAAYDIWLDPT	PRTNGVNRTE	IMIWFNRVGP	VQPIGSPVGT	AHVGGRSWEV	150
WTGSNGSNDV	ISFLAPSAIS	SWSFDVKDFV	DQAVSHGLAT	PDWYLTSIQA	200
GFEPWEGGTG	LAVNSFSSAV	NAGGGNGGTP	GTP	233	

Figura 1D: Núcleo de 11AG8 de 230 aa (230 aa, PM 24.471,90, pl 5,16)

NQQICDRYGT	TTIQDRYVVQ	NNRWGTSATQ	CINVTGNGFE	ITQADGSVPT	50
NGAPKSYPSV	YDGCHYGNCA	PRITLPMRIS	SIGSAPSSVS	YRYTGNGVYN	100
AAVDIWLDP	PRITNGVNRTE	IMIWFNRVGP	VQPIGSPVGT	AHVGRSWEV	150
WTGSNGSNDV	ISFLAPSAIS	SWSFDVKDFV	DQAVSHGLAT	PDWYLTISIQA	200
GFEPWEGGTG	LAVNSFSSAV	NAGGGNGGTP	230		

**Figura 1E: Núcleo de 11AG8 en pKB105 y pKB107: (221
aa, PM 23.803,23, pl 5,16)**

NQQICDRYGT	TTIQDRYVVQ	NNRWGTSATQ	CINVTGNGFE	ITQADGSVPT	50
NGAPKSYPSV	YDGCHYGNCA	PRTTLPMRIS	SIGSAPSSVS	YRYTGNGVYN	100
AAVDIWLDP	PRTNGVNRTE	IMIWFNRVGP	VQPIGSPVGT	AHVGRSWEV	150
WTGSNGSNDV	ISFLAPSAIS	SWSFDVKDFV	DQAVSHGLAT	PDWYLTISIQA	200
GFEPWEGGTG	LAVNSFSSAV	N	221		

Figura 2
Núcleo de la celulasa neutra 11AG8: secuencia de ADN

AACCAGCAGA	TCTGCGACCG	CTACGGCACC	ACCACGATCC	AGGACCGGTA	50
CGTGGTGAG	AACAACCGCT	GGGGCACCAG	CGCCACCCAG	TGCATCAATG	100
TGACCGGCAA	CGGTTTCGAG	ATCACCCAGG	CCGACGGTTC	GGTGCCGACC	150
AACGGCGCCC	CGAAGTCCTA	TCCCTCGGTC	TACGACGGCT	GCCACTACGG	200
CAACTGCGCG	CCCCGCACGA	CGCTGCCCAT	GCGGATCAGC	TCGATCGGCA	250
GCGCGCCCG	CAGTGTCTCC	TACCGCTACA	CCGGCAACGG	CGTCTACAAC	300
GCCGCGTACG	ACATCTGGCT	GGACCCGACA	CCCCGCACCA	ACGGGGTGAA	350
CCGGACCGAG	ATCATGATCT	GGTTCAACCG	GGTCGGCCCCG	GTCCAGCCCA	400
TCGGTTCGCC	GGTCGGCAGC	GCCACGTCG	GCGGCCGCGAG	CTGGGAGGTG	450
TGGACCGGCA	GCAACGGTTC	GAACGACGTG	ATCTCCTTCC	TGGCGCCCTC	500
CGCGATCAGC	AGCTGGAGCT	TCGACGTCAA	GGACTTCGTC	GACCAGGCCG	550
TCAGCCACGG	CCTGGCCACC	CCGGACTGGT	ACCTCACCCAG	CATCCAGGCG	600
GGCTTCGAGC	CGTGGGAGGG	CGGCACCGGT	CTGGCCGTGA	ACTCGTTCTC	650
CTCCGCGGTG	AAC				673

FIGURA 3

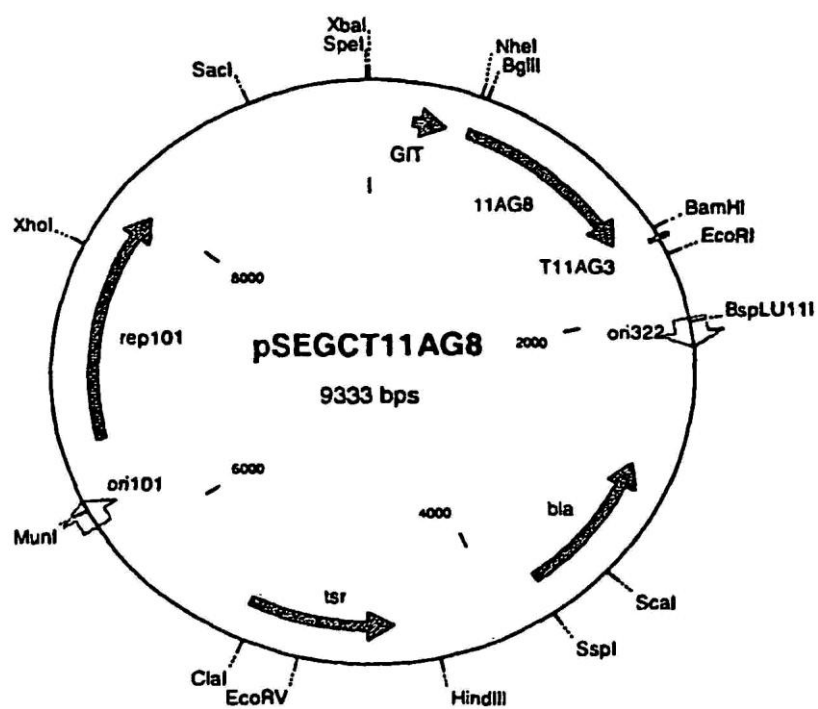
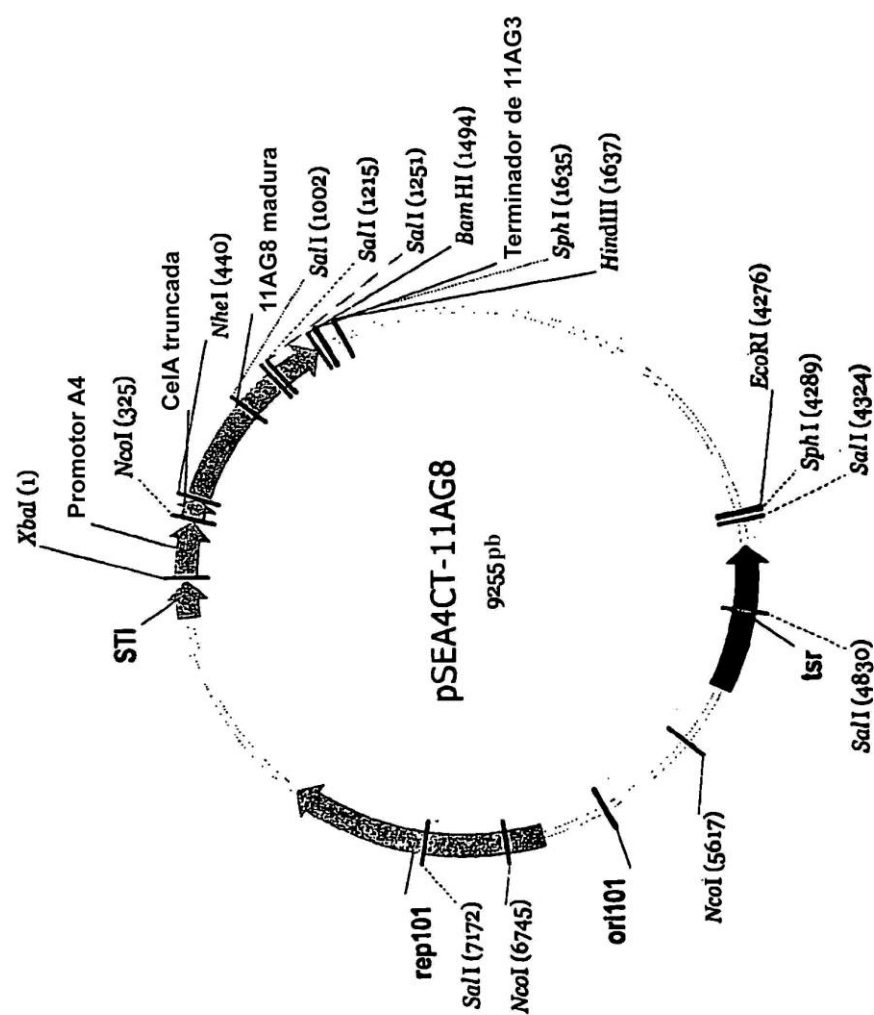


Figura 4: Vector de expresión de la celulasa neutra 11AG8



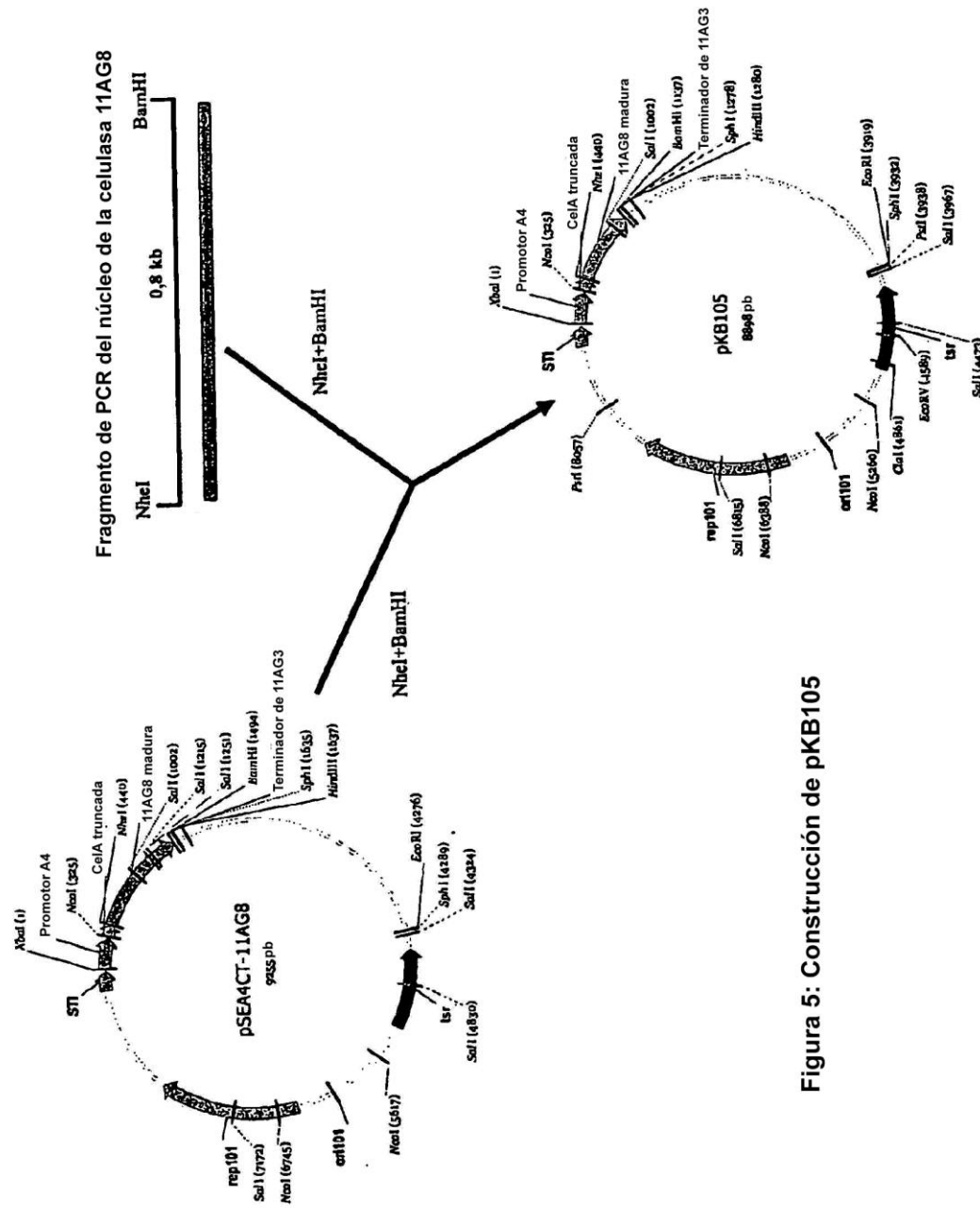
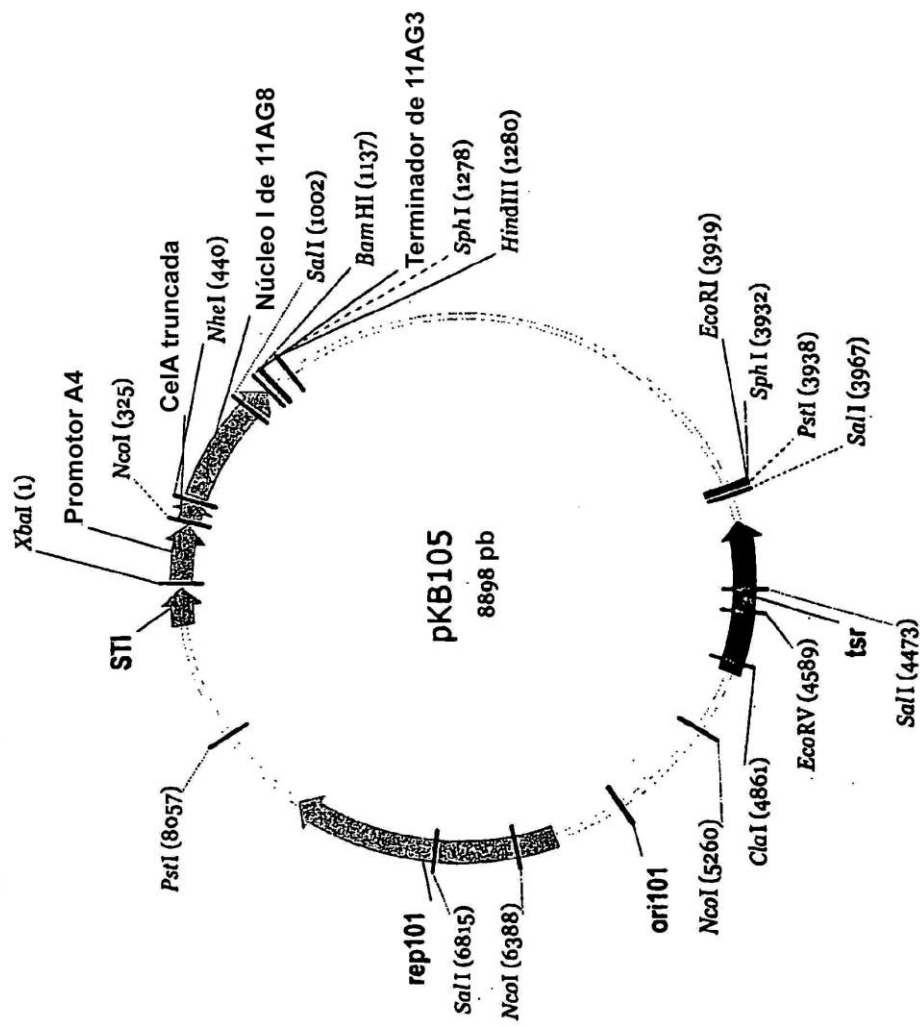
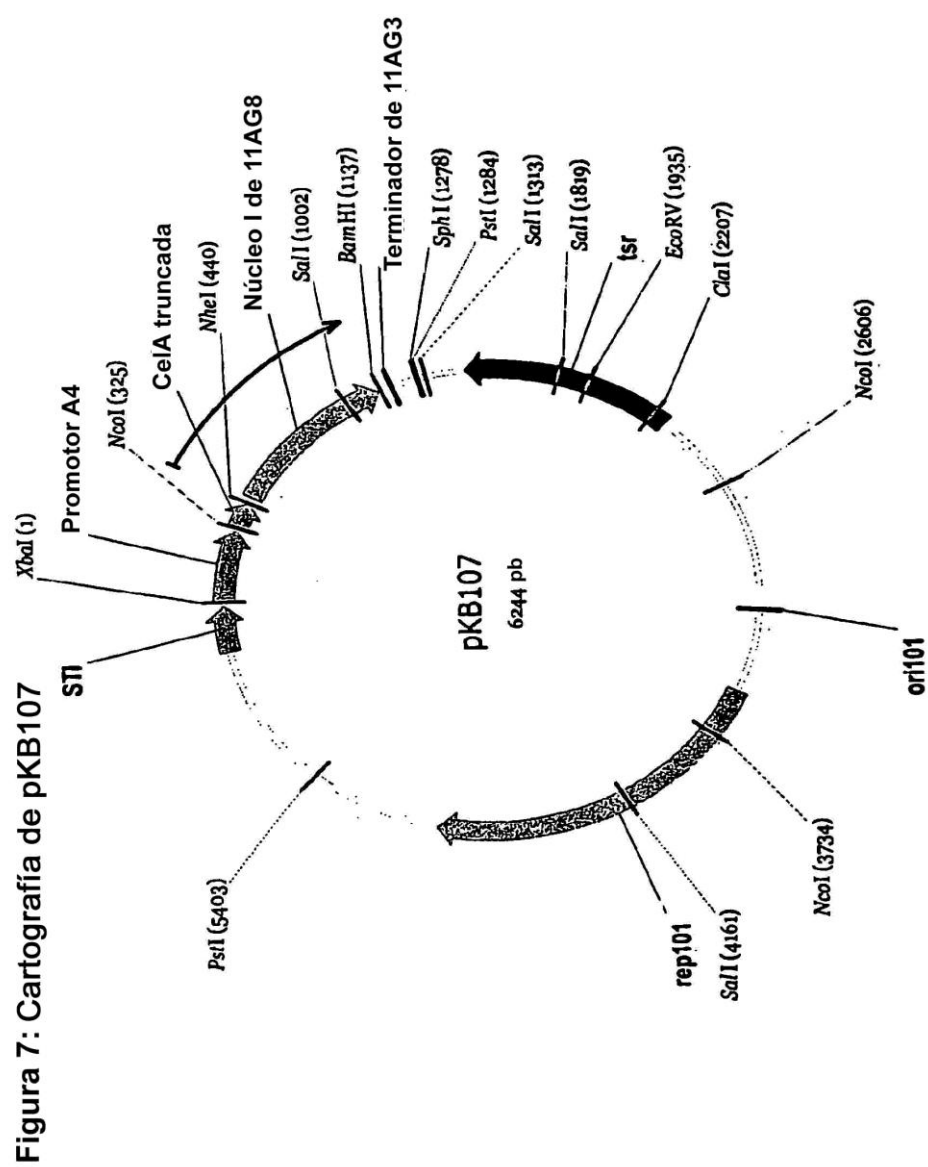


Figura 5: Construcción de pKB105

Figura 6: Cartografía de pKB105





Ensayo de tres muestras diferentes con tres repeticiones respectivamente

50R6	50R6	50R6	pKB105-4	pKB105-4	pKB105-4	pKB107-4	pKB107-4	pKB107-4
38	37	38	108	107	108	116	117	118

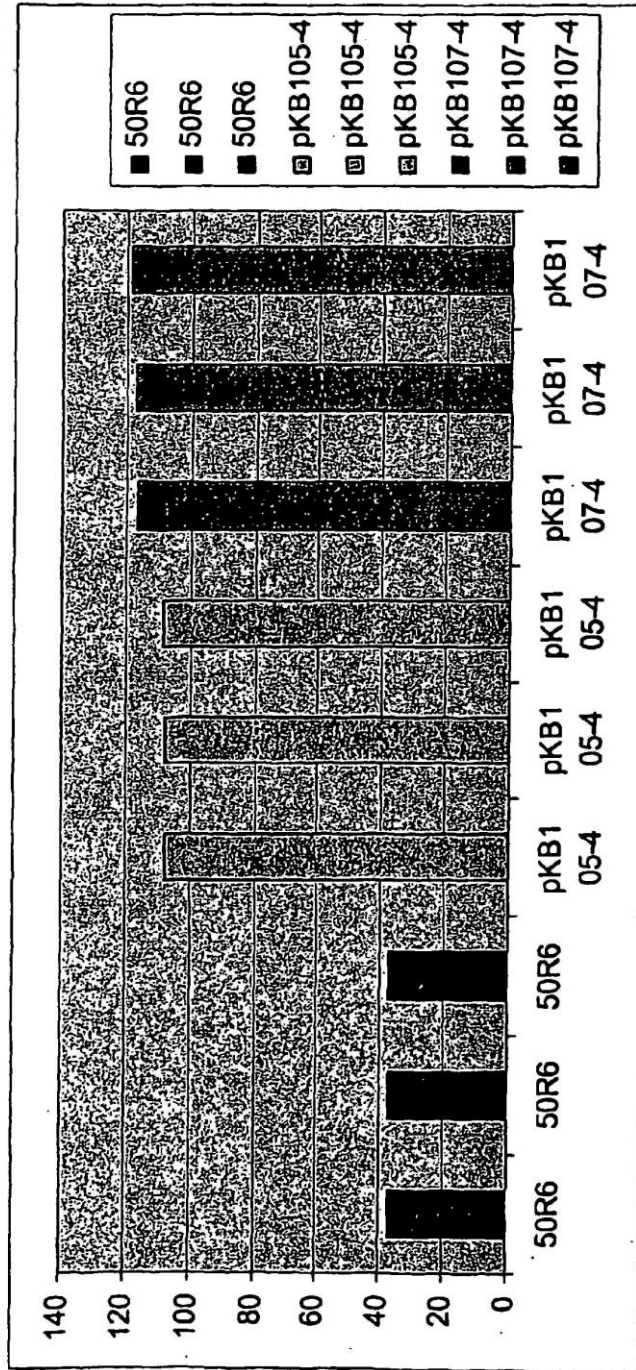


Figura 8

Figura 9

Comportamiento de abrasión: 0,65X de neutra experimental
(nueva), frente a IndiAge Neutra

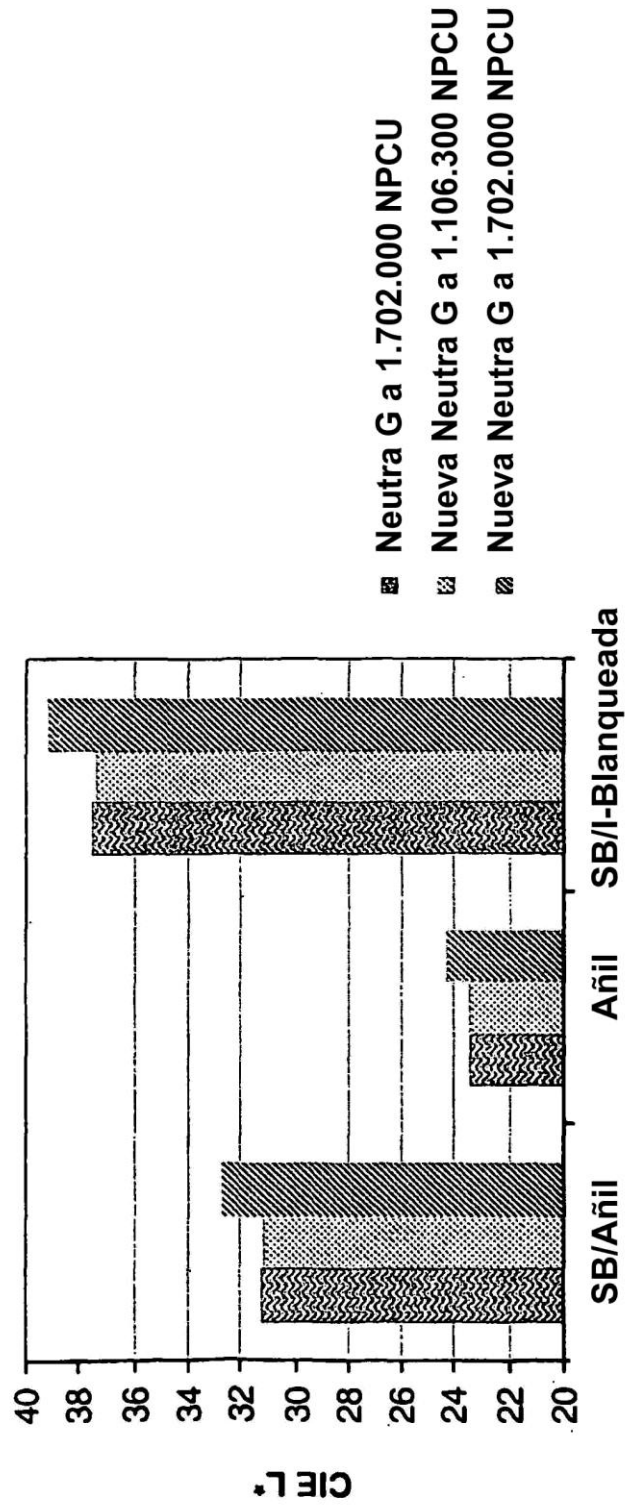


Figura 10

**Comportamiento de retroteñido:
0,65X de neutra experimental (nueva), frente a IndiAge Neutra**

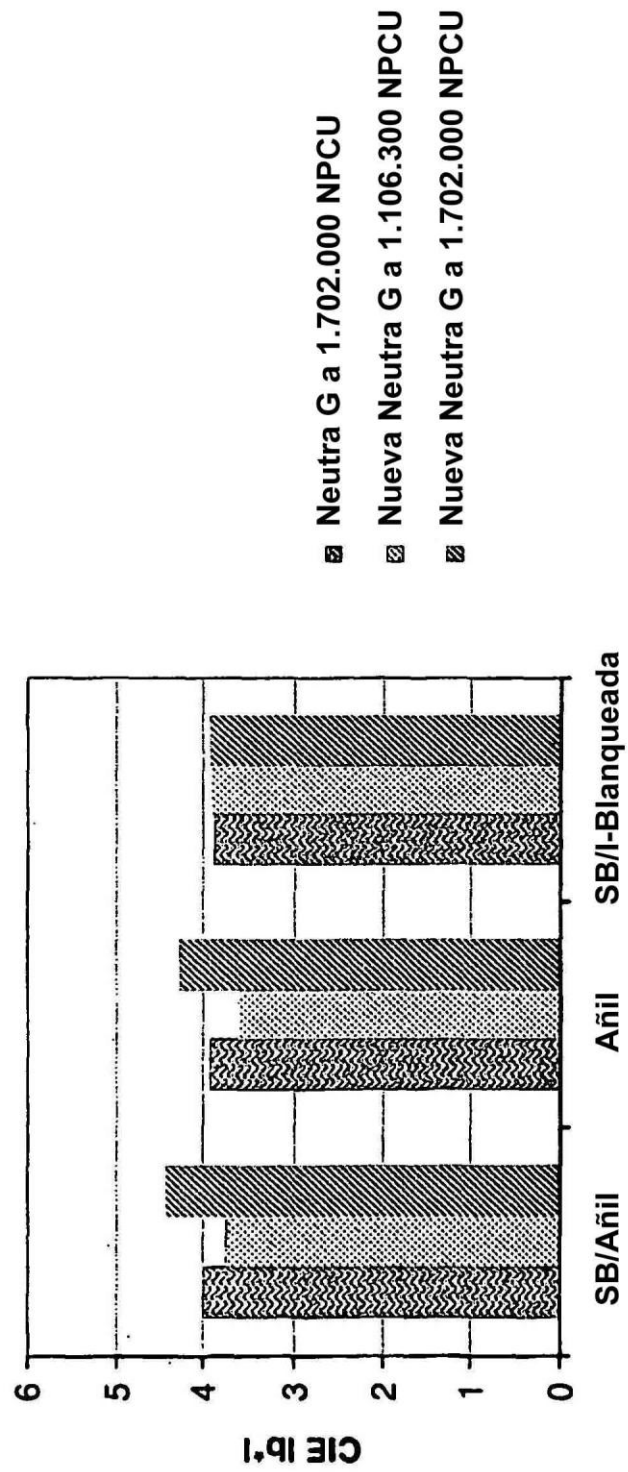
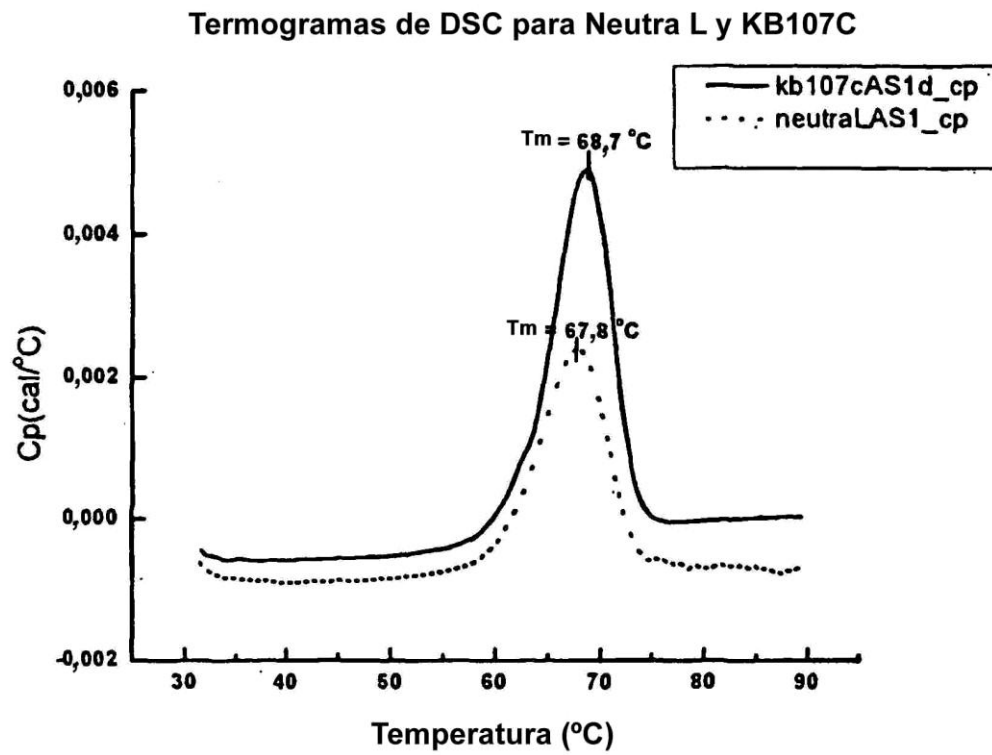


Figura 11



REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante está prevista únicamente para ayudar al lector y no forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha puesto el máximo cuidado en su realización, no se pueden excluir errores u omisiones y la OEP declina cualquier responsabilidad al respecto.

5 Documentos de patente citados en la descripción

- GB 2075028 A [0003]
- GB 2095275 A [0003] [0051]
- GB 2094826 A [0003] [0072] [0075] [0076] [0081]
- GB 1358599 A [0003]
- 10 • WO 9634092 A [0004]
- WO 9634108 A [0004]
- EP 351029 A [0023]
- US SN10992149 A [0023]
- US 4683202 A [0039]
- 15 • US 6287839 B [0042]
- US 6562612 B [0042] [0097]
- WO 0250245 A [0042]
- US 6255115 B [0043]
- US 5264366 A, Ferrari [0044]
- 20 • US 5364770 A [0046]
- US 6022725 A [0046]
- EP 220016 A [0051]
- GB 1368599 A [0051]
- US 5254283 A [0060] [0070]
- 25 • EP 684304 A [0080]
- US 4738682 A [0091]
- FI 9516360 W [0092]
- FI 87372 [0092]
- US 10992149 B [0097]

30 Documentos no procedentes de patentes citados en la descripción

- Knowles, J. et al. TIBTECH, 1987, vol. 5, 255-261 [0002]
- Wilson et al. Critical Reviews in Biotechnology, 1992, vol. 12, 45-63 [0004]
- Nakai et al. Agric. Biol. Chem., 1987, vol. 51, 3061-3065 [0004]
- Nakai et al. Gene, 1988, vol. 65, 229-238 [0004]
- 35 • Singleton et al. DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY. John Wiley and Sons, 1994 [0019]
- Hale; Marham. THE HARPER COLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY. Harper Perennial, 1991 [0019]
- Beaucage ; Caruthers. Tetrahedron Letters, 1981, vol. 22, 1859-1869 [0039]
- Matthes et al. EMBO Journal, 1984, vol. 3, 801-805 [0039]
- Saiki et al. Science, 1988, vol. 239, 487-491 [0039]
- 40 • Ward et al. Mol. Gen. Genet, 1986, vol. 203, 468-478 [0042]
- Yanisch-Perron et al. Gene, 1985, vol. 33, 103-119 [0042]
- Hopwood et al. J. Gen. Microbiol., 1983, vol. 129, 2257-2260 [0042]
- Ausubel et al. CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY. 1994 [0043]
- Campbell et al. Curr. Genet, 1989, vol. 16, 53-56 [0043]
- 45 • Penttilä, M. et al. Gene, 1988, vol. 63, 11-22 [0043]
- Brigidi ; DeRossi ; Bertarini ; Riccardi ; Matteuzzi. FEMS Microbiol. Lett., 1990, vol. 55, 135-138 [0044]
- Hopwood et al. GENETIC MANIPULATION OF STREPTOMYCES: A LABORATORY MANUAL. John Innis Foundation, 1985 [0045]
- The Molecular Biology of Trichoderma and its Application to the Expression of Both Homologous and Heterologous Genes. Nevalainen et al. MOLECULAR INDUSTRIAL MYCOLOGY. Marcel Dekker, Inc, 1992, 129-148 [0046]
- 50 • Kieser, T ; MJ. Bibb ; MJ. Buttner ; KF Chater ; D.A. Hopwood. PRACTICAL STREPTOMYCES GENETICS. John Innes Foundation, 2000 [0047]
- Harwood et al. MOLECULAR BIOLOGICAL METHODS FOR BACILLUS. John Wiley, 1990 [0047]

- Kawabata, S. The Standardization and Analysis of Hand Evaluation. Textile Machinery Society of Japan, 1980 [0050]
 - Hopwood et al. GENETIC MANIPULATION OF STREPTOMYCES, A LABORATORY MANUAL. The John Innes Foundation, 1985 [0102]
 - Precise Color Communication. Minolta Camera Co., Ltd, 1993 [0121]
- 5
- Hunter, R.S. ; G+Harold, R. The measurement of Appearance. J. Wiley and Sons, 1987 [0121]
 - Freire, E. Differential Scanning Calorimetry. Methods. Mol. Biol., 1995, vol. 41, 191-218 [0128]