



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 359 381**

51 Int. Cl.:

C12N 9/88 (2006.01)

C12N 15/60 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

C12N 1/15 (2006.01)

C11D 3/386 (2006.01)

C12P 19/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03720292 .6**

96 Fecha de presentación : **14.05.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1506292**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **16.02.2005**

54

Título: **Variantes de pectato liasa.**

30

Prioridad: **14.05.2002 DK 2002 00746**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
23.05.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
23.05.2011

73

Titular/es: **NOVOZYMES A/S**
Krogshøjvej 36
2880 Bagsværd, DK

72

Inventor/es: **Glad, Sanne, Schröder;**
Andersen, Carsten;
Borchert, Torben, Vedel;
Johansen, Katja, Salomon;
Frisner, Henrik;
Björnvad, Mads, Eskelund y
Thisted, Thomas

74

Agente: **Tomás Gil, Tesifonte Enrique**

ES 2 359 381 T3

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

DESCRIPCIÓN

Variantes de pectato liasa.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a variantes de pectato liasa que muestran alteraciones en relación a una enzima parental que muestra la actividad de pectato liasa como su actividad enzimática principal; a un método para producir tales enzimas y a métodos para usar tales enzimas en las industrias de tratamiento de fibra de celulosa, de detergentes y textiles. En comparación con la enzima parental, las variantes de pectato liasa de la presente invención pueden mostrar estabilidad mejorada en detergentes.

Antecedentes de la invención

Lo polímeros de pectina son ingredientes importantes de las paredes celulares vegetales. La pectina es un heteropolisacárido con un esqueleto compuesto de forma alternante por homogalacturonano (regiones homogéneas) y ramnogalacturonano (regiones velludas). Las regiones homogéneas son polímeros lineales de ácido alfa-D-galacturónico unidos por enlaces 1,4. Los residuos de ácido galacturónicos se pueden metil-esterificar en el grupo carboxilo a un grado variable, normalmente en una forma no aleatoria con bloques de ácido poligalacturónico que son metil-esterificados completamente.

Las enzimas pectolíticas (pectinasas) se pueden clasificar según su sustrato preferencial, pectina altamente metil-esterificada o pectina metil-esterificada baja y ácido poligalacturónico (pectato) y su mecanismo de reacción, beta-eliminación o hidrólisis. La pectinasas pueden ser principalmente endoactivas, cortando el polímero en sitios al azar dentro de la cadena para dar una mezcla de oligómeros, o pueden ser exoactivas, atacando desde un extremo del polímero y produciendo monómeros o dímeros. Diferentes actividades de pectinasa que actúa sobre las regiones homogéneas de pectina se incluyen en la clasificación de enzimas proporcionada por la Nomenclatura Enzimática (1992) tal como pectato liasa (EC 4.2.2.2), pectina liasa (EC 4.2.2.10), poligalacturonasa (EC 3.2.1.15), exo-poligalacturonasa (EC 3.2.1.67), exo-poligalacturonato liasa (EC 4.2.2.9) y exo-poli-alfa-galacturonosidasa (EC 3.2.1.82).

Las pectato liasas han sido clonadas a partir de distintos géneros bacterianos tales como *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Klebsiella* y *Xanthomonas*. También se ha descrito la clonación de una pectato liasa a partir de *Bacillus subtilis* (Nassen *et al.* (1993) FEBS 335:319-326) y *Bacillus sp.* YA-14 (Kim *et al.* (1994) Biosci. Biotech. Biochem. 58:947-949).

Las pectato liasas generalmente se caracterizan por un pH alcalino óptimo y un requisito absoluto de cationes bivalentes, siendo Ca^{2+} el más estimulador.

Es un objeto de la presente invención proporcionar una variante de enzima degradadora de la pared celular, especialmente, una variante de enzima de pectato liasa, que muestra rendimiento mejorado por encima de la pectato liasa parental cuando se aplica, por ejemplo, en detergentes o en procesos de la industria textil.

Resumen de la invención

La invención es tal y como se define en las reivindicaciones. Los inventores han detectado ahora que determinadas sustituciones de aminoácido de enzimas degradadoras de la pared celular, especialmente las pectato liasas con una estructura que incluye una hélice beta, producen variantes enzimáticas con rendimiento mejorado en la gama de pH alcalino o neutro en comparación con la enzima parental. Las variantes de pectato liasa de la invención, cuando se las usa en composiciones de detergentes, han mejorado la estabilidad de almacenamiento, es decir, menor sensibilidad a los detergentes.

Así, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a una variante de pectato liasa que comprende alteraciones en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en el número de posiciones:

5, 9, 11, 26, 28, 30, 31, 37, 40, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 54, 61, 64, 68, 69, 70, 71, 74, 75, 76, 79, 86, 87, 91, 99, 105, 106, 107, 111, 115, 116, 118, 122, 123, 134, 136, 139, 140, 141, 146, 148, 156, 158, 170, 182, 185, 186, 189, 193, 194, 196, 199, 201, 202, 204, 213, 215, 218, 224, 228, 229, 234, 235, 237, 251, 256, 257, 258, 272, 277, 286, 295, 298, 301, 302, 303, 305, 307, 308, 314, 316, 323, 324, 326, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 349, 356, 357, 363, 366, 378, 381, 384, 386, 387, 389, 390, 391, 393 y 397, donde las alteraciones son independientemente

(i) una inserción de un aminoácido abajo del aminoácido que ocupa la posición,

(ii) una delección del aminoácido que ocupa la posición, o

(iii) una sustitución del aminoácido que ocupa la posición con un aminoácido diferente,

65 y caracterizadas por el hecho de que cada posición corresponde a una posición de la secuencia de aminoácidos de la pectato liasa con la secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º 2, y donde la enzima parental es la pectato liasa mostrada en SEC ID N.º 2 o una pectato liasa con al menos 95% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º 2.

ES 2 359 381 T3

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos que codifica la variante de pectato liasa.

En un tercer aspecto de la invención, se proporciona un vector de expresión.

En un cuarto aspecto de la presente invención, se proporciona una célula huésped microbiana transformada con el vector de expresión anteriormente mencionado.

En un quinto aspecto de la presente invención, se proporciona un método para mejorar la estabilidad del detergente de una pectato liasa que comprende la alteración de uno o más aminoácidos.

En un sexto aspecto de la invención, se proporcionan métodos para producir una variante de pectato liasa según la invención. Los mismos comprenden el cultivo de una célula en la cual se ha introducido un vector de expresión como se describe más arriba, por el cual dicha célula expresa la variante codificada por la secuencia de ácidos nucleicos y la recuperación de la variante de pectato liasa.

La variante de pectato liasa de la invención es útil para el tratamiento de material celulósico, especialmente, fibra con celulosa, hilo, tela tejida o no tejida, tratamiento de pastas de papel de producción de papel mecánicas o desperdicios de papel para reciclaje, y para el enriado de fibras. El tratamiento puede llevarse a cabo durante el tratamiento de material celulósico en un material preparado para la producción de prendas o producción de tejidos, por ejemplo, en el paso de descolado o descrudado; o durante el lavado industrial o doméstico de tales tejidos o prendas.

Por consiguiente, en otros aspectos, la presente invención se refiere a una composición de detergente que comprende una variante de pectato liasa con considerable actividad de degradación de la pared celular. También se refiere al uso de la variante de pectato liasa de la invención para el tratamiento, por ejemplo, de la limpieza de fibras con celulosa, hilo, tela tejida o no tejida.

Además, aspectos adicionales de la invención se refieren a una composición enzimática que comprende la variante de pectato liasa de la invención en combinación con otras enzimas, y a una composición de detergente o de limpieza, preferiblemente, una composición de lavado de platos o de lavandería, comprendiendo la variante de pectato liasa de la invención.

La variante de pectato liasa de la invención es muy eficaz para el uso en un proceso de descrudado enzimático en la preparación de material celulósico, por ejemplo, para una respuesta apropiada en operaciones de tinte posteriores.

Otro aspecto de la invención se refiere al tratamiento de vino y zumo. La enzima o preparación enzimática se puede utilizar en el tratamiento de trituración de frutas y verduras para mejorar la capacidad extractiva y de degradación de la trituración.

Además, un aspecto de la invención es la aplicación como un aditivo de pienso. Cuando se agrega a pienso con material vegetal de soja, semilla de colza, lupín, etc., la variante de pectato liasa mejora significativamente la descomposición *in vivo* del material de la pared celular vegetal, por lo que se consigue una mejor utilización de los nutrientes vegetales por parte del animal.

Definiciones

Antes de describir esta invención con más detalle, se definirán primeramente los siguientes términos y convenciones.

El término “enzima de tipo salvaje” denota una enzima que es endógena a un microorganismo de origen natural tal como un hongo o una bacteria encontrada en la naturaleza.

El término “enzima parental”, según se utiliza en este caso, significa una enzima en la que las modificaciones se realizan para producir las variantes enzimáticas de la invención. Una enzima parental puede ser una enzima aislada de una fuente natural, o una enzima en la cual las modificaciones precedentes se han hecho al tiempo que se retuvo la actividad característica de la enzima en cuestión. La pectato liasa progenitora de la invención puede ser un pectato liasa de tipo salvaje.

El término “variante enzimática” significa una enzima que comprende diferencias en su secuencia de aminoácidos con la de la enzima parental. Las diferencias comprenden sustituciones, deleciones y/o inserciones en comparación con la enzima parental.

El término “ortólogo” (u “homólogo de especie”) denota un polipéptido o una proteína obtenida a partir de una especie que tiene homología con un polipéptido análogo o proteína de una especie diferente.

El término “parálogo” denota un polipéptido o una proteína obtenida a partir de una especie dada que tiene homología con un polipéptido o proteína diferente de esa misma especie.

ES 2 359 381 T3

El término “vector de expresión” denota una molécula de ADN, lineal o circular, que comprende un segmento que codifica un polipéptido de interés operativamente vinculado a segmentos adicionales que propician su transcripción. Tales segmentos adicionales pueden incluir secuencias de promotor y terminador, y pueden opcionalmente incluir uno o más orígenes de replicación, uno o más marcadores seleccionables, un intensificador, una señal de poliadenilación y similares. Los vectores de expresión generalmente se derivan de ADN plásmido o vírico, o pueden contener elementos de ambos. El vector de expresión de la invención puede ser un vector de expresión que sea convenientemente sometido a procedimientos de ADN recombinante, y la elección del vector frecuentemente dependerá de la célula huésped en la cual se introducirá el vector. Así, el vector puede ser un vector de replicación autónoma, es decir, un vector existente como una entidad extracromosómica, cuya replicación es independiente de la replicación cromosómica, por ejemplo, un plásmido. Alternativamente, el vector puede ser uno que, al ser introducido en una célula huésped, se integra en el genoma de la célula huésped y se replica junto con el/los cromosoma/s en que ha sido integrado.

El término “expresado recombinante” o “expresado de manera recombinante” utilizado en el presente en relación con la expresión de un polipéptido o una proteína se define según la definición estándar en la técnica. La expresión recombinante de una proteína generalmente es realizada usando un vector de expresión como se describe inmediatamente arriba.

El término “aislado”, cuando se aplica a una molécula polinucleótida, denota que el polinucleótido ha sido eliminado de su ambiente genético natural y está, de esa manera, libre de otras secuencias de codificación indeseadas o extrañas, y está en una forma adecuada para su uso dentro de sistemas de producción de proteínas creadas genéticamente. Tales moléculas aisladas son aquellas que se separan de su entorno natural e incluyen ADNc y clones genómicos. Las moléculas de ADN aisladas de la presente invención están libres de otros genes con los cuales se asocian comúnmente, pero pueden incluir regiones no codificantes 5' y 3' de origen natural tales como promotores y terminadores. La identificación de regiones asociadas será evidente para cualquier experto con conocimientos básicos en la materia (véase, por ejemplo, Dynan y Tijan, Nature 316:774-78, 1985). El término “un polinucleótido aislado” puede alternativamente ser denominado “un polinucleótido clonado”.

Cuando se aplica a una proteína o un polipéptido, el término “aislado” indica que la proteína se encuentra en una condición diferente de su entorno nativo. En una forma preferida, la proteína aislada está sustancialmente libre de otras proteínas, particularmente otras proteínas homólogas (es decir, “impurezas homólogas” (véase a continuación)). Se prefiere proporcionar la proteína en una forma mayor de 40% de pureza, más preferiblemente una forma mayor de 60% de pureza. Incluso más preferiblemente, se prefiere proporcionar la proteína en una forma altamente purificada, es decir, más que 80% de pureza, más preferiblemente más que 95% de pureza, e incluso más preferiblemente más que 99% de pureza, según se determine por SDS-PAGE.

El término “proteína/polipéptido aislado” puede denominarse de forma alternativa “proteína/polipéptido purificado”.

El término “impurezas homologas” significa cualquier impureza (p. ej. otros polipéptidos aparte del polipéptido de la invención) que se origina de la célula homóloga de la cual se obtiene la enzima de la invención originalmente.

El término “obtenido a partir de” según se utiliza en este caso en relación con una fuente microbiana específica, significa que el polinucleótido y/o el polipéptido es producido por la fuente específica, o por una célula en la que se ha insertado un gen de la fuente.

El término “vinculado operativamente”, cuando se refiere a segmentos de ADN, denota que los segmentos están dispuestos de modo que funcionen en concierto para sus objetivos determinados, por ejemplo, la transcripción se inicia en el promotor y procede a través del segmento de codificación al terminador.

El término “polinucleótido” denota un polímero monocatenario o bicatenario de bases de desoxirribonucleótido o ribonucleótido leído del extremo 5' al 3'. Los polinucleótidos incluyen ARN y ADN, y se pueden aislar de fuentes naturales, sintetizar *in vitro* u obtener a partir de una combinación de moléculas sintéticas y naturales.

El término “complementos de moléculas de polinucleótido” denota moléculas de polinucleótidos con una secuencia de base complementaria y orientación inversa en comparación con una secuencia de referencia. Por ejemplo, la secuencia 5' ATGCACGGG 3' es complementaria a 5' CCCGTGCAT 3'.

La expresión “secuencia de nucleótidos degenerados” indica una secuencia de nucleótidos que incluye uno o más codones degenerados (en comparación con una molécula de polinucleótido de referencia que codifica un polipéptido). Los codones degenerados contienen diferentes tripletes de nucleótidos, pero codifican el mismo residuo de aminoácido (es decir, tripletes GAU y GAC codifican cada uno Asp).

El término “promotor” denota una porción de un gen que contiene secuencias de ADN que permiten la unión de polimerasa de ARN e iniciación de la transcripción. Se encuentran comúnmente, pero no siempre, secuencias de promotor en las regiones no codificantes 5' de genes.

El término “secuencia de señal secretora” es una secuencia de ADN que codifica un polipéptido (un “péptido secretor”) que, como componente de un polipéptido mayor, dirige el polipéptido mayor a través de una trayectoria

ES 2 359 381 T3

secretora de una célula en la que se sintetiza. El péptido mayor se divide comúnmente para separar el péptido secretor durante el tránsito a través de la trayectoria secretora.

El término “pectina” denota pectato, ácido poligalacturónico y pectina que se puede esterificar a un grado inferior o superior.

El término “pectinasa” denota una enzima de pectinasa definida según la técnica donde las pectinasas son un grupo de enzimas que disocian enlaces glicosídicos de sustancias pécticas principalmente poli(1,4-alfa-D-galacturonido y sus derivados (véase la referencia Sakai *et al.*, Pectin, pectinase and protopectinase: production, properties and applications, págs. 213-294 en: Advances in Applied Microbiology vol: 39, 1993).

Preferiblemente, una pectinasa de la invención es una enzima de pectinasa que cataliza la escisión aleatoria de enlaces alfa-1,4-glicosídicos en ácido péctico también llamado ácido poligalacturónico por transeleminación tal como la poligalacturonato liasa de clase enzimática (EC 4,2,2,2) (PGL) también conocida como poli(1,4-alfa-D-galacturonida) liasa conocida también como pectato liasa.

El término “termoestabilidad” o “estabilidad térmica” significa la estabilidad de la proteína ante la influencia térmica. Todas las proteínas enzimáticas se desestabilizan y finalmente se degradan con el aumento de la temperatura. Cada proteína enzimática tiene una determinada gama de temperatura en la cual la proteína es estable y retiene su actividad enzimática. Termoestabilidad aumentada significa que la proteína enzimática siempre retiene su actividad enzimática y/o muestra una actividad relativa más alta a temperaturas aumentadas.

El término “estabilidad de detergente” o “estabilidad de almacenamiento” significa la estabilidad de la proteína en una formulación con detergentes, por ejemplo, tensioactivos aniónicos. Los tensioactivos aniónicos se caracterizan por la combinación de un grupo aniónico y una cola hidrofóbica. Cuando se une a la proteína, un residuo cargado positivamente como lisina o arginina, y un área hidrofóbica son así posibles puntos de interacción. De forma similar, la dinámica de las regiones particularmente flexibles es la abertura para la accesibilidad a aminoácidos normalmente aplastados en el interior de la proteína. Estos residuos son típicamente hidrofóbicos y son, por tanto, atractivos para la cola del tensioactivo. Una interacción química entre la enzima y el tensioactivo con gran certeza dejarán la enzima inactiva. Por tanto, la estabilidad de almacenamiento o de detergente significa que a una cierta concentración de detergente y temperatura, se retendrá una mayor actividad enzimática después de un periodo de tiempo determinado (actividad residual superior).

Por consiguiente, la termoestabilidad y la estabilidad de detergente son dos características independientes de una proteína o una enzima.

Las variantes de pectato liasa de la invención con estabilidad de detergente mejorada pueden mostrar al menos 120% (preferiblemente al menos 140%, más preferiblemente al menos 160%, incluso más preferiblemente al menos 180%, incluso más preferiblemente al menos 200%, de forma más preferible al menos 250% y en particular al menos 300%) de actividad residual en comparación con la pectato liasa parental, cuando son sometidas al método de análisis descrito en el ejemplo 1.

Numeración de las proteínas

En el contexto de esta invención, se emplea una numeración específica de las posiciones de residuos de aminoácidos en las enzimas degradadoras de la pared celular, especialmente, las enzimas de pectato liasa. Por ejemplo, al alinear las secuencias de aminoácidos de pectato liasas conocidas es posible asignar sin ambigüedad un número de posición de aminoácido en cualquier residuo de aminoácido en cualquier enzima de pectato liasa, si se conoce su secuencia de aminoácidos.

Usando el sistema de numeración originado a partir de la secuencia de aminoácidos de la pectato liasa codificada por el polinucleótido presente en el plásmido de la cepa de *Bacillus subtilis* DDSM 14218, descrito en SEC ID N.º 2, alineado con la secuencia de aminoácidos de otras pectato liasas, es posible indicar la posición de un residuo de aminoácido en una enzima de pectato liasa sin ambigüedad.

Al describir las distintas variantes de enzima degradadoras de la pared celular contempladas o producidas según esta invención, las siguientes nomenclaturas se adaptan para facilidad de referencia:

Sustituciones

Aminoácido original; posición; aminoácido sustituido

Por consiguiente, la sustitución de serina por isoleucina en la posición 72 se designa como S72I.

Las mutaciones múltiples son separación por marcas de adición (“+”), por ejemplo, M169I + F198V, representando mutaciones en las posiciones 169 y 198 sustituyendo la metionina (M) con isoleucina (I), y fenilalanina (F) con valina (V), respectivamente.

ES 2 359 381 T3

Deleciones

Una deleción de glicina en la posición 195 estará indicada por:

5 Gly195* o G195*

Correspondientemente, la deleción de más de un residuo de aminoácido, tal como la deleción de glicina y leucina en las posiciones 195 y 196 será designada

10 Gly195*+Leu196* o G195*+L196*

Inserciones

15 La inserción de un residuo de aminoácido adicional tal como, por ejemplo, una lisina después de G195 está indicada por:

Gly195GlyLys o G195GK;

20 o, cuando se inserta más de un residuo de aminoácido, tal como, por ejemplo, un Lys y Ala después de G195, esto se indicará como:

Gly195GlyLysAla o G195GKA

25 En tales casos, el/los residuo/s de aminoácido insertado/s se numeran por la adición de letras minúsculas al número de posición del residuo de aminoácido que precede al residuo o los residuos de aminoácido insertado/s. En el ejemplo anterior, entonces, se cambiarían las secuencias 194 a 196 de:

194 195 196

30 A - G - L

a 194 195 195a 195b 196

A - G - K - A - L

35 En casos en los cuales es insertado un residuo de aminoácido idéntico al residuo de aminoácido existente, está claro que se produce degeneración en la nomenclatura. Si, por ejemplo, una glicina es insertada después de la glicina en el ejemplo anterior, esto se indicaría por G195GG. El mismo cambio real podría también indicarse como A194AG para el cambio de:

40 194 195 196

A - G - L

45 a

194 195 195a 196

A - G - G - L

50 o 194 194a 195 196

55 Tales ejemplos serán evidentes para el experto en la materia y la indicación G195GG y las indicaciones correspondientes para este tipo de inserciones, de este modo, están destinadas a comprender tales indicaciones de degeneración equivalentes.

60 Todas las posiciones a las que se hace referencia en este caso por numeración de pectato liasas de refieren, a menos que se indique de otro modo, a la numeración anteriormente descrita, y se determinan en relación a la secuencia de aminoácidos de la pectato liasa codificada por el polinucleótido presente en el plásmido de la cepa de *Bacillus subtilis* DSM 14218, descrita en SEC ID N.º 2.

Descripción detallada de la invención

65 La presente invención se refiere a variantes de una pectato liasa parental (EC 4.2.2.2). Las variantes tienen mejores propiedades en comparación con la enzima parental, especialmente, la estabilidad de detergente o estabilidad de almacenamiento en composiciones de detergentes es mejor.

ES 2 359 381 T3

En el proceso de mejoramiento de las propiedades de la pectato liasa parental, los inventores detectaron que las alteraciones de aminoácidos específicos en el esqueleto de polipéptido progenitor alterarían significativamente la estabilidad de detergente de la enzima.

5 *Polinucleótidos*

Dentro de las formas de realización preferidas de la invención, se contempla que un polinucleótido que codifica la enzima parental de la variante de pectato liasa de la invención hibridará a regiones de tamaño similar del polinucleótido correspondiente de SEC ID N.º1, o una secuencia complementaria a ella, bajo condiciones de astringencia al menos media, preferiblemente condiciones de astringencia altas.

En particular, los polinucleótidos de la invención hibridarán a una sonda de ADN bicatenario desnaturizada que comprende la secuencia de variante completa correspondiente a las posiciones 1-1200 de SEC ID N.º 1 con alteraciones de secuencia apropiadas correspondientes a sustituciones de aminoácido reales hechas o cualquier sonda que comprende una subsecuencia variante de la misma con una longitud de al menos aproximadamente 100 pares de bases bajo condiciones de astringencia al menos media, pero preferiblemente con condiciones de astringencia alta como se describe en detalle más abajo. Las condiciones experimentales adecuadas para determinar la hibridación a astringencia media o alta entre una sonda de nucleótido y una secuencia de ADN o ARN homóloga implica prerremojado del filtro con los fragmentos de ADN o ARN para que hibriden en 5 x SSC (sodio cloruro/sodio citrato, Sambrook *et al.* 1989) durante 10 min, y prehibridación del filtro en una solución de 5 x SSC, 5 x solución del Denhardt (Sambrook *et al.* 1989), SDS al 0,5% y 100 microgramo/ml de ADN de esperma del salmón desnaturizado y sometido a un baño de ultrasonido (Sambrook *et al.* 1989), seguido de hibridación en la misma solución con una concentración de 10 ng/ml de una sonda de cebado aleatorio (Feinberg, A. P. y Vogelstein, B. (1983) Anal. Biochem. 132:6-13), etiquetada con 32P dCTP (actividad específica superior a 1 x 10⁹ cpm/microgramo) durante 12 horas a aproximadamente 45 grados Celsius. El filtro luego es lavado dos veces durante 30 minutos en 2 x SSC, SDS al 0,5% al menos 60 grados Celsius (astringencia media), todavía más preferiblemente al menos 65 grados Celsius (astringencia media/alta), incluso más preferiblemente al menos 70 grados Celsius (astringencia alta), e incluso más preferiblemente al menos 75 grados Celsius (astringencia altísima).

La moléculas a las que la sonda de oligonucleótidos hibridiza bajo estas condiciones se detectan usando una película radiográfica.

Como se observó anteriormente, los polinucleótidos que codifican las variantes de pectato liasa de la presente invención incluyen ADN y ARN. Los métodos para aislamiento ADN y ARN se conocen en la técnica. El ADN y el ARN que codifican genes de interés se pueden clonar en Bancos de genes o bibliotecas de ADN mediante métodos conocidos en la técnica.

Lo polipéptidos de codificación de polinucleótidos con actividad de pectato liasa de la invención luego son identificados y aislados por, por ejemplo, hibridación o PCR. Las especies homólogas de la pectato liasa parental usada en la preparación de las variantes de pectato liasa de la invención pueden clonarse usando información y composiciones proporcionadas por la presente invención en combinación con técnicas de clonación convencionales. Por ejemplo, el ADN puede clonarse usando ADN cromosómico obtenido a partir de un tipo de célula que expresa la proteína. Fuentes adecuadas de ADN pueden identificarse evaluando manchas del norte con sondas diseñadas a partir de las secuencias descritas aquí. Luego se prepara una biblioteca a partir de ADN cromosómico de una línea celular positiva. Un ADN que codifica un polipéptido con actividad de pectato liasa de la invención luego puede ser aislado por una variedad de métodos, tal como sonda con un ADN parcial o completo o con uno o más conjuntos de sondas degeneradas según las secuencias descritas. Un ADN también puede clonarse usando la reacción en cadena de polimerasa, o PCR (Mullis, patente estadounidense 4.683.202), usando cebadores diseñados de las secuencias descritas aquí. Dentro de un método adicional, la biblioteca de ADN puede utilizarse para transformar o transfectar células huéspedes, y la expresión del ADN de interés se puede detectar con un anticuerpo (policlonal o monoclonal) aumentado frente a la pectato liasa clonada de la cepa de *B. subtilis* cepa depositada como IFO 3134, o por una prueba de actividad relacionada con un polipéptido con actividad de pectato liasa. También pueden aplicarse técnicas similares al aislamiento de clones genómicos.

La parte de codificación de polipéptido de la secuencia de ADN clonó un plásmido presente en *Bacillus subtilis* DSM 14218 y/o una secuencia de ADN análoga de la invención se puede clonar a partir de una cepa de especies bacteriana *Bacillus subtilis*, preferiblemente la cepa depositada como IFO 3134, produciendo la enzima con actividad de degradación de pectina u otro organismo relacionado como se describe en este caso.

Alternativamente, la secuencia análoga puede ser construida basándose en la secuencia de ADN obtenible de un plásmido presente en *Bacillus subtilis* DSM 14218, por ejemplo, ser una subsecuencia de la misma y/o por introducción de sustituciones de nucleótido que no dan lugar a otra secuencia de aminoácidos de la pectato liasa codificada por la secuencia de ADN, pero que corresponde al uso de codón del organismo huésped destinado a la producción de la enzima, o por introducción de sustituciones de nucleótido que pueden dar lugar a una secuencia de aminoácidos diferente (es decir, una variante de la enzima degradadora de la pectina de la invención).

ES 2 359 381 T3

Polipéptidos

La secuencia de aminoácidos n.º 1-399 de SEC ID N.º 2 es una secuencia de pectato liasa madura correspondiente a una pectato liasa de tipo salvaje de la especie *Bacillus subtilis* depositada como IFO 3134 (Institute for Fermentation, Osaka, 1 7-85, J usohommachi 2-chome, Yodagawa-ku, Osaka 532-8686, Japón).

La presente invención también proporciona variantes de pectato liasa de polipéptidos que son sustancialmente homólogos a los polipéptidos de SEC ID N.º 2 y sus homólogos de especies (parálogos u ortólogos). El término “sustancialmente homólogo” se utiliza en este caso para indicar polipéptidos con 70%, más preferiblemente al menos 85%, e incluso más preferiblemente al menos 90% de identidad de secuencia a la secuencia mostrada en SEC ID N.º 2 o sus ortólogos o parálogos. Tales polipéptidos serán más preferiblemente al menos 95% idénticos, y de forma más preferible 98% o más idénticos a la secuencia mostrada en SEC ID N.º 2 o sus ortólogos o parálogos. La identidad de la secuencia de porcentaje se determina por métodos convencionales, mediante programas informáticos conocidos en la técnica tales como GAP proporcionados en el paquete del programa GCG (Program Manual for the Wisconsin Package, Version 8, agosto de 1994, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, EE. UU. 53711) según se describe en Needleman, S.B. y Wunsch, C.D., (1970), *Journal of Molecular Biology*, 48, 443-4531.

GAP se usa con los siguientes ajustes para comparación de secuencias polipeptídicas: penalización de creación GAP de 3,0 y penalización de extensión de GAP de 0,1.

La identidad de secuencias de moléculas polinucleótidas se determina por métodos similares usando GAP con los siguientes ajustes para comparación de secuencias de ADN: penalización de creación GAP de 5,0 y penalización de extensión de GAP de 0,3.

La pectato liasa parental es preferiblemente derivada de un microorganismo, preferiblemente de una bacteria, una arquea o un hongo, especialmente a partir de una bacteria tal como una bacteria que pertenece a *Bacillus*, preferiblemente a una cepa *Bacillus alkalofilic* que puede ser seleccionada del grupo que consiste en la especie *Bacillus subtilis* y especies *Bacillus* altamente relacionadas en las que todas las especies son preferiblemente al menos 95%, incluso más preferiblemente al menos 98%, homólogas a *Bacillus subtilis* según secuencias de ADN 16s alineadas. Las pectato liasas progenitoras de la invención son sustancialmente homólogas a los polipéptidos de SEC ID N.º 2 y sus homólogos de especies (parálogos u ortólogos). El término “sustancialmente homólogo” se utiliza en este caso para indicar polipéptidos con 70%, más preferiblemente al menos 85%, e incluso más preferiblemente al menos 90%, de identidad de secuencia a la secuencia mostrada en SEC ID N.º 2 o sus ortólogos o parálogos. Tales polipéptidos serán más preferiblemente al menos 95% idénticos, y de forma más preferible 98% o más idéntico a la secuencia mostrada en SEC ID N.º 2 o sus ortólogos o parálogos.

La proteínas parentales sustancialmente homólogas y los polipéptidos se caracterizan por tener una o más sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácido. Estos cambios son preferiblemente de una naturaleza menor, es decir, sustituciones conservadoras de aminoácido (véase la tabla 1) y otras sustituciones que no afectan significativamente el pliegue o la actividad de la proteína o el polipéptido; deleciones pequeñas, típicamente de una a aproximadamente 30 aminoácidos; y pequeñas extensiones amino o carboxilo terminales, tales como un residuo de metionina aminoterminal, un pequeño péptido de enlace de hasta 20-25 residuos aproximadamente, o una pequeña extensión que facilita la purificación (una etiqueta de afinidad), tal como un tracto de polihistidina, proteína A (Nilsson *et al.*, *EMBO J.* 4:1075, 1985; Nilsson *et al.*, *Methods Enzymol.* 198:3, 1991. Véase en general Ford *et al.*, *Protein Expression and Purification* 2: 95-107, 1991. Los ADNs que codifican las etiquetas de afinidad están disponibles de proveedores comerciales (p. ej., Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ; New England Biolabs, Beverly, MA).

No obstante, aunque los cambios anteriormente descritos son preferiblemente de una naturaleza menor, tales cambios también pueden ser de una naturaleza más grande tales como fusión de polipéptidos más grandes de hasta 300 aminoácidos o más como extensiones tanto amino como carboxilo terminales.

ES 2 359 381 T3

TABLA 1

Sustituciones conservadoras de aminoácido

| | | |
|----|-----------------------------|-----------------|
| 5 | Básico: | arginina |
| | | lisina |
| 10 | Ácido: | ácido glutámico |
| | | ácido aspártico |
| 15 | Polar: | glutamina |
| | | asparaginas |
| | | serina |
| | | treonina |
| | | cisteína |
| 20 | Hidrofóbico: | leucina |
| | | isoleucina |
| | | valina |
| 25 | | prolina |
| | | metionina |
| 30 | Aromático/ heteroaromático: | fenilalanina |
| | | triptófano |
| | | tirosina |
| | | histidina |
| 35 | Pequeño: | glicina |
| | | alanina |

Además de los 20 aminoácidos estándares, los aminoácidos no estándares (tales como 4-hidroxiprolina, 6-N-metil lisina, ácido 2-aminoisobutírico, isovalina y α -metil serina) se pueden sustituir por residuos de aminoácidos de un polipéptido de tipo salvaje. Un número limitado de aminoácidos no conservadores, aminoácidos que no se codifican por el código genético y aminoácidos no naturales se pueden sustituir por residuos de aminoácidos. Los “aminoácidos no naturales” han sido modificados después de la síntesis de proteína y/o tienen una estructura química en sus cadena/s lateral/es diferente de aquella de los aminoácidos estándares. Los aminoácidos no naturales pueden ser sintetizados químicamente, o preferiblemente, están disponibles comercialmente e incluyen ácido pipercolico, ácido tiazolidina carboxílico, dehidroprolina, 3- y 4-metilprolina y 3,3-dimetilprolina. Aminoácidos esenciales en el polipéptido progenitor pueden ser identificados según procedimientos conocidos en la técnica, tal como mutagénesis dirigida al sitio o mutagénesis de barrido de alanina (Cunningham y Wells, *Science* 244: 1081-1085, 1989). En esta última técnica, mutaciones únicas de la alanina se introducen a cada residuo en la molécula, y las moléculas mutantes resultantes se evalúan por su actividad biológica (es decir, actividad de pectato liasa) para identificar residuos de aminoácidos que son críticos para la actividad de la molécula. Véase también, Hilton *et al.*, *J. Biol. Chem.* 271:4699-4708, 1996. El sitio activo de la enzima u otra interacción biológica puede también determinarse por análisis físico de la estructura, como se determina por tales técnicas como resonancia magnética nuclear, cristalografía, difracción electrónica o marcaje por fotoafinidad, conjuntamente con mutación de aminoácidos del sitio de contacto putativo. Véase, por ejemplo, de Vos *et al.*, *Science* 255:306-312, 1992; Smith *et al.*, *J. Mol. Biol.* 224:899-904, 1992; Wlodaver *et al.*, *FEBS Lett.* 309:59-64, 1992. Las identidades de aminoácidos esenciales también pueden ser inferidas de análisis de homología con polipéptidos que están relacionados con un polipéptido según la invención.

Sustituciones de aminoácidos únicas o múltiples pueden ser hechas y evaluadas usando métodos conocidos de mutagénesis, recombinación y/o redistribución, seguido de un procedimiento de selección pertinente, tal como aquellos descritos por Reidhaar-Olson y Sauer (*Science* 241:53-57, 1988), Bowie y Sauer (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:2152-2156, 1989), WO95/17413 o WO 95/22625. Brevemente, estos autores revelan métodos para aleatorizar simultáneamente dos o más posiciones en un polipéptido, o recombinación/redistribución de diferentes mutaciones (WO95/17413, WO95/22625), seguido de selección para funcional un polipéptido, y luego secuenciación de polipéptidos mutagenizados para determinar el espectro de sustituciones admisibles a cada posición. Otros métodos que pueden ser usados incluyen exposición en fago (p. ej., Lowman *et al.*, *Biochem.* 30: 10832-10837, 1991; Ladner *et al.*, patente estadounidense n.º 5.223.409; Huse, WIPO Publication WO 92/06204) y mutagénesis dirigida a la región (Derbyshire *et al.*, *Gene* 46:145, 1986; Ner *et al.*, *DNA* 7:127, 1988).

ES 2 359 381 T3

Métodos de mutagénesis/redistribución pueden ser combinados con métodos de selección automatizados de alto rendimiento para detectar la actividad de polipéptidos clonados y mutagenizados en células huéspedes. Las moléculas de ADN mutagenizadas que codifican polipéptidos activos pueden ser recuperadas de las células huéspedes y rápidamente secuenciadas usando equipos modernos. Estos métodos permiten la determinación rápida de la importancia de
5 residuos de aminoácidos individuales en un polipéptido de interés, y pueden ser aplicados a polipéptidos de estructura desconocida. Usando los métodos mencionados anteriormente, un técnico en la materia puede identificar y/o preparar una variedad de polipéptidos que son sustancialmente homólogos a los residuos 1 a 399 de SEC ID N.º 2 y retener la actividad de pectato liasa de la enzima parental.

10 No obstante, los mismos métodos también son útiles para suministrar las variantes de pectato liasa de la invención con propiedades más ventajosas que la proteína de tipo salvaje. Usando estos métodos, los inventores presentes han identificado varias posiciones en las que la pectato liasa de tipo salvaje de SEC ID NO.º 2 puede ventajosamente ser sustituida para preparar variantes con propiedades mejoradas.

15 Las variantes de pectato liasa preferidas de las invenciones están sustituidas en una o más de las siguientes posiciones (numeración en relación a SEC ID N.º 2): 5, 9, 11, 26, 28, 30, 31, 37, 40, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 54, 61, 64, 68, 69, 70, 71, 74, 75, 76, 79, 86, 87, 91, 99, 105, 106, 107, 111, 115, 116, 118, 122, 123, 134, 136, 139, 140, 141, 146, 148, 156, 158, 170, 182, 185, 186, 189, 193, 194, 196, 199, 201, 202, 204, 213, 215, 218, 224, 228, 229, 234, 235, 237, 251, 256, 257, 258, 272, 277, 286, 295, 298, 301, 302, 303, 305, 307, 308, 314, 316, 323, 324, 326, 331,
20 332, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 349, 356, 357, 363, 366, 378, 381, 384, 386, 387, 389, 390, 391, 393 y 397.

Las variantes preferidas de la presente invención además comprenden variantes en las que la carga global de la enzima ha sido hecha más negativa. En tales variantes, se pueden haber sido sustituido los aminoácidos positivamente
25 cargados y/o se pueden haber introducido aminoácidos negativamente cargados bajo las condiciones de aplicación.

Así, de acuerdo con este documento, las variantes preferidas pueden haber sustituido un residuo de aminoácido que está parcialmente o completamente cargado positivamente bajo condiciones de aplicación, es decir, un His, Lys o un Arg. Además, las variantes preferidas pueden haber sustituido cualquier residuo por un residuo de aminoácido con
30 una carga negativa bajo las condiciones de aplicación, es decir, Asp, Glu, y Tyr.

Las variantes especialmente preferidas son aquellas en las que un residuo de lisina se ha sustituido en una o más de las siguientes posiciones (numeración en relación a SEC ID N.º 2): 26, 47, 54, 59, 71, 79, 87, 90, 99, 100, 115, 118, 139, 148, 213, 218, 247, 257, 263, 265, 274, 314, 317, 334, 386 y 397.
35

Asimismo, las variantes especialmente preferidas son aquellas en las que se ha sustituido un residuo de arginina en una o más de las siguientes posiciones (numeración en relación a SEC ID N.º 2): 38, 110, 112, 120, 155, 206, 217, 272, 279, 282 y 284.

40 Además, las variantes preferidas son también aquellas en el que se ha sustituido un residuo de histidina en una o más de las siguientes posiciones (numeración en relación a SEC ID N.º 2): 5, 31, 193, 198, 221, 222, 243, 245, 269, 270, 289, 376 y 384.

Variantes preferidas de las enzimas de pectato liasa han sido modificadas para cambiar la constante de unión ppr
45 Ca²⁺, mejorando así la estabilidad de depleción de calcio. En una pectato liasa de la presente invención, los tres residuos de aminoácidos D184, D223 y D227 están coordinando la unión de Ca²⁺ al sitio de unión de calcio primario. Por reclutar un cuarto residuo de aminoácido en esta coordinación, es posible cambiar la constante de unión por Ca²⁺. La presencia de Ca²⁺ en el sitio de unión de calcio primario puede influir en el evento catalítico (reduciendo la pKa del residuo catalítico), la alineación del sustrato o determinar si la enzima funciona como una hidrolasa o una liasa
50 (siendo la presencia de Ca²⁺ un prerrequisito para la actividad de liasa). Tales variantes con estabilidad de depleción de calcio mejorada pueden comprender una de las sustituciones Q182D y Q182E.

Otros ejemplos de variantes preferidas son aquellas con estabilidad de oxidación mejorada en las que se ha sustituido un residuo de aminoácido lábil a la oxidación. Por “lábil a la oxidación” se hace referencia a aminoácidos que
55 retienen un grupo hidróxilo o sulfuro, por ejemplo, metionina, cisteína, treonina, serina y tirosina. Variantes preferidas son aquellas en las que se ha sustituido un residuo de aminoácido lábil a la oxidación en una o más de las siguientes posiciones (numeración en relación a SEC ID N.º 2): 64, 122, 199 y 237.

Otros ejemplos de variantes preferidas son aquellas que tienen una sustitución de aminoácido en un residuo flexible,
60 donde se ha introducido un residuo de aminoácido menos flexible. En el presente contexto, el término “flexible” se refiere al número de ángulos phi y psi posibles del átomo C-alfa en el aminoácido. La flexibilidad del esqueleto peptídico se limita por impedimento estérico de los átomos unidos al átomo C-alfa. En general, sólo la cadena lateral de aminoácido difiere de un residuo al otro, así el tamaño de la cadena lateral (el radio Van der Waals) determina la flexibilidad. Una glicina tiene la cadena lateral más pequeña, un átomo de hidrógeno; por lo tanto, un residuo de glicina introduce más flexibilidad. La situación opuesta se aplica para la prolina, donde las conformaciones posibles
65 están limitadas no sólo por una cadena lateral grande sino también debido a la estructura anular. Así, un residuo de prolina es menos flexible que el promedio, y da rigidez y estabilidad al péptido.

ES 2 359 381 T3

Tales variantes menos flexibles incluyen en particular, pero de forma no limitativa, variantes en las que se ha sustituido un residuo de glicina con cualquiera de los otros 19 aminoácidos de origen natural o variantes en las que cualquier aminoácido ha sido sustituido con un residuo de prolina. En variantes especialmente preferidas se ha introducido un residuo de aminoácido menos flexible en una o más de las siguientes regiones (numeración de posiciones en relación a SEC ID N.º 2): 26-31, 45-50, 66-72, 81-89, 90-106, 134-137, 169-178, 210-217, 253-262, 275-286, 297-308, 328-343, 354-356, 361-365, 368-372 y 376-379.

En una forma de realización preferida de la presente invención, la variante de peptato liasa de *Bacillus subtilis* comprende al menos un residuo de aminoácido sustituido seleccionado del grupo que consiste en: H5R, E9G, N11Y, K26Q, S28T, S30F, S30P, S30T, H31N, N37D, Q40E, L45V, G46D, K47N, K47R, D48E, D48P, T49P, N50D, N50L, N50Y, N51Y, T52M, K54V, T61A, M64F, D68*, N69*, L70*, K71*, K71E, G74D, L75A, L75P, N76D, K79A, D86N, K87A, K87E, A91E, K99I, K99N, K99R, T105A, T105P, L106Q, E107K, A111E, K115A, K115I, K115N, K115Q, N116D, K118A, K118E, M122E, M122K, M122N, M122Q, V123I, S134L, T136S, K139E, K139F, K139I, K139M, K139N, K139S, I140V, V141G, V141E, V141L, V141N, Q146F, Q146H, Q146I, Q146V, K148E, K148Q, N156S, E158N, D170N, Q182D, Q182E, N185H, N186H, N189D, H193Y, I194V, I196V, C199N, C199S, F201L, N202K, G204R, K213E, K213N, K213T, F215Y, K218E, K218L, K218P, G224S, A228I, S229T, Y234H, I235V, M237I, F251I, S256C, K257E, K257N, T258I, L286Y, R272C, R272H, R272Y, V277D, G286A, Y295H, S298N, S301Y, S302A, D303S, A305P, S307R, Y308S, K314N, S316F, N323M, V324A, D326N, S331P, S331T, A332P, A333E, K334E, T335S, T335R, I336S, S337C, S337K, S337L, S337R, V338E, V338Y, F339I, S340A, S340K, S340N, S340P, S340Q, G341S, G349R, Q356H, I357V, N363S, S366N, T378G, T378S, A381D, H384N, K386P, K386R, S387A, V389I, I390N, I390T, S391N, A393V y K397D.

Actualmente se contempla que una o más de estas sustituciones ya sea sola o en combinación aumentan la estabilidad de detergente de la variante de peptato liasa cuando se la compara con la enzima parental.

Las sustituciones múltiples preferidas que aumentan la estabilidad de detergente incluyen:

A228I+F251I,
S134L+K257E,
K115I+K213E,
K139I+K213N,
H5R+K257N+S302A,
K99I+I196V,
K115A+K118A,
K115A+K118A+M122N,
V141E+C199S+K213E,
K115I+Q146H,
K71E+K118E,
T49P+N156S,
K314N+S340P,
V141E+I235V,
G46D+K257N,
S28T+S30F+K334E+N363S,
D48E+L106Q+I140V+F215Y+K218E,
H193Y+S256C+V389I+A393V,
E9G+H31N+N50D+L106Q+A111E+T136S+V141L+F201L+N202K+F215Y+G286A+A381D+H384N,
K213N+T258I,
E9G+H31N+L106Q+D303S+A305P+T335S+H384N+S391N,

ES 2 359 381 T3

E9G+H31N+D48E+L106Q+A111E+S301Y+D303S+A305P+T378S+H384N+S391N,

L45V+N50Y+N185H,

5 N11Y+K87E+K99N,

E9G+D48E+L106Q+S318F+A381D,

S30P+K115I+K139I+Q146H+S337C,

10

E9G+H31N+D48E+L106Q+I140V+F215Y+D303S+A305P+T378S+H384N+S391N,

H31N+T105A+L106Q+A111E+V141L+K218E+D303S+A305P+D326N+T335S+H384N+S391N,

15

K26Q+K47N+L106Q+I140V+F215Y+D303S+A305P+T378S+H384N+S391N,

D48E+L106Q+I140V+F215Y+D303S+A305P+T378S+H384N+S391N, K213T+K218L+A305P,

M64F+K213T+K218L+A305P,

20

M64F+M122K+K118E+K213T+K218L+A305P,

K139I+Q146H+K257N+S337C,

25

M64F+K139I+Q146H+S337C,

K139I+Q146H+S337C y

D48P+M64F+T105P+K139I+Q146H+K213T+K218P+ T258I+A305P+S331P+S337K.

30

Producción de proteínas

Los polipéptidos de la presente invención, incluidas las proteínas en toda su longitud, los fragmentos de las mismas y las proteínas de fusión, se pueden producir en células huéspedes creadas genéticamente según técnicas convencionales. Células huésped adecuadas son aquellos tipos de células que pueden transformarse o transfectarse con ADN exógeno y desarrollarse en cultivo, e incluyen células bacterianas, fúngicas y células eucarióticas superiores cultivadas. Se prefieren las células eucarióticas, particularmente células cultivadas de organismos multicelulares. Se prefieren especialmente las células gram-positivas del género de *Bacillus*, tales como *B. licheniformis*, *B. lentus*, *B. brevis*, *B. stearothermophilus*, *B. alkalophilus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. coagulans*, *B. circulans*, *B. lautus*, *B. thuringiensis*, *B. agaradherens*, o en particular *B. subtilis*.

Técnicas para manipular moléculas de ADN clonadas e introducir ADN exógeno en una variedad de células huéspedes son descritas por Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989; Ausubel *et al.* (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Inc., NY, 1987; y (*Bacillus subtilis* and Other Gram-Positive Bacteria, Sonensheim *et al.*, 1993, American Society for Microbiology, Washington D.C.).

En general, una secuencia de ADN que codifica una peptidasa de la presente invención está vinculada operativamente a otros elementos genéticos requeridos para su expresión, incluyendo generalmente un promotor y un terminador dentro de un vector de expresión. El vector también contendrá comúnmente uno o más marcadores seleccionables y uno o más orígenes de replicación, aunque los expertos en la técnica reconocerán que dentro de ciertos sistemas los marcadores seleccionables pueden proporcionarse en vectores separados y la replicación del ADN exógeno puede proporcionarse mediante integración en el genoma de la célula huésped. La selección de promotores, terminadores, marcadores seleccionables, vectores y otros elementos es un asunto de diseño habitual dentro del nivel de la experiencia normal en la técnica. Muchos de tales elementos se describen en la literatura y están disponibles a través de suministradores comerciales.

Para dirigir un polipéptido a la ruta secretora de una célula huésped, una secuencia de señal secretora (también conocida como una secuencia líder, preprosecuencia o prosecuencia) se proporciona en el vector de expresión. La secuencia de señal secretora puede ser la de polipéptidos o puede derivarse de otra proteína secretada o sintetizarse de *novo*. Numerosas secuencias de señal secretora se conocen en la técnica y se hace referencia a *Bacillus subtilis* y otras bacterias gram-positivas, Sonensheim *et al.*, 1993, (American Society for Microbiology, Washington D.C.) y Cutting, S. M.(eds.) "Molecular Biological Methods for Bacillus", (John Wiley e hijos, 1990) para mayor descripción de secuencias de señal secretora adecuadas especialmente para la secreción en una célula huésped de *Bacillus*. La secuencia señal secretora se une a la secuencia de ADN en el marco de lectura correcto. Las secuencias de señal secretora están situadas comúnmente 5' con respecto a la secuencia de ADN que codifica el polipéptido de interés, aunque ciertas secuencias de señal secretora pueden situarse en cualquier parte de la secuencia de DNA de interés (véase, por ejemplo, Welch *et al.*, patente estadounidense n.º 5.037.743; Holland *et al.*, patente estadounidense n.º

5.143.830). Las células huéspedes transformadas o transfectadas se cultivan según procedimientos convencionales en un medio de cultivo que contiene nutrientes y otros componentes requeridos para el crecimiento de las células huéspedes elegidas. Una variedad de medios adecuados, incluidos medios definidos y medios complejos, se conocen en la técnica e incluyen generalmente una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, aminoácidos esenciales, vitaminas y minerales. Los medios también pueden contener componentes tales como factores de crecimiento o suero, según sea necesario. El medio de crecimiento se seleccionará generalmente con respecto a células que contienen el ADN exógenamente añadido mediante, por ejemplo, selección con fármacos o deficiencia en un nutriente esencial, que está complementado por el marcador seleccionable transportado en el vector de expresión o cotransfectado en la célula huésped.

La fermentación se puede realizar por cultivo de la célula huésped bajo condiciones aeróbicas en un medio nutritivo que contiene fuentes de nitrógeno y carbono junto con otros nutrientes esenciales, estando compuesto el medio conforme a los principios de la técnica conocida. El medio puede ser un medio rico complejo o un medio mínimo. La fuente de nitrógeno puede ser de naturaleza orgánica y/o inorgánica. Las fuentes de nitrógeno inorgánicas adecuadas son nitratos y sales amónicas. Entre las fuentes de nitrógeno orgánico, un número significativo se usa regularmente en las fermentaciones. Ejemplos son harina de soja, caseína, maíz, licor de maíz fermentado, extracto de levadura, úrea y albúmina. Fuentes de carbono adecuadas son carbohidratos o carbohidrato que contiene materiales. Preferiblemente, el medio nutritivo contiene pectato, ácido poligalacturónico y/o pectina esterificada a un grado inferior o superior como fuente de carbono y/o inductor de producción de pectinasa. Alternativamente, el medio contiene un material rico en pectina tal como harina de soja, pulpa de manzana o cáscara cítrica.

El cultivo preferiblemente puede ser conducido a valores de pH alcalino tal como al menos pH 8 o al menos pH 9, que se puede obtener por adición de tampones adecuados tal como carbonato de sodio o mezclas de carbonato de sodio y bicarbonato sódico después de la esterilización del medio de crecimiento.

Aislamiento de proteínas

Cuando el polipéptido expresado recombinante se segrega, el polipéptido se puede purificar de los medios de crecimiento. Preferiblemente, las células huéspedes de expresión se eliminan de los medios antes de la purificación del polipéptido (p. ej. por centrifugado).

Cuando el polipéptido expresado recombinante no es segregado de la célula huésped, la célula huésped es preferiblemente interrumpida y el polipéptido librado en un "extracto" acuoso que es la primera fase de tales técnicas de purificación. Preferiblemente, las células huéspedes de expresión se eliminan de los medios antes de la rotura celular (p. ej. por centrifugado).

La rotura celular se puede realizar por técnicas convencionales como por digestión de lisozima o forzando las células a través de alta presión. Véase (Robert K. S. Cobes, Protein Purification, Second edition, Springer-Verlag) para obtener una mayor descripción de tales técnicas de rotura celular.

Ya sea que los polipéptidos recombinantes expresados (o polipéptidos quiméricos) sean segregados o no, pueden ser purificados usando fraccionamiento y/o métodos de purificación y medios convencionales.

La precipitación de sulfato amónico y ácido o extracción caotrópica se puede utilizar para el fraccionamiento de muestras. Pasos de purificación ejemplares pueden incluir hidroxapatita, exclusión por tamaño, FPLC y cromatografía en fase líquida de fase inversa de alto rendimiento. Los medios de intercambio de aniones adecuados incluyen dextranas derivatizadas, agarosa, celulosa, poliacrilamida, sílices de especialidad y similares. Se prefieren particularmente los derivados de DEAE, QAE y Q con Fast-Flow Sepharose (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). Medios cromatográficos ejemplares incluyen aquellos medios derivatizados con fenilo, butilo o grupos de octilo, tal como Phenyl-Sepharose FF (Pharmacia), Toyopearl butyl 650 (Toso Haas, Montgomeryville, PA), Octyl-Sepharose (Pharmacia) y similares; o resinas poliacrílicas, tal como Amberchrom CG 71 (Toso Haas) y similares. Soportes sólidos adecuados incluyen perlas de vidrio, resinas basadas en sílice, resinas celulósicas, perlas de agarosa, perlas de agarosa reticulada, perlas de poliestireno, resinas de poliacrilamida reticulada y similares que son insolubles bajo las condiciones en las que deben ser usadas. Estos soportes se pueden modificar con grupos reactivos que permiten fijación de proteínas por grupos amino, grupos carboxilo, grupos sulfhidril, grupos hidróxilo y/o fracciones de carbohidrato. Ejemplos de químicas de acoplamiento incluyen activación de bromuro cianógeno, activación de N-hidroxisuccinimida, activación epóxida, activación de sulfhidrilo, activación de hidracida y carboxilo y derivados de amino para químicas de acoplamiento de carbodiimida. Estos y otros medios sólidos se conocen y son muy usados en la técnica, y están disponibles de proveedores comerciales.

La selección de un método particular es un materia de diseño de rutina y es en parte determinada por las propiedades del soporte elegido. Véase, por ejemplo, cromatografía de afinidad: Principles & Methods, Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Suecia, 1988.

Los polipéptidos de la invención o los fragmentos de los mismos también pueden ser preparados a través de síntesis química. Los polipéptidos de la invención pueden ser monómeros o multímeros; no glicosilados o glicosilados; pegilados o no pegilados; y pueden o pueden no incluir un residuo de aminoácido de metionina inicial.

ES 2 359 381 T3

Por consiguiente, en otro aspecto, la presente invención también se refiere a un método para producir la preparación enzimática de la invención, el método que comprende el cultivo de un microorganismo capaz de producir la variante de pectato liasa bajo condiciones que permitan la producción de la enzima y recuperar la enzima del cultivo. El cultivo puede ser realizado usando técnicas de fermentación convencionales, por ejemplo, el cultivo en matraces de agitación o fermentadores con agitación para asegurar aireación suficiente en un medio de crecimiento que induzca la producción de la variante de pectato liasa. El medio de crecimiento puede contener una fuente N convencional, tal como peptona, extracto de levadura o ácidos de casamino, una cantidad reducida de una fuente C convencional tal como dextrosa o sacarosa, y un inductor tal como pectato o pectina o sustratos de planta compuestos tales como salvado de cereal (p. ej., salvado de trigo o cáscara de arroz). La recuperación puede ser realizada usando técnicas convencionales, por ejemplo, separación de biomasa y sobrenadante por centrifugado o filtración, recuperación del sobrenadante o rotura de células si la enzima de interés es intracelular, quizás seguido de otra purificación como se describe en EP 0 406 314 o por cristalización como se describe en WO 97/15660.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a una variante de pectato liasa aislada con las propiedades anteriormente descritas y que está libre de impurezas homólogas y es producida usando técnicas convencionales recombinantes.

Métodos y Usos

Ensayo de microtitulación para cuantificación de actividad de pectato liasa

La pectato liasa corta el ácido poligalacturónico a través de un mecanismo de transeliminación. Esto significa que deja un doble enlace C-C para cada división de sustrato. Este enlace absorbe a 235 nm permitiendo la detección directa de la acción de pectato liasa en ácido poligalacturónico soluble midiendo la absorbencia en esa longitud de onda.

Se diluye una muestra enzimática en tampón de ensayo (100 mM Tris-HCl, 0,68 mM CaCl₂, pH 8,0) a una concentración entre 5 y 100 ng/ml. Si la muestra enzimática contiene detergente, debe ser diluida al menos un 1000 veces respecto al detergente. 100 µl de la dilución de tampón enzimática se mezcla con 100 µl sustrato (1% (p/v) ácido poligalacturónico de Sigma, P-3850, agitado en tampón de ensayo durante al menos 15 min y centrifugado durante 5 min a 2300 g, sobrenadante es usado.) en una placa de calentamiento y calentado a 40°C durante 10 min. en un bloque de calentamiento, preferiblemente una máquina de PCR o equipo de exactitud y velocidades de calentamiento equivalentes.

100 µl solución de sustrato/enzima se mezcla con 100 µl reactivo de parada (50 mM H₃ PO₄) en una placa de microtitulación transparente de UV. La placa UV se agita brevemente y suavemente, y se mide la absorbencia a 235 nm en un espectrómetro de microtitulación (Molecular Devices, Spectra-MAX 190). Las lecturas de absorbencia se corrigen en cuanto a la absorbencia de antecedentes substrayendo la absorbencia de una muestra de control, realizada sin enzima adicionada, a todos los valores medidos.

Una curva estándar basada en la actividad de la pectato liasa de SEC ID N.º 2 (de *Bacillus subtilis* depositado como IFO 3134) fue lineal entre 2,5 y 100 ng/ml enzima en la mezcla reactiva:

| Dosis enzimática (ng/ml) | Absorbencia a 235 nm (AU), sustraído del fondo |
|--------------------------|--|
| 0 | 0,00 |
| 2,5 | 0,03 |
| 5 | 0,07 |
| 10 | 0,16 |
| 15 | 0,26 |
| 25 | 0,42 |
| 50 | 0,85 |
| 100 | 1,83 |

Alternativamente, la actividad catalítica de pectato liasa se puede determinar por el ensayo de viscosidad, APSU.

Ensayo de viscosidad, APSU

Unidades APSU: El ensayo APSU mide el cambio en viscosidad de una solución de ácido poligalacturónico en ausencia de iones de calcio adicionados.

ES 2 359 381 T3

Un 5% p/v de solución de poligalacturonato de sodio (Sigma P-1879) se solubiliza en 0,1 M tampón de glicina, pH 10, 4 ml de esta solución se preincuba durante 5 min a 40 grados Celsius. Luego, se agregan 250 microlitros del enzimático (o dilución enzimática), después de lo cual la reacción se mezcla durante 10 seg en un mezclador a la velocidad máxima y es incubada durante 20 min a 40 grados Celsius o a otra temperatura.

La viscosidad se mide usando un viscosímetro MIVI 600 (Sofrasen, 45700 Villemandeur, Francia). La viscosidad se mide como mV después de 10 seg. Para el cálculo de unidades APSU, se usa la siguiente curva estándar:

| | | | | | | | | | |
|---------|------|------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| APSU/ml | 0,00 | 4,00 | 9,00 | 14,00 | 19,00 | 24,00 | 34,00 | 49,00 | 99,00 |
| mV | 300 | 276 | 249 | 227 | 206 | 188 | 177 | 163 | 168 |

Uso en la industria de detergentes

En otros aspectos, la presente invención se refiere a una composición de detergente que comprende la variante de pectato liasa o preparación de variante de pectato liasa de la invención, y a un proceso para el tratamiento de tejidos que comprende el tratamiento de tejidos durante un ciclo de lavado de un proceso de lavado de máquina con una solución de lavado que contiene la variante de pectato liasa o la preparación de la variante de pectato liasa de la invención.

Típicamente, la composición de detergente de la invención comprende ingredientes convencionales tales como tensioactivos, (aniónico, no iónico zwitteriónico, anfotérico), constructores y otros ingredientes, por ejemplo, como se describe en WO 97/016291.

Uso en las industrias de tratamiento de fibras celulósica y textiles

La variante de pectato liasa de la presente invención se puede usar en combinación con otras enzimas degradadoras de carbohidratos (por ejemplo, hemicelulasas, tales como arabinanasa, xiloglucanasa, mananasa y pectinasa) para biopreparación de fibras o para limpieza de fibras en combinación con detergentes. Las fibras de algodón consisten en una capa de pared celular primaria con pectina y una capa secundaria con celulosa principalmente. Bajo preparación de algodón o refinando el algodón, parte de la pared celular será eliminada. La presente invención se refiere a cualquiera de las ayudas durante el refinando de algodón por eliminación de la pared celular primaria, o durante la limpieza del algodón para eliminar sustancias pécticas residuales y prevenir que la tela se torne de color gris.

En el contexto presente, el término "material celulósico" se destina a significar fibras, tejidos cosidos y tejidos no cosidos, incluidos géneros de punto, tejidos, telas vaqueras, hilados y toalla, hechos de algodón, mezclas de algodón o derivados celulósicos naturales o artificiales (p. ej. originados de fibras celulósicas con xilano tales como de pulpa de madera) o mezclas de los mismos. Ejemplos de mezclas son mezclas de algodón o rayón/viscosa con uno o varios materiales acompañantes tales como lana, fibras sintéticas (p. ej. fibras de poliamida, fibras acrílicas, fibras de poliéster, fibras de polivinil alcohol, fibras de polivinil cloruro, fibras de cloruro de polivinilideno, fibras de poliuretano, fibras de poliurea, fibras de aramida) y fibras con celulosa (p. ej. rayón/viscosa, ramio, cáñamo, lino/tela de lino, yute, fibras de acetato de celulosa, liocel).

La preparación de la presente invención es útil en la industria de tratamiento de fibra celulósica para el pretratamiento o enriada de fibras de cáñamo, lino.

El procesamiento de material celulósico para la industria textil, como por ejemplo fibra de algodón, en un material preparado para la producción de prendas de vestir implica diferentes fases: hilatura de la fibra en un hilo; construcción de tejido tejido o de punto hecho a partir del hilado y operaciones posteriores de preparación, tinte y de acabado. Los productos tejidos se construyen tejiendo un hilo de trama entre una serie de hilos de urdimbre; los hilos podrían ser de dos tipos diferentes. Los productos de punto son construidos formando una red de bucles entrecruzados de una longitud continua de hilo. Las fibras celulósicas pueden también ser usadas para tejido no tejido.

El proceso de la preparación prepara el textil para la respuesta apropiada en operaciones de coloración. Las sub-fases implicadas en la preparación son

a. Desencolado (para productos tejidos) usando cola polimérica como por ejemplo almidón, CMC o PVA se añade antes del entretejido para aumentar la velocidad de urdimbre. Este material debe ser eliminado antes del tratamiento posterior.

b. Descrudado, el objetivo del cual es eliminar el material no celulósico de la fibra de algodón, especialmente, la cutícula (que consiste principalmente en ceras) y la pared celular primaria (que consiste principalmente en pectina, proteína y xiloglucano). Es necesaria una eliminación de cera apropiada para obtener una alta humectabilidad, siendo ésta una medida para obtener un buen tinte. La eliminación de la pared celular primaria -especialmente las pectinas- mejora la eliminación de cera y asegura un tinte más uniforme. Además, mejora la blancura en el proceso de blanqueamiento. El químico principal usado en el descrudado es hidróxido sódico en altas concentraciones, hasta 70 g/kg de algodón y a temperaturas altas, 80-95 grados Celsius; y

ES 2 359 381 T3

c. Blanqueamiento; normalmente, el descrudado es seguido por un blanqueo usando peróxido de hidrógeno como el agente oxidante en orden a obtener un tejido completamente blanqueado (blanco) o para asegurar un matiz limpio del colorante.

5 En la industria también se utiliza proceso combinado de descrudado/blanqueo en un paso. Aunque los procesos de preparación son más frecuentemente empleados en el estado del tejido; el descrudado, el blanqueamiento y las operaciones de tinte también pueden realizarse en la fase de la fibra o el hilo.

10 El régimen del procesamiento puede ser bien discontinuo o continuo con el tejido siendo contactado por la corriente del procesamiento líquido en forma de anchura abierta o de cuerda. Las operaciones continuas generalmente usan un saturador por lo cual un peso aproximadamente igual de baño químico por peso de tejido se aplica al tejido, seguido de una cámara de reposo calentada donde se desarrolla la reacción química. Una sección de lavado luego prepara el tejido para la siguiente fase de tratamiento. El procesamiento discontinuo generalmente se desarrolla en un baño de procesamiento por el cual el tejido se contacta con aproximadamente 8-15 veces su peso en baño químico. Después de 15 un periodo de reacción, los productos químicos son drenados, el tejido es enjuagado y el siguiente químico es aplicado. El procesamiento pad-batch (tintura semi-continua) implica un saturador por el cual un peso aproximadamente igual de baño químico por peso de tejido se aplica al tejido, seguido de un periodo de reposo que en el caso de pad-batch frío puede ser uno o más días.

20 Productos tejidos son la forma predominante de construcción de tejidos textiles. El proceso de tejedura requiere un “encolado” del hilo de urdimbre para protegerlo de la abrasión. Almidón, alcohol polivinílico (PVA), carboximetilcelulosa, ceras y ligantes acrílicos son ejemplos de productos químicos de encolado típicos usados debido a su disponibilidad y coste. La cola debe ser eliminada después del proceso de tejedura como la primera etapa de la preparación de los productos tejidos. El tejido encolado bien en forma de cuerda o de anchura abierta se pone en contacto con 25 el líquido del procesamiento que contiene los agentes de desencolado. El agente de desencolado empleado depende del tipo de cola que deba ser eliminada. Para colas de PVA, se usa frecuentemente agua caliente o procesos oxidantes. El agente de encolado más común para tejido de algodón se basa en almidón. Por lo tanto, muy a menudo, los tejidos de algodón tejidos se desencolan por una combinación de agua caliente, la enzima α -amilasa para hidrolizar el almidón y un agente humectante o surfactante. Se deja reposar el material celulósico con los productos químicos del desencolado 30 durante un “periodo de permanencia” suficientemente largo para realizar el desencolado. El periodo de permanencia es dependiente del tipo de régimen de procesamiento y la temperatura y puede variar de 15 minutos a 2 horas, o en algunos casos, varios días. Típicamente, los productos químicos de desencolado se aplican en un baño saturador que generalmente varía de aproximadamente 15°C a aproximadamente 55 grados Celsius. El tejido es luego mantenido en un equipamiento tal como un “J-box” que proporciona calor suficiente, normalmente entre aproximadamente 55 35 grados Celsius y aproximadamente 100 grados Celsius, para aumentar la actividad de los agentes de desencolado. Los productos químicos, incluyendo los agentes del encolado eliminados, son lavados del tejido después de la finalización del periodo de permanencia. Para asegurar una blancura elevada o una buena humectabilidad y teñibilidad resultante, los productos químicos de la cola y otros productos químicos aplicados deben ser íntegramente eliminados. Es generalmente creído que un desencolado eficaz es de importancia crucial para los procesos de preparación siguientes: 40 descrudado y blanqueamiento.

El proceso del descrudado elimina muchos de los compuestos no celulósicos encontrados en el algodón de forma natural. Además de las impurezas naturales no celulósicas, el descrudado puede eliminar la suciedad, manchas y materiales residuales introducidos en la fabricación tales como lubricantes de hilatura, enconado o corte. El proceso de 45 descrudado emplea hidróxido sódico o agentes de causticación relacionados tales como carbonato de sodio, hidróxido potásico o mezclas derivadas. Generalmente, un surfactante alcali estable se añade al proceso para mejorar la solubilización de compuestos hidrofóbicos y/o prevenir su redepósito en el tejido. El tratamiento está generalmente a una alta temperatura, 80°C-100°C, utilizando soluciones fuertemente alcalinas, pH 13-14, del agente de descrudado. Debido a la naturaleza no específica de los procesos químicos no sólo las impurezas sino la celulosa misma es atacada, 50 conduciendo a daños en la resistencia u otras propiedades del tejido deseables. La suavidad del tejido celulósico es una función de ceras de algodón naturales residuales. La naturaleza no específica del proceso de descrudado fuertemente alcalino de alta temperatura no puede discriminar entre los lubricantes de algodón naturales deseables y los lubricantes introducidos en la fabricación. Además, el proceso de descrudado convencional puede causar problemas medioambientales debido al efluente altamente alcalino de estos procesos. La fase del descrudado prepara el tejido 55 para la respuesta óptima en el blanqueo. Un tejido descrudado de forma poco adecuada necesitará un nivel más alto de blanqueador químico en las fases de blanqueo posteriores. La fase de blanqueo decolora los pigmentos naturales del algodón y elimina cualquier componente impuro del algodón fibroso residual natural no eliminado completamente durante el desmotado, el cardado o el descrudado. El principal proceso en uso actualmente es un blanqueador de peróxido de hidrógeno alcalino. En muchos casos, especialmente cuando no se necesita una blancura altísima, el blanqueo 60 se puede combinar con el descrudado.

En los ejemplos a continuación se demuestra que el paso de descrudado puede llevarse a cabo usando la pectato liasa o preparación de pectato liasa de la presente invención a una temperatura de aproximadamente 50-80°C y un pH de aproximadamente 7-11, sustituyendo o suplementando así los agentes altamente caustificantes. Un proceso 65 enzimático optimizado asegura una alta eliminación de pectina y humectabilidad completa.

Degradación o modificación de material vegetal

La enzima o la preparación enzimática según la invención se usan preferiblemente como un agente para la degradación o la modificación de paredes celulares vegetales o cualquier material con pectina originado de paredes celulares vegetales debido a la alta actividad de degradación de la pared celular vegetal de la variante de pectato liasa de la invención.

La variante de pectato liasa de la presente invención puede ser utilizado sola o junto con otras enzimas como glucanasas, pectinasas y/o hemicelulasas para mejorar la extracción de aceite de material vegetal rico de aceite, como aceite de soja de semillas de soja, aceite de aceituna de aceitunas o aceite de semilla de colza de semilla de colza o aceite de girasol de girasol.

La variante de pectato liasa de la presente invención puede ser utilizada para la separación de componentes de materiales de célula vegetal. Resulta de interés particular la separación de azúcar o material vegetal rico en almidón en componentes de interés comercial considerable (como sacarosa de remolacha azucarera o almidón de patata) y componentes de poco interés (como pulpa y fracciones de cáscara). También, resulta de interés particular la separación de brotes ricos en aceite o ricos en proteína en fracciones de cáscara invaluable y valiosas proteínas y aceite. El proceso de separación puede ser realizado usando métodos conocidos en la técnica.

La variante de pectato liasa de la invención puede también usarse en la preparación de fruta o zumo vegetal para aumentar el rendimiento, y en la hidrólisis enzimática de varios materiales derivados de la pared celular vegetal o materiales de desperdicio, por ejemplo, la producción de vino o zumo, o residuos agrícolas tales como cáscaras vegetales, cáscaras de vainas, pulpa de remolacha azucarera, pulpa de aceituna, pulpa de patata y similares.

El material vegetal se puede degradar para mejorar diferentes tipos de tratamiento, facilitar la purificación o la extracción de otro componente además de los galactanos como purificación de pectinas de cítrico, mejorar el valor de pienso, reducir la capacidad enlazante del agua, mejorar la degradabilidad en plantas de aguas residuales, mejorar la conversión de material vegetal a ensilaje, etc.

Mediante una preparación enzimática de la invención, es posible regular la consistencia y la apariencia de frutas o verdura procesadas. Se ha demostrado que la consistencia y la apariencia son producto de la combinación real de enzimas usadas para el tratamiento, es decir, la especificidad de las enzimas con las que se combina la variante de pectato liasa de la invención. Ejemplos incluyen la producción de zumo claro, por ejemplo, de manzanas, peras o bayas; zumo estable turbio por ejemplo de manzanas, peras, bayas, cítricos o tomates; y purés, por ejemplo, de zanahorias y tomates.

La variante de pectato liasa de la invención se puede utilizar en la modificación de la viscosidad de material derivado de pared celular vegetal. Por ejemplo, la variante de pectato liasa se puede utilizar para reducir la viscosidad de pienso con galactano y para promover el tratamiento de material con galactano viscoso. La reducción de la viscosidad puede obtenerse tratando el material vegetal con galactano con una preparación enzimática de la invención bajo condiciones adecuadas para la degradación parcial o completa del material con galactano.

La variante de pectato liasa se puede usar, por ejemplo, en combinación con otras enzimas para la eliminación de sustancias pécticas de fibras vegetales. Esta eliminación es esencial, por ejemplo, en la producción de fibras textiles u otros materiales celulósicos. Para este propósito, el material de fibra vegetal se trata con una cantidad adecuada de la pectato liasa de la invención bajo condiciones adecuadas para obtener degradación parcial o completa de sustancias pécticas asociadas al material de fibra vegetal.

Aditivo de pienso

Las variantes de pectato liasa de la presente invención se pueden utilizar para la modificación de pienso para animales y pueden ejercer su efecto *in vitro* (modificando componentes del pienso) o *in vivo*. La variante de pectato liasa es particularmente adecuada para la adición a composiciones de pienso para animales con cantidades altas de arabinogalactanos o galactanos, por ejemplo, pienso que contiene material vegetal de soja, semilla de colza, lupin, etc. Cuando se agrega al pienso, la variante de pectato liasa mejora significativamente la descomposición *in vivo* de material de pared celular vegetal, por lo que se consigue una mejor utilización de los nutrientes de la planta por parte del animal. Así, se mejora el índice de crecimiento y/o relación de conversión de pienso (es decir, el peso de pienso ingerido en relación al aumento de peso) del animal. Por ejemplo, el galactano indigerible se degrada por pectato liasa, por ejemplo, en combinación con beta-galactosidasa, a galactosa o galacto oligómeros que son digeribles por el animal y así contribuyen a la energía disponible del pienso. También, por la degradación de galactano, la pectato liasa puede mejorar la digestibilidad y la ingesta de ingredientes de pienso que no son carbohidratos tales como proteína, grasa y minerales.

Para mayor descripción, se hace referencia a PCT/DK 96/00443 y un ejemplo práctico aquí.

ES 2 359 381 T3

Tratamiento de vino y zumo

La enzima o la preparación enzimática de la invención se puede utilizar para despectinización y la reducción de viscosidad en zumo de frutas o vegetales, especialmente, en zumo de manzana o pera. Este puede realizarse tratando la fruta o zumo vegetal con una preparación enzimática de la invención en una cantidad eficaz para degradar material con pectina contenido en la fruta o zumo vegetal.

La enzima o preparación enzimática se puede utilizar en el tratamiento de trituración de frutas y verduras para mejorar el extractabilidad o degradabilidad de la trituración. Por ejemplo, la preparación enzimática puede ser utilizada en el tratamiento de trituración de manzanas y peras para la producción de zumo, y en el tratamiento de trituración de uvas para la producción de vino.

La aplicabilidad de variantes de pectato liasa con estabilidad de detergente mejorada se aprecia siempre que las variantes se usan en un entorno que comprende tensioactivos.

Descripción de detergentes y ejemplos

Sistema de tensioactivo

Las composiciones detergentes según la presente invención comprenden un sistema tensioactivo, caracterizado por el hecho de que el tensioactivo se puede seleccionar de tensioactivos aniónicos y/o no iónicos y/o catiónicos y/o anfólicos y/o zwitteriónicos y/o semipolares.

El tensioactivo está típicamente presente a un nivel de 0,1% al 60% en peso.

El tensioactivo es preferiblemente formulado para ser compatible con componentes enzimáticos presentes en la composición. En composiciones de gel o líquido, el tensioactivo es formulado de forma más preferible de manera que promueve, o al menos no degrada, la estabilidad de ninguna enzima en estas composiciones.

Los sistemas preferidos para ser usados según la presente invención comprenden como un tensioactivo uno o más de los tensioactivos aniónicos y/o no iónicos descritos aquí.

Condensados de polietileno, polipropileno y óxido de polibutileno de alquilfenoles son adecuados para el uso como el tensioactivo no iónico de los sistemas tensioactivos de la presente invención, siendo preferidos los condensados de óxido de polietileno. Estos compuestos incluyen los productos de condensación de alquilfenoles con un grupo alquilo que contiene de aproximadamente 6 a aproximadamente 14 átomos de carbono, preferiblemente de aproximadamente 8 a sobre 14 átomos de carbono, en una configuración de cadena lineal o cadena ramificada con el óxido alquileo. En una forma de realización preferida, el óxido de etileno está presente en una cantidad igual a de aproximadamente 2 a aproximadamente 25 moles, más preferiblemente de aproximadamente 3 a aproximadamente 15 moles, de óxido de etileno por mol de alquil-fenol. Agentes tensioactivos no iónicos disponibles comercialmente de este tipo incluyen Igepal™ CO-630, comercializados por la Corporación GAF; y Triton™ X-45, X-114, X-100 y X-102, todos comercializados por la Rohm & Haas Company. Estos tensioactivos son comúnmente denominados alcoxilatos de alquilfenol (p. ej., etoxilatos de alquil-fenol).

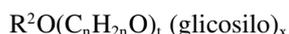
Los productos de condensación de alcoholes alifáticos primarios y secundarios con aproximadamente 1 a aproximadamente 25 moles de óxido de etileno son adecuados para uso como el tensioactivo no iónico de los sistemas tensioactivos no iónico de la presente invención. La cadena de alquilo del alcohol alifático puede bien ser recto o ramificado, secundario o primario, y contiene generalmente de aproximadamente 8 a aproximadamente 22 átomos de carbono. Se prefieren especialmente los productos de alcoholes con grupo alquilo que contiene aproximadamente 8 a aproximadamente 20 átomos de carbono, más preferiblemente de aproximadamente 10 a aproximadamente 18 átomos de carbono, con aproximadamente 2 a aproximadamente 10 moles de óxido de etileno por mol de alcohol. Aproximadamente 2 a aproximadamente 7 moles de óxido de etileno y de forma más preferible de 2 a 5 moles de óxido de etileno por mol de alcohol están presentes en dichos productos de condensación. Ejemplos de tensioactivos no iónicos de este tipo que pueden obtenerse comercialmente son Tergitol® 5-S-9 (producto de condensación de un alcohol C₁₁-C₁₅ secundario lineal con 9 moles de óxido de etileno), Tergitol® 24-L-NMW (producto de condensación de un alcohol C₁₂-C₁₄ primario lineal con 6 moles de óxido de etileno en el caso de una distribución de pesos molares estrecha), ambos comercializados por Union Carbide Corporation; Neodol™ 45-9 (el producto de la condensación de C₁₄-C₁₅ alcohol lineal con 9 moles de óxido de etileno), Neodol™ 23-6.5 (el producto de la condensación de C₁₂-C₁₃ alcohol lineal con 3,0 moles de óxido de etileno), Neodol™ 45-7 (el producto de la condensación de alcohol C₁₄-C₁₅ lineal con 7 moles de óxido de etileno), Neodol™ 45-5 (el producto de la condensación de alcohol C₁₄-C₁₅ lineal con 5 moles de óxido de etileno), comercializada por Shell Chemical Company, Kyro™ EOB (el producto de condensación de alcohol C₁₃-C₁₅ con 9 moles de óxido de etileno) comercializado por The Procter & Gamble Company y Genapol LA 050 (el producto de la condensación de alcohol C₁₂-C₁₄ con 5 moles de óxido de etileno), comercializado por Hoechst. La gama preferida de HLB en estos productos es de 8 a 11 y más preferidas de 8 a 10.

También son útiles como el tensioactivo no iónico de los sistemas tensioactivos de la presente invención los alquilpolisacáridos descritos en US 4.565.647, con un grupo hidrofóbico que contiene de aproximadamente 6 a aproximadamente 30 átomos de carbono, preferiblemente de aproximadamente 10 a aproximadamente 16 átomos de carbono

ES 2 359 381 T3

5 y un polisacárido, por ejemplo una poliglucosida, grupo hidrofílico conteniendo de aproximadamente 1,3 a aproximadamente 10, preferiblemente de aproximadamente 1,3 a aproximadamente 3, de forma más preferible de aproximadamente 1,3 a aproximadamente 2,7 unidades de sacáridos. Puede usarse cualquier sacárido reductor que contenga 5 o 6 átomos de carbono, por ejemplo, glucosa, galactosa y fracciones de galactosil pueden ser sustituidas por las fracciones glucosilicas (opcionalmente, el grupo hidrófobo está unido en las posiciones 2, 3, 4, etc., dando así una glucosa o galactosa a diferencia de un glucósido o galactósido). Los enlaces intersacáridos pueden estar, por ejemplo, entre la posición uno de las unidades de sacárido adicionales y las posiciones 2, 3, 4 y/o 6 en las unidades de sacárido precedentes.

10 Los alquilpoliglucósidos preferidos tienen la fórmula

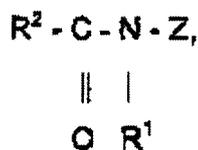


15 donde R² es seleccionado del grupo que consiste en alquilo, alquilfenilo, hidroxialquilo, hidroxialquilfenilo, y sus mezclas derivadas en las que los grupos alquilo contienen de aproximadamente 10 a aproximadamente 18, preferiblemente de aproximadamente 12 a aproximadamente 14 átomos de carbono; n es 2 o 3, preferiblemente 2; t es de 0 a aproximadamente 10, preferiblemente 0; y x es de aproximadamente 1,3 a aproximadamente 10, preferiblemente de aproximadamente 1,3 a aproximadamente 3, de forma más preferible de aproximadamente 1,3 a aproximadamente 2,7. El glicosilo se deriva preferiblemente de la glucosa. Para preparar estos compuestos, se forma primero el alcohol o alcohol de alquilpolietoxi y entonces reacciona con la glucosa, o con una fuente de glucosa para formar el glucósido (unión a la posición 1). Las unidades adicionales de glicosilo pueden entonces unirse entre su posición 1 y las unidades de glicosilo precedentes de las posiciones 2, 3, 4 y/o 6, preferiblemente en su mayoría la posición 2.

25 Los productos de condensación de óxido de etileno con una base hidrofóbica formada por la condensación del óxido de propileno con glicol de propileno son también adecuados para el uso como sistemas tensioactivos no iónicos adicionales de la presente invención. La parte hidrófoba de estos compuestos presenta preferiblemente un peso molecular entre aproximadamente 1500 y aproximadamente 1800. La adición de fracciones de polioxietileno a esta parte hidrofóbica tiende a aumentar la solubilidad en agua de la molécula en conjunto, y el carácter líquido del producto se retiene hasta el punto en el cual el contenido de polioxietileno es aproximadamente 50% del peso total del producto de condensación, que corresponde a la condensación con hasta aproximadamente 40 moles de óxido de etileno. Ejemplos de compuestos de este tipo incluyen determinados tensioactivos disponible comercialmente de PluronicTM, comercializados por BASF.

35 También son adecuados para el uso como el tensioactivo no iónico del sistema tensioactivo no iónico de la presente invención, los productos de condensación de óxido de etileno con el producto que resultan de la reacción de óxido de propileno y etilenodiamina. La fracción hidrófoba de estos compuestos está constituida por el producto de reacción de etilendiamina con óxido de propileno en exceso y presenta en general un peso molecular de aproximadamente 2500 a 3000. Esta fracción hidrofóbica se condensa con óxido de etileno en la medida en que el producto de condensación contiene de aproximadamente 40% a aproximadamente 80% en peso de polioxietileno y tiene un peso molecular de de aproximadamente 5.000 a aproximadamente 11.000. Ejemplos de este tipo de tensioactivo no iónico incluyen determinados compuestos disponible comercialmente a TetricTM, comercializados por BASF.

45 Se prefieren para el uso como el tensioactivo no iónico de los sistemas tensioactivos de la presente invención condensados de óxido de polietileno de alquil-fenoles, productos de condensación de alcoholes alifáticos secundarios y primarios con de aproximadamente 1 a aproximadamente 25 moles de óxido de etileno, alquilpolisacáridos, y mezclas de los mismos. Los más preferidos son etoxilatos de alquil-fenol C₈-C₁₄ con de 3 a 15 grupos etoxi y etoxilatos de alcohol C₈-C₁₈ (preferiblemente C₁₀ avg.) que tienen de 2 a 10 grupos etoxi, y sus mezclas derivadas. Agentes tensioactivos no iónicos altamente preferidos son tensioactivos de amida de ácido graso de polihidroxi de la fórmula:



60 donde R¹ es H, o R¹ es hidrocarbilo C₁-C₄, 2-hidroxietilo, 2-hidroxipropilo, o una mezcla de ellos, R² es hidrocarbilo C₅-C₃₁ y z es un polihidroxihidrocarbilo que tiene una cadena de hidrocarbilo lineal con 3 hidroxilos, por lo menos, conectados directamente a dicha cadena, o un derivado alcoxilado del mismo. Preferiblemente, R¹ es metilo, R² es cadena recta de alquilo de C₁₁₋₁₅ o alquilo C₁₆₋₁₈ o alquenilo tal como alquilo de coco o mezclas derivadas, y Z se deriva de una azúcar de reducción tal como glucosa, fructosa, maltosa o lactosa, en una reacción de aminación reductiva.

ES 2 359 381 T3

Tensioactivos aniónicos altamente preferidos incluyen tensioactivos de sulfato de alquilo alcoxlado. Ejemplos de los mismos son sales hidrosolubles o ácidos de la fórmula $RO(A)_mSO_3M$ donde R es un alquilo o grupo de hidroxialquilo $C_{10}-C_{24}$ no sustituido con un componente de alquilo $C_{10}-C_{24}$, preferiblemente un alquilo o hidroxialquilo $C_{12}-C_{20}$, más preferiblemente alquilo o hidroxialquilo $C_{12}-C_{18}$, A es un etoxi o unidad de propoxi, m es mayor que 5
5 cero, típicamente entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 6, más preferiblemente entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 3, y M es H o un catión que puede ser, por ejemplo, un catión metálico (p. ej., sodio, potasio, litio, calcio, magnesio, etc.), amonio o catión de amonio sustituido. Se contemplan aquí los sulfatos de alquilo etoxilado al igual que sulfatos alquilo propoxilados. Ejemplos específicos de cationes de amonio sustituidos son cationes de metil, dimetil, trimetilamonio y amonio cuaternario como cationes de tetrametilamonio y dimetilpiperidinio, así como aque-
10 llos que se derivan de alquilaminas como etilamina, dietilamina, trietilamina o mezclas de las mismas, y similares. Tensioactivos ejemplares son alquil polietoxilato $C_{12}-C_{18}$ (1.0) sulfato ($C_{12}-C_{18}$ E(1.0)M), alquil polietoxilato $C_{12}-C_{18}$ (2.25) sulfato ($C_{12}-C_{18}$ (2.25)M), y alquil polietoxilato $C_{12}-C_{18}$ (3.0) sulfato ($C_{12}-C_{18}$ E(3.0)M), y alquil polietoxilato $C_{12}-C_{18}$ (4.0) sulfato ($C_{12}-C_{18}$ E(4.0)M), donde M es convenientemente seleccionado de sodio y potasio.

15 Tensioactivos aniónicos adecuados para ser usados son surfactivos sulfonato de éster alquílico incluidos ésteres lineales de ácidos carboxílicos C_8-C_{20} (es decir, ácidos grasos) que se sulfonatan con SO_3 gaseoso según "The Journal of the American Oil Chemists Society", 52 (1975), págs. 323-329. Materias primas adecuadas incluyen sustancias grasas naturales como las derivadas de sebo, aceite de palma, etc.

20 El tensioactivo sulfonato de éster alquílico preferido, especialmente para aplicaciones de lavandería, comprende surfactivos sulfonato de éster alquílico de la fórmula estructural:



25 donde R^3 es un hidrocarbilo C_8-C_{20} , preferiblemente un alquilo, o combinación de los mismos, R^4 es un hidrocarbilo C_1-C_6 , preferiblemente un alquilo, o combinación de los mismos y M es un catión que forma una sal hidrosoluble con el sulfonato de éster alquílico. Cationes de formación de sal adecuados incluyen metales tales como sodio, potasio y litio, y cationes de amonio no sustituidos o sustituidos, tal como monoetanolamina, dietanolamina y trietanolamina. Preferiblemente, R^3 es alquilo $C_{10}-C_{16}$, y R^4 es metilo, etilo o isopropilo. Especialmente se prefieren los sulfonatos de éster metílico donde R^3 es alquilo $C_{10}-C_{16}$.
30

Otros tensioactivos aniónicos adecuados incluyen los tensioactivos de sulfato de alquilo que son sales hidrosolubles o ácidos de la fórmula $ROSO_3M$ donde R es preferiblemente un hidrocarbilo $C_{10}-C_{24}$, preferiblemente un alquilo o hidroxialquilo con un componente de alquilo $C_{10}-C_{20}$, más preferiblemente un alquilo o hidroxialquilo $C_{12}-C_{18}$, y M es H o un catión, por ejemplo, un catión de metal alcalino (p. ej. sodio, potasio, litio), o amonio o amonio sustituido (p. ej., de metilo de dimetil, y cationes de amonio de trimetil y cationes de amonio cuaternarios tal como tetrametil-
45 amonio y cationes de piperidinio de dimetil y cationes de amonio cuaternarios derivados de alquilaminas tal como etilamina, dietilamina, trietilamina, y sus mezclas derivadas, y similares). Típicamente, se prefieren las cadenas de alquilo de $C_{12}-C_{16}$ para temperaturas de lavado inferiores (p. ej. por debajo de aproximadamente 50°C) y se prefieren cadenas de alquilo $C_{16}-C_{18}$ para temperaturas de lavado más altas (p. ej. por encima de aproximadamente 50°C).
50

Otros tensioactivos aniónicos útiles para objetivos deteritivos pueden también ser incluidos en las composiciones detergentes de lavado de la presente invención. Estos puede incluir sales (incluidas, por ejemplo, sodio, potasio, amonio y sales amónicas sustituidas tal como mono-di- y sales de trietanolamina) de jabón, alcanosulfonatos C_8-C_{22} secundarios o primarios, olefinsulfonatos C_8-C_{24} , ácidos policarboxílicos sulfonatados preparados por sulfonación del producto pirolizado de citratos de metal alcalinotérreo, por ejemplo, como se describe en la descripción de la patente
55 británica n.º 1.082.179, alquilpoliglicoletersulfatos C_8-C_{24} (conteniendo hasta 10 moles de etileno óxido); sulfonatos de alquilo glicerol, sulfonatos de glicerol de acilos grasos, sulfatos de oleil glicerol graso, sulfatos de éter de óxido de etileno de fenol de alquilo, sulfonatos de parafina, alquil fosfatos, isetionatos tal como los isetionatos de acilo, n-acil tauratos, alquil succinamatos y sulfosuccinatos, monoésteres de sulfosuccinatos (especialmente monoésteres $C_{12}-C_{18}$ insaturados y saturados) y diésteres de sulfosuccinatos (especialmente diésteres C_6-C_{12} insaturados y saturados), acil-sarcosinatos, sulfatos de alquilpolisacáridos tal como los sulfatos de alquilpoliglucósidos (los compuestos no iónico no sulfatados que están descritos abajo) alquilsulfatos primarios ramificados y alquilpolietoxicarboxilatos como los de
60 fórmula $RO(CH_2CH_2O)_k-CH_2COO^-M^+$ en la que R es alquilo C_8 a C_{22} , K es un número entero de 1 a 10, y M es un catión de formación de sal soluble. Los ácidos resínicos y los ácidos resínicos hidrogenados también son adecuados, tal como colofonia, colofonia hidrogenada, y ácidos resínicos y ácidos resínicos hidrogenados presentes en o derivados de aceite de resina.

ES 2 359 381 T3

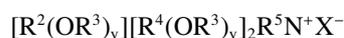
Los alquilbenceno sulfonatos son especialmente preferidos. Especialmente preferidos son los alquilbenceno sulfonatos lineales (cadena linear) (LAS) donde el grupo alquilo contiene preferiblemente de 10 a 18 átomos de carbono.

Otros ejemplos están descritos en "Surface Active Agents and Detergents" (Vol. I y II por Schwartz, Perry y Berch). Una variedad de tales tensioactivos son también descritos en general en US 3.929.678, (columna 23, línea 58 hasta la columna 29, línea 23).

Cuando se las incluye, las composiciones detergentes de lavado de la presente invención típicamente comprenden de aproximadamente 1% a sobre 40%, preferiblemente de aproximadamente 3% a sobre 20% en peso de tales tensioactivos aniónicos.

Las composiciones detergentes de lavado de la presente invención también pueden contener tensioactivos catiónicos, anfólicicos, zwitteriónicos y semipolares, al igual que los tensioactivos aniónicos y/o no iónicos aparte de los ya descritos aquí.

Los tensioactivos detergentes catiónicos adecuados para uso en las composiciones de detergente de lavado de la presente invención son aquellas con un grupo de hidrocarbilo de cadena larga. Ejemplos de tales tensioactivos catiónicos incluyen los tensioactivos de amonio tal como halogenuros de alquiltrimetilamonio, y aquellos tensioactivos con la fórmula:



donde R^2 es un grupo de alquilo o de alquilbencilo con aproximadamente 8 a aproximadamente 18 átomos de carbono en la cadena de alquilo, cada R^3 es seleccionado del grupo que consiste en $-CH_2CH_2-$, $-CH_2CH(CH_3)-$, $CH_2CH(CH_2OH)-$, $-CH_2CH_2CH_2-$, y sus mezclas derivadas; cada R^4 es seleccionado del grupo que consiste en hidroxialquilo C_1-C_4 , C_1-C_4 , estructuras de anillo de bencilo formadas juntando los dos grupos R^4 , $-CH_2CHOHCHOHCOR_6CHOHCH_2OH$, donde R^6 es cualquier hexosa o polímero de hexosa con un peso molecular inferior a aproximadamente 1000, e hidrógeno cuando y no es 0; R^5 es igual que R^4 o es una cadena de alquilo, en la cual el número total de átomos de carbono o R^2 más R^5 no es más que aproximadamente 18; cada y es de 0 a aproximadamente 10, y la suma de los valores de y es de 0 a aproximadamente 15 y X es cualquier anión compatible.

Los tensioactivos catiónicos altamente preferido son los compuestos de amonio cuaternarios solubles en agua útiles en la presente composición con la fórmula:



en la cual R_1 es alquilo C_8-C_{16} , cada uno de R_2 , R_3 y R_4 es independientemente alquilo C_1-C_4 , hidroxialquilo C_1-C_4 , bencilo y $-(C_2H_4)_xH$ donde x tiene un valor de 2 a 5, y X es un anión. No más de uno de R_2 , R_3 o R_4 debería ser bencilo.

La longitud de cadena de alquilo preferida para R_1 es $C_{12}-C_{15}$, particularmente donde el grupo alquilo es una mezcla de longitudes de cadena derivada de grasa de avellana de palma o coco o se deriva sintéticamente por olefina desarrollan o síntesis de alcoholes OXO.

Grupos preferidos para R_2 , R_3 y R_4 son grupos metilo e hidroxietilo y el anión X se puede seleccionar de haluro, metosulfato, acetato y iones de fosfato.

Ejemplos de compuestos de amonio cuaternarios adecuados de fórmulas (i) para el uso aquí son:

bromuro o cloruro de amonio de trimetil de coco;

bromuro o cloruro de amonio metil dihidroxietilo de coco;

decil trietil cloruro de amonio;

bromuro o cloruro de amonio decil dimetil hidroxietilo;

bromuro o cloruro de amonihidroxietil dimetil C_{12-15} ;

bromuro o cloruro de amonio dimetil hidroxietilo;

miristil trimetil amonio metil sulfato;

bromuro o cloruro de amonio lauril dimetil bencil;

ES 2 359 381 T3

cloruro de amonio o bromuro lauril dimetil (etenoxi)⁴;

ésteres de colina (compuestos de fórmula (i) en la cual R₁ es

5



10

di-alquilo imidazolinas [compuestos de fórmula (i)].

15

Otros tensioactivos catiónicos útiles aquí son también descritos en US 4.228,044 y en EP 0 000 224.

Cuando son incluidas, las composiciones de detergente de lavado de la presente invención típicamente comprenden de 0,2% a sobre 25%, preferiblemente de aproximadamente 1% a aproximadamente 8% en peso de tales tensioactivos catiónicos.

20

Los tensioactivos anfólicicos son también adecuados para uso en las composiciones de detergente de lavado de la presente invención. Estos tensioactivos pueden ser ampliamente descritos como derivados alifáticos de aminas secundarias o terciarias, o derivados alifáticos de aminas heterocíclicas secundarias y terciarias en las que el radical alifático puede ser de cadena ramificada o recta. Uno de los sustituyentes alifáticos contiene al menos aproximadamente 8 átomos de carbono, típicamente de aproximadamente 8 a sobre 18 átomos de carbono, y al menos uno contiene un grupo subilizante en agua aniónica, por ejemplo carboxi, sulfonato, sulfato. Véase US 3.929.678 (columna 19, líneas 18-35) para ejemplos de tensioactivos anfólicicos.

25

30

Cuando están incluidas, las composiciones de detergente de lavado de la presente invención típicamente comprenden de 0,2% a aproximadamente 15%, preferiblemente de aproximadamente 1% a aproximadamente 10% en peso de tales tensioactivos anfólicicos.

35

Los surfactivos bipolares también son adecuados para uso en composiciones de detergente de lavado. Estos tensioactivos pueden ser aproximadamente descritos como derivados de aminas secundarias y terciarias, derivados de aminas heterocíclicas secundarias y terciarias, o derivados de amonio cuaternario, fosfonio cuaternario o compuestos de sulfonio terciario. Véase US 3.929.678 (columna 19, línea 38 hasta la columna 22, línea 48) para ejemplos de surfactivos bipolares.

40

Cuando están incluidas, las composiciones de detergente de lavado de la presente invención típicamente comprenden de 0,2% a aproximadamente 15%, preferiblemente de aproximadamente 1% a aproximadamente 10% en peso de tales surfactivos bipolares.

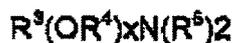
45

Agentes tensioactivos no iónicos semipolares son una categoría especial de agentes tensioactivos no iónicos que incluyen óxidos de amina hidrosolubles que contienen una fracción de alquilo de aproximadamente 10 a aproximadamente 18 átomos de carbono y 2 fracciones seleccionadas del grupo que consiste en grupos alquilo y grupos de hidroxialquilo que contienen de aproximadamente 1 a aproximadamente 3 átomos de carbono; óxidos de fosfina hidrosolubles que contienen una fracción de alquilo de aproximadamente 10 a aproximadamente 18 átomos de carbono y 2 fracciones seleccionadas del grupo que consiste en grupos alquilo y grupos de hidroxialquilo que contienen de aproximadamente 1 a aproximadamente 3 átomos de carbono; y sulfóxidos hidrosolubles que contienen una fracción de alquilo de aproximadamente 10 a aproximadamente 18 átomos de carbono y una fracción seleccionada del grupo que consiste en fracciones de alquilo e hidroxialquilo de aproximadamente 1 a aproximadamente 3 átomos de carbono.

50

Tensioactivos de detergente semipolares no iónicos incluyen los tensioactivos óxido de amina con la fórmula:

55



60

donde R³ es un alquilo, hidroxialquilo, o grupo alquil-fenil o mezclas derivadas que contienen de aproximadamente 8 a aproximadamente 22 átomos de carbono; R⁴ es un grupo de alquilenos o hidroxialquilenos que contiene de aproximadamente 2 a aproximadamente 3 átomos de carbono o mezclas derivadas; x es de 0 a aproximadamente 3; y cada R⁵ es un grupo de alquilo o hidroxialquilo que contiene de aproximadamente 1 a aproximadamente 3 átomos de carbono o un grupo de óxido de polietileno que contiene de aproximadamente 1 a aproximadamente 3 grupos de óxido de etileno. Los grupos de R⁵ se pueden unir uno a otro, por ejemplo, a través de un átomo de oxígeno o nitrógeno, para formar una estructura anular.

65

ES 2 359 381 T3

Estos tensioactivos de óxido de amina en particular incluyen óxidos de alquil dimetil amina C₁₀-C₁₈ y C₈-C₁₂ óxidos de amina etil dihidroxi alcoxi etilo.

5 Cuando están incluidas, las composiciones de detergente de lavado de la presente invención típicamente comprenden de 0,2% a aproximadamente 15%, preferiblemente de aproximadamente 1% a aproximadamente 10% en peso de tales agentes tensioactivos no iónicos semipolares.

Sistema constructor

10 Las composiciones según la presente invención pueden comprender además un sistema constructor. Cualquier sistema constructor convencional es conveniente para ser usado aquí incluyendo materiales de aluminosilicato, silicatos, policarboxilatos y ácidos grasos, materiales como tetraacetato de etilendiamina, secuestrantes de metales iónicos como aminopolifosfonatos, particularmente ácido fosfónico de tetrametileno de etilendiamina y ácido pentametileno fosfónico de dietilentriamina. Aunque son menos preferidos para cuestiones medioambientales obvias, los constructores de fosfato también pueden ser usados aquí.

Constructores adecuados pueden ser un material de intercambio iónico inorgánico, comúnmente un material de aluminosilicato hidratado inorgánico, más particularmente una zeolita sintética hidratada como zeolita hidratada A, X, B, HS o MAP.

20 Otro material de constructor adecuado inorgánico es silicato estratificado, por ejemplo, SKS-6 (Hoechst). SKS-6 es un cristalino silicato estratificado que consiste en silicato sódico (Na₂Si₂O₅).

Los policarboxilatos adecuados que contienen un grupo carboxi incluyen ácido láctico, ácido glicólico y derivados de éter de los mismos como se describe en las patentes belgas n.º 831.368, 821.369 y 821.370. Los policarboxilatos que contienen dos grupos carboxi incluyen las sales hidrosolubles de ácido succínico, ácido malónico, ácido (etileno-dioxi) diacético, ácido maleico, ácido diglicólico, ácido tartárico, ácido tartrónico y ácido fumárico, al igual que los carboxilatos de éter descritos en publicación de patente alemana 2.446.686, y 2.446.487, 3.935.257 y los sulfinil carboxilatos descritos en la patente belga n.º 840.623. Los policarboxilatos que contienen tres grupos carboxi incluyen, en particular, citratos, aconitratos y citraconatos solubles en agua, así como derivados de succinatos como los carbomimetiloxisuccinatos descritos en la patente británica n.º 1.379.421, lactoxisuccinatos descritos en la patente británica n.º 1.389.732 y aminosuccinatos descritos en la solicitud holandesa 7205873 y los materiales de oxipolicarboxilatos como los 2-oxa-1,1,3-propano-tricarboxilatos descritos en la patente británica n.º 1.387.447.

35 Los policarboxilatos que contienen cuatro grupos carboxi incluyen los oxidisuccinatos descritos en la patente británica n.º 1.261.829, 1,1,2,2-etano-tetracarboxilatos, 1,1,3,3-propano-tetracarboxilatos. Los policarboxilatos que contienen sustituyentes sulfo incluyen los derivados de sulfosuccinatos descritos en las patentes británicas n.º 1.398.421 y 1.398.422 y la patente estadounidense n.º 3.936.448 y los citratos pirolizados sulfonados descritos en la patente británica n.º 1.082.179, mientras que los policarboxilatos que contienen sustituyentes de fosfona están descritos en la patente británica n.º 1.439.000.

40 Los policarboxilatos alicíclicos y heterocíclicos incluyen ciclopentano-cis,cis,cis-tetracarboxilatos, ciclopentadieno-pentacarboxilatos, 2,3,4,5-tetrahidrofurano-cis,cis,cis-tetracarboxilatos, 2,5-tetrahidrofurano-cis-dicarboxilatos, 2,2,5,5-tetrahidrofurano-tetracarboxilatos, 1,2,3,4,5,6-hexano-hexacarboxilatos y derivados carboximetílicos de alcoholes polihidroxilados como sorbitol, manitol y xilitol. Los policarboxilatos aromáticos incluyen ácido melítico, ácido piromelítico y los derivados de ácido ftálico descritos en la patente británica n.º 1.425.343.

De los anteriores, los policarboxilatos preferidos son hidroxicarboxilatos que contienen hasta tres grupos carboxi por molécula, más particularmente citratos.

50 Los sistemas constructores preferidos para uso en las presentes composiciones incluyen una mezcla de un constructor de aluminosilicato insoluble en agua como zeolita A o de un silicato estratificado (SKS-6), y un agente quelante de carboxilato hidrosoluble tal como ácido cítrico.

55 Un quelante adecuado para inclusión en las composiciones de detergente conforme a la invención es ácido etilendiamina N,N' disuccinico (EDDS) o el metal alcalino, metal alcalinotérreo, amonio, o sales amónicas sustituidas de los mismos, o mezclas derivadas. Los compuestos de EDDS preferidos son la forma ácida libre y el sodio o sal magnésica de la misma. Ejemplos de tales sales sódicas preferidas de EDDS incluyen Na₂ EDDS y Na₄ EDDS. Ejemplos de tales sales magnésicas preferidas de EDDS incluyen MgEDDS y Mg₂ EDDS. Las sales magnésicas son las más preferidas para la inclusión en composiciones conforme a la invención.

Los sistemas de constructor preferidos incluyen una mezcla de un constructor de aluminosilicato insoluble en agua tal como zeolita A y un agente quelante de carboxilato soluble en agua como ácido cítrico.

65 Otros materiales de constructor que pueden formar parte del sistema constructor para uso en composiciones granuladas incluyen materiales inorgánicos como carbonatos de metal alcalino, bicarbonatos, silicatos y materiales orgánicos como los fosfonatos orgánicos, polialquileno fosfonatos de amino y policarboxilatos de amino.

ES 2 359 381 T3

Otras sales orgánicas hidrosolubles adecuadas son el homo- o ácidos co-poliméricos o sus sales, en las que el ácido policarboxílico comprende al menos dos radicales de carboxilo separados uno de otro por no más de dos átomos de carbono.

5 Los polímeros de este tipo están descritos en GB-A-1.596.756. Ejemplos de tales sales son poliácridatos de MW 2000-5000 y sus copolímeros con anhídrido maléico, tales copolímeros con un peso molecular de de 20.000 a 70.000, especialmente, aproximadamente 40.000.

Las sales de constructor de detergencia son normalmente incluidas en cantidades de de 5% a 80% en peso de la composición. Los niveles preferidos de constructor para detergentes líquidos son de 5% a 30%.

Enzimas

15 Las composiciones detergentes preferidas, además de la preparación de pectato liasa de la invención, comprenden otra/s enzima/s que proporciona/n ventajas de rendimiento de limpieza y/o cuidado del tejido. Conforme a la presente invención, las enzimas adicionales se pueden modificar para mejorar la oxidación y la estabilidad de depleción de calcio.

20 Tales enzimas incluyen proteasas, lipasas, cutinasas, amilasas, celulasas, peroxidasas, oxidasas (p. ej. lacasas), hemicelulasas, como mananasas, xilanasas, galactanasas, arabinofuranosidasas, esterases, liquenasas, arabinanasas y otras pectato liasas.

25 *Proteasas:* Puede utilizarse cualquier proteasa adecuada para uso en soluciones alcalinas. Las proteasas adecuadas incluyen aquellas de origen animal, vegetal o microbiano. Se prefiere el origen microbiano. Están incluidos los mutantes modificados química o genéticamente. La proteasa puede ser una serina proteasa, preferiblemente una proteasa microbiana N alcalina o una proteasa de tipo tripsina. Ejemplos de proteasas alcalinas son subtilisinas, especialmente las derivadas de Bacillus, por ejemplo, subtilisina Novo, subtilisina Carlsberg, subtilisina 147 y subtilisina 168 (descrita en WO 89/06279). Ejemplos de proteasas de tipo tripsina son tripsina (p. ej. de origen bovino o porcino) y la Proteasa de fusarium descrita en WO 89/06270.

30 Las enzimas proteásicas preferidas disponibles comercialmente incluyen aquellas vendidas bajo los nombres comerciales Alcalase, Savinase, Primase, Durazym, y Esperase de Novo Nordisk A/S (Deinamarca), las vendidas bajo el nombre comercial Maxatase, Maxacal, Maxapem, Properase, Purafect y Purafect OXP de Genencor International, y las vendidas bajo el nombre comercial Opticlean y Optimase por Solvay Enzymes. Las enzimas proteásicas se pueden incorporar en las composiciones conforme a la invención a un nivel de de 0,00001% a 2% de proteína enzimática en peso de la composición, preferiblemente, a un nivel de de 0,0001% a 1% de proteína enzimática en peso de la composición, más preferiblemente a un nivel de de 0,001% a 0,5% de proteína enzimática en peso de la composición, incluso más preferiblemente a un nivel de 0,01% a 0,2% de proteína enzimática en peso de la composición.

40 *Lipasas:* Se puede utilizar cualquier lipasa adecuada para uso en soluciones alcalinas. Las lipasas adecuadas incluyen aquellas de origen fúngico o bacteriano. Están incluidos los mutantes modificados química o genéticamente.

45 Ejemplos de lipasas útiles incluyen una lipasa de *Humicola lanuginosa*, p. ej. como se describe en EP 258 068 y EP 305 216; una lipasa de *Rhizomucor miehei*, p. ej. como se describe en EP 238 023, una lipasa de Candida, tal como un lipasa de *C. antarctica*, por ejemplo, la lipasa de *C. antarctica* A o B descrita en EP 214 761, una Lipasa de pseudomonas tal como un lipasa de alcaligenes y *P. pseudoalcaligenes*, por ejemplo, como se describe en EP 218 272, una lipasa de *P. cepacia*, por ejemplo, como se describe en EP 331 376, una lipasa *P. stutzeri*, por ejemplo, como se describe en GB 1.372.034, una lipasa de *P. fluorescens*, una lipasa de *Bacillus*, por ejemplo, una lipasa de *B. subtili* (Dartois *et al.*, (1993), Biochemica et Biophysica acta 1131, 253-260), una lipasa de *B. stearothermophilus* (JP 64/744992) y una lipasa de *B. pumilus* (WO 91/16422).

55 Además, varias lipasas clonadas pueden ser útiles, incluidas la lipasa *P.enicillium camembertii* descrita por Yamaguchi *et al.*, (1991), Gene 103, 61-67), la lipasa de *Geotricum candidum* (Schimada, Y. *et al.*, (1989), J. Biochem., 106, 383-388), y varias lipasas *Rhizopus* como una lipasa *R. delemar* (Hass, M.J *et al.*, (1991), Gene 109, 117-113), una lipasa *R. niveus* (Kugimiia *et al.*, (1992), Bio Sci. Biotech. Biochem. 56, 716-719) y una lipasa *R. oryzae*.

Otros tipos de enzimas lipolíticas como cutinasas también pueden ser útiles, por ejemplo, una cutinasa derivadas de *Pseudomonas mendocina* como se describe en WO 88/09367, o una cutinasa derivada de *Fusarium solani pisi* (p. ej. descrita en WO 90/09446).

60 Las ipasas especialmente adecuadas son lipasas como M1 Lipase™, Luma fast™ y Lipomax™ (Genencor), Lipolase™ y Lipolase Ultra™ (Novo Nordisk A/S), y Lipase P “Amano” (Amano Pharmaceutical Co. Ltd.).

65 Las lipasas son normalmente incorporadas en la composición de detergente a un nivel de de 0,00001% a 2% de proteína enzimática en peso de la composición, preferiblemente a un nivel de de 0,0001% a 1% de proteína enzimática en peso de la composición, más preferiblemente a un nivel de 0,001% a 0,5% de proteína enzimática en peso de la composición, incluso más preferiblemente a un nivel de 0,01% a 0,2% de proteína enzimática en peso de la composición.

ES 2 359 381 T3

Amilasas: se puede utilizar cualquier amilasa (alfa y/o beta) adecuada para uso en soluciones alcalinas. Amilasas adecuadas incluyen aquellas de origen fúngico o bacteriano. Están incluidos los mutantes modificados química o genéticamente. Las amilasas incluyen, por ejemplo, alfa-amilasas obtenidas de una cepa especial de *B. licheniformis*, descritas en más detalle en GB 1.296.839. Las amilasas disponibles comercialmente Duramyl™, Termamyl™, Fungamyl™ y BAN™ (disponibles de Novo Nordisk A/S) y Rapidase™, Maxamyl P™, Purastar™ y Purastar OxAm™ (disponibles de Genencor). Además, es adecuada una amilasa con más que 70% de homología a SP707 (Tsukamoto, A. *et al*, 1988. Biochem. B iophys. Res. C ommun. 1 51:25) o K 38 (Kao Corp. E P1022334)”.
5

Las amilasas son normalmente incorporadas en la composición de detergente a un nivel de 0,00001% a 2% de proteína enzimática en peso de la composición, preferiblemente a un nivel de 0,0001% a 1% de proteína enzimática en peso de la composición, más preferiblemente a un nivel de 0,001% a 0,5% de proteína enzimática en peso de la composición, incluso más preferiblemente a un nivel de 0,01% a 0,2% de proteína enzimática en peso de la composición.
10

Celulasas: Puede utilizarse cualquier celulasa adecuada para uso en soluciones alcalinas. Las celulasas adecuadas incluyen aquellas de origen fúngico o bacteriano. Están incluidos los mutantes modificados química o genéticamente. Las celulasas adecuadas son descritas en US 4.435.307, que divulga celulasas fúngicas producidas de *Humicola insolens*. Las celulasas especialmente adecuadas son las celulasas con ventajas de cuidados del color. Ejemplos de tales celulasas son las celulasas descritas en la solicitud de patente europea n.º 0 495 257.
15
20

Las celulasas disponibles comercialmente incluyen Celluzyme™ producido por una cepa de *Humicola insolens*, (Novo Nordisk A/S), y KAC-500(B)™ (Kao Corporation).
25

Las celulasas normalmente son incorporadas en la composición de detergente a un nivel de 0,00001% a 2% de proteína enzimática en peso de la composición, preferiblemente a un nivel de 0,0001% a 1% de proteína enzimática en peso de la composición, más preferiblemente a un nivel de 0,001% a 0,5% de proteína enzimática en peso de la composición, incluso más preferiblemente a un nivel de 0,01% a 0,2% de proteína enzimática en peso de la composición.
30

Peroxidasas/oxidadas: las enzimas de peroxidasa se usan en combinación con peróxido de hidrógeno o una fuente del mismo (p. ej. un percarbonato, perborato o persulfato). Las enzimas oxidadas se usan en combinación con oxígeno. Ambos tipos de enzimas se usan para “blanqueamiento de solución”, es decir, para prevenir transferencia de un tinte textil de un tejido teñido a otro tejido cuando dichos tejidos son lavados juntos en una solución de lavado, preferiblemente junto con un intensificador como se describe en, por ejemplo, WO 94/12621 y WO 95/01426. Las peroxidasas/oxidadas adecuadas incluyen aquellas de origen fúngico, bacteriano o vegetal. Están incluidos los mutantes modificados química o genéticamente.
35

Las enzimas peroxidasas y/o oxidadas son normalmente incorporadas en la composición de detergente a un nivel de 0,00001% a 2% de proteína enzimática en peso de la composición, preferiblemente a un nivel de 0,0001% a 1% de proteína enzimática en peso de la composición, más preferiblemente a un nivel de 0,001% a 0,5% de proteína enzimática en peso de la composición, incluso más preferiblemente a un nivel de 0,01% a 0,2% de proteína enzimática en peso de la composición.
40

Pectato liasas: las pectato liasas han sido clonadas de distintos géneros bacterianos como *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Klebsiella* y *Xanthomonas*. También se ha descrito la clonación de una pectato liasa a partir de *Bacillus subtilis* (Nassen *et al.* (1993) FEBS 335:319-326) y *Bacillus sp.* YA-14 (Kim *et al.* (1994) Biosci. Biotech. Biochem. 58:947-949).
45

Las pectato liasas son generalmente caracterizadas por un pH alcalino óptimo y un requisito absoluto de cationes bivalentes, siendo Ca²⁺ el más estimulador.
50

Las mezclas de las enzimas anteriormente mencionadas son incluidas aquí, en particular, una mezcla de una proteasa, una amilasa, una lipasa y/o una celulasa.
55

La pectato liasa de la invención, o cualquier otra enzima incorporada en la composición de detergente, es normalmente incorporada en la composición de detergente a un nivel de 0,00001% a 2% de proteína enzimática en peso de la composición, preferiblemente a un nivel de 0,0001% a 1% de proteína enzimática en peso de la composición, más preferiblemente a un nivel de 0,001% a 0,5% de proteína enzimática en peso de la composición, incluso más preferiblemente a un nivel de 0,01% a 0,2% de proteína enzimática en peso de la composición.
60

Blanqueadores: los ingredientes de detergente adicionales opcionales que se pueden incluir en las composiciones detergentes de la presente invención incluyen blanqueadores como PB1, PB4 y percarbonato con un tamaño de partícula de 400-800 micras. Estos componentes blanqueadores pueden incluir uno o más blanqueadores de oxígeno y, dependiendo del blanqueador elegido, uno o más activadores de blanqueamiento. En caso de estar presentes, los compuestos blanqueadores de oxígeno típicamente estarán presentes en niveles de aproximadamente 1% a aproximadamente 25%. En general, los compuestos blanqueadores son componentes agregados opcionales en formulaciones de no líquidas, por ejemplo detergentes granulados.
65

ES 2 359 381 T3

El componente blanqueador para usar aquí puede ser cualquiera de los blanqueadores útiles para composiciones detergentes incluidos blanqueamientos con oxígeno al igual que otros conocidos en la técnica.

El blanqueador adecuado para la presente invención puede ser un blanqueador activado o no activado.

Una categoría de blanqueador con oxígeno que puede ser usado incluye blanqueadores de ácido percarboxílico y sales derivadas. Ejemplos adecuados de esta clase de agentes incluyen hexahidrato de monoperoxifalato de magnesio, la sal magnésica de ácido meta-cloro perbenzoico, ácido 4-nonilamino-4-oxoperoxibutírico y ácido diperoxidodecenedioico. Los blanqueadores son descritos en US 4.483.781, US 740.446, EP 0 133 354 y US 4.412.934. Los blanqueadores altamente preferidos también incluyen ácido 6-nonilamino-6-oxoperoxicaproyico como se describe en US 4.634.551.

Otra categoría de blanqueadores que puede ser usada comprende los blanqueadores halogenados. Ejemplos de blanqueadores de hipohalita, por ejemplo, incluyen ácido isocianúrico de tricloro y dicloroisocianuratos de sodio y de potasio y alcano sulfonamidas de N-cloro y N-bromo. Tales materiales son normalmente adicionados a 0,5-10% en peso del producto acabado, preferiblemente 1-5% en peso.

Los agentes de liberación de peróxido de hidrógeno se pueden usar en combinación con activadores de blanqueo como tetraacetililenodiamina (TAED) nonanoiloxibencenosulfonato (NOBS, descrito en US 4.412.934), 3,5-trimetil-hexanoloxibencenosulfonato (ISONOBS, descrito en EP 120 591) o pentaacetilglucosa (PAG), que se perhidroliza para formar un perácido como las especies de blanqueamiento activas, conduciendo a efecto blanqueador mejorado. Además, son muy adecuados los activadores de blanqueo C8(6-octanamido-caproyil) oxibenceno-sulfonato, C9(6-nonanamido caproyil) oxibencenosulfonato y C10 (6-decanamido caproyil) oxibencenosulfonato o mezclas derivadas. También son activadores adecuados los ésteres de citrato acilado como los descritos en solicitud de patente europea n.º 91870207.7.

Blanqueadores útiles, incluidos peroxiácidos y sistemas blanqueantes que comprenden activadores de blanqueo y compuestos blanqueantes de peroxígeno para el uso en composiciones de limpieza según la invención son descritos en la solicitud USSN 08/136.626 (WO 95/27772).

El peróxido de hidrógeno también puede estar presente añadiendo un sistema enzimático (es decir, una enzima y un sustrato) que sea capaz de generar peróxido de hidrógeno al principio o durante el proceso de lavado y/o enjuague. Tales sistemas enzimáticos son descritos en solicitud de patente europea EP 0 537 381.

Los blanqueadores diferentes de los blanqueadores de oxígeno también son conocidos en la técnica y pueden ser utilizados aquí. Un tipo de blanqueador que no es de oxígeno de interés particular incluye blanqueadores fotoactivados como el zinc sulfonatado y/o ftalocianinas de aluminio. Estos materiales se pueden depositar sobre el sustrato durante el proceso de lavado. Al irradiar con luz, en presencia de oxígeno, tal como tender ropa afuera para secar a la luz solar, la ftalocianina de zinc sulfonatado es activada y, consecuentemente, el sustrato es blanqueado. La ftalocianina de zinc preferida y un proceso de blanqueamiento fotoactivado son descritos en US 4.033.718. Típicamente, la composición de detergente contendrá aproximadamente 0,025% a aproximadamente 1,25%, en peso, de ftalocianina de zinc sulfonatado.

Los blanqueadores también pueden comprender un catalizador de manganeso. El catalizador de manganeso puede, por ejemplo, ser uno de los compuestos descritos en, "Efficient manganese catalysts for low-temperature bleaching" Nature 369, 1994, pp. 637-639.

Supresores de espuma: otro ingrediente opcional es un supresor de espuma, ejemplificado por siliconas y mezclas de silicona de sílice. Las siliconas generalmente pueden ser representadas por materiales de polisiloxano alquilados, mientras que el sílice es normalmente usado en forma finamente dividida ejemplificado por aerogeles de sílice y xerogeles y sílices hidrofóbicos de varios tipos. Estos materiales se pueden incorporar como partículas, en las que el supresor de espuma es ventajosamente incorporado de forma móvil en un portador impermeable de detergente sustancialmente no tensioactivo hidrodispersable o hidrosoluble. Alternativamente, el supresor de espuma puede ser disuelto o disperso en un portador líquido y aplicado pulverizando en uno o más de los otros componentes.

Un agente de control de espuma de silicona preferida se describe en US 3.933.672. Otros supresores de espuma particularmente útiles son los supresores de espuma de silicona autoemulsificantes, descritos en la solicitud de patente alemana DTOS 2.646.126. Un ejemplo de tal compuesto es DC-544, disponible comercialmente de Dow Coming, que es un copolímero de siloxano-glicol. Agentes de control de espuma especialmente preferidos son el sistema supresor de espuma que comprende una mezcla de aceites de silicona y 2-alkil-alcaneoles. 2-alkil-alcaneoles son 2-butil-octaneoles que están disponibles comercialmente bajo el nombre comercial Isofol 12R.

Tal sistema supresor de espuma es descrito en la solicitud de patente europea EP 0 593841.

Agentes controladores de espuma de silicona especialmente preferidos son descritos en la solicitud de patente europea n.º 92201649.8. Dichas composiciones pueden comprender una mezcla de sílice/silicona en combinación con sílice pirógeno no poroso como AerosilR.

ES 2 359 381 T3

Los supresores de espuma anteriormente descritos son normalmente empleados en niveles de 0,001% a 2% en peso de la composición, preferiblemente de 0,01% a 1% en peso.

Otros componentes: Pueden emplearse otros componentes usados en composiciones detergentes como agentes de suspensión de suciedad, agentes de liberación de la suciedad, blanqueadores ópticos, abrasivos, bactericidas, inhibidores de decoloración, agentes colorantes, y/o perfumes no encapsulados o encapsulados.

Materiales de encapsulación especialmente adecuados son cápsulas solubles en agua que consisten en una matriz de compuestos de polisacárido y polihidroxi tal como se describe en GB 1.464.616.

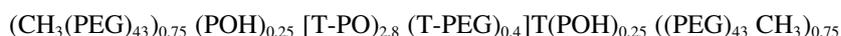
Otros materiales de encapsulación hidrosolubles adecuados comprenden dextrinas derivadas de ésteres de ácido de almidón no gelatinizado de ácidos dicarboxílicos sustituidos como se describe en US 3.455.838. Estas dextrinas de éster de ácido son, preferiblemente, obtenidas a partir de tales almidones como maíz céreo, sorgo céreo, sagú, tapioca y patata. Ejemplos adecuados de dichos materiales de encapsulación incluyen N-Lok fabricado por National Starch. El material de encapsulación N-Lok consiste en un almidón de maíz modificado y glucosa. El almidón es modificado añadiendo grupos sustituidos monofuncionales tal como anhídrido de ácido octenil succínico.

Los agentes de suspensión de tierra y antirre deposición adecuados aquí incluyen derivados de celulosa tal como metilcelulosa, carboximetilcelulosa y hidroxietilcelulosa, y ácidos policarboxílicos homo- o co-poliméricos o sus sales. Los polímeros de este tipo incluyen los copolímeros de ácidos poliácridatos y acrílico anhídrido maléico previamente mencionados como constructores, al igual que copolímeros de anhídrido maléico con etileno, metil vinil éter o ácido metacrílico, el anhídrido maléico constituyendo al menos 20 mol porcentaje del copolímero. Estos materiales son normalmente usados a niveles de 0,5% a 10% en peso, más preferiblemente de 0,75% a 8%, de forma más preferible de 1% a 6% en peso de la composición.

Los blanqueadores ópticos preferidos son aniónicos, cuyos ejemplos son 4,4'-bis-(2-dietanolamino-4-anilino-s-triazina-6-ilamino)estilbeno-2,2'-disulfonato, disodio 4,4'-bis-(2-morfolino-4-anilino-6-triazina-6-ilamino-estilbeno-2,2'-disulfonato, disodio 4,4'-bis-(2,4-dianilino-s-triazina-6-ilamino)estilbeno-2,2'-disulfonato, monosodio 4',4''-bis-(2,4-dianilino-s-triazina-6-ilamino)estilbeno-2-sulfonato, disodio 4,4'-bis-(2-anilino-4-(N-metil-N-2-hidroxiethylamino)-s-triazina-6-ilamino)estilbeno-2,2'-disulfonato, di-sodio 4,4'-bis-(4-fenil-2,1,3-triazol-2-il)-estilbeno-2,2'-disulfonato, di-sodio 4,4'-bis(2-anilino-4-(1-metil-2-hidroxiethylamino)-s-triazina-6-ilamino)estilbeno-2,2'-disulfonato, sodio 2(estilbil-4''-(nafto-1',2':4,5)-1,2,3-triazola-2''-sulfonato y 4,4'-bis(2-sulfostiril)bipenil.

Otros materiales poliméricos útiles son los glicoles de polietileno, particularmente aquellos de peso molecular de 1000 a 10000, más particularmente 2000 a 8000 y de forma más preferible aproximadamente 4000. Estos se usan en niveles de 0,20% a 5% más preferiblemente de 0,25% a 2,5% en peso. Estos polímeros y las sales de policarboxilato homo o co-poliméricas previamente mencionadas son valiosos para mejorar el mantenimiento de blancura, la deposición de ceniza del tejido, y el rendimiento de limpieza en arcilla, tierras oxidables y proteínicas en presencia de impurezas de metales de transición.

Agentes de liberación de suciedad útiles en composiciones de la presente invención son, de manera convencional, copolímeros o termopolímeros de ácido tereftálico con etilenglicol y/o unidades de propilenoglicol en varias disposiciones. Ejemplos de tales polímeros son descritos en US 4.116.885 y 4.711.730 y EP 0 272 033. Un polímero particular preferido conforme a EP 0 272 033 tiene la fórmula:



en la cual PEG es $-(\text{OC}_2\text{H}_4)_n\text{O}-$, PO es $(\text{OC}_3\text{H}_6\text{O})$ y T es $(\text{pOOC}_6\text{H}_4\text{CO})$.

También resultan muy útiles los poliésteres modificados como copolímeros aleatorios de dimetil tereftalato, dimetil sulfoisofalato, etilenglicol y 1,2-propanediol, los grupos terminales que consisten principalmente en sulfobenzoato y secundariamente de monoésteres de etilenglicol y/o 1,2-propanediol. El objetivo es obtener un polímero cubierto en ambos extremos por grupos de sulfobenzoato, "principalmente", en el presente contexto la mayor parte de dichos copolímeros aquí estará recubierto en los extremos por grupos de sulfobenzoato. No obstante, algunos copolímeros estarán menos que completamente cubiertos, y, por lo tanto, sus grupos terminales pueden consistir en monoéster de etilenglicol y/o 1,2-propanediol; los mismos consisten "secundariamente" en tales especies.

Los poliésteres seleccionados aquí contienen aproximadamente 46% en peso de ácido dimetil tereftálico, aproximadamente 16% en peso de 1,2-propanediol, aproximadamente 10% etilenglicol en peso, aproximadamente 13% en peso de ácido dimetil sulfoisofalato y aproximadamente 15% en peso de ácido sulfoisofalato, y tienen un peso molecular de aproximadamente 3.000. Los poliésteres y su método de preparación son descritos en detalle en EP 311 342.

Agente suavizante: Los agentes suavizantes de tejido también pueden ser incorporados en composiciones de detergente de lavado conforme a la presente invención. Estos agentes pueden ser de tipo inorgánico u orgánico. Los agentes suavizantes inorgánicos son ejemplificados por las arcillas tipo esmectita descritas en GB-A-1 400898 y en US

ES 2 359 381 T3

5.019.292 Agentes suavizantes de tejido orgánicos incluyen las aminas terciarias insolubles de agua como se describen en GB-A1 514 276 y EP 0 011 340 y su combinación con sales amónicas cuaternarias mono C₁₂-C₁₄ son descritas en EP-B-0026 528 y amidas de cadena larga como las descritas en EP 0 242 919. Otros ingredientes orgánicos útiles de sistemas suavizantes de tejido incluyen materiales de óxido de polietileno de peso molecular alto como se describen en EP 0 299 575 y 0 313 146.

Los niveles de arcilla tipo esmectita están normalmente en la gama de 5% a 15%, más preferiblemente de 8% a 12% en peso, con el material que se adiciona como un componente seco mezclado al resto de la formulación. Agentes suavizantes de tejido orgánicos tal como las aminas terciarias insolubles en agua o materiales de amida de cadena dilong se incorporan en niveles de 0,5% a 5% en peso, normalmente de 1% a 3% en peso mientras los materiales de óxido de polietileno de peso molecular alto y los materiales catiónicos hidrosolubles se agregan en niveles de 0,1% a 2%, normalmente de 0,15% a 1,5% en peso. Estos materiales son normalmente adicionados a la parte secada por atomización de la composición, aunque en algunos ejemplos puede ser más conveniente añadirlos como partículas secas mezcladas, o rociarlas como líquido fundido sobre otros componentes sólidos de la composición. Agentes poliméricos inhibidores de la transferencia de tintes: las composiciones detergentes según a la presente invención también pueden comprender de 0,001% a 10%, preferiblemente de 0,01% a 2%, más preferiblemente de 0,05% a 1% en peso de agentes poliméricos inhibidores de transferencias de tintes. Dichos agentes poliméricos inhibidores de transferencia de tintes son normalmente incorporados en composiciones detergentes para inhibir la transferencia de tintes desde tejidos coloreados a tejidos lavados con lo los mismos. Estos polímeros tienen la capacidad de complejar o adsorber los tintes fugaces que se quitaron de tejidos teñidos antes de que los tintes tengan la oportunidad a apearse a otros artículos en el lavado.

Agentes poliméricos inhibidores de transferencia de tintes especialmente adecuados son polímeros N-óxido poliamina, copolímeros de N-vinil-pirrolidona y N-vinilimidazola, polímeros de polivinilpirrolidona, poliviniloxazolidonas y polivinilimidazolas o mezclas derivadas.

La adición de tales polímeros también mejora el rendimiento de las enzimas conforme a la invención.

La composición de detergente según la invención puede ser en formas de líquido, pasta, geles, barras o gránulos.

Los granulados no polvorientos pueden ser producidos, por ejemplo, como se describe en US 4.106.991 y 4.661.452 (ambos de Novo Industri A/S) y opcionalmente pueden ser revestidos por métodos conocidos en la técnica. Ejemplos de materiales de recubrimiento cerosos son productos de poli(óxido de etileno) (polietilenglicol; PEG) con pesos moleculares medios de 1000 a 20000 nonilfenoles etoxilados con 16 a 50 unidades de óxido de etileno; alcoholes grasos etoxilados en los cuales el alcohol contiene de 12 a 20 átomos de carbono y en los cuales hay 15 a 80 unidades de óxido de etileno; alcoholes grasos; ácidos grasos; y mono- y di- y triglicéridos de ácidos grasos. Ejemplos de materiales de recubrimiento que forman películas adecuados para la aplicación por técnicas de lecho fluidificado se dan en GB 1483591.

Las composiciones granuladas según la presente invención también pueden estar en "forma compacta", es decir, pueden tener una densidad relativamente más alta que los detergentes granulados convencionales, es decir, de 550 a 950 g/l; en tal caso, las composiciones detergentes granuladas según la presente invención contendrán una cantidad inferior de "sal de relleno inorgánico", en comparación con detergentes granulados convencionales; sales de relleno típicas son sales de metal alcalinotérreo de sulfatos y cloruros, típicamente sulfato de sodio; el detergente "compacto" típicamente comprende no más que 10% de sal de relleno. Las composiciones líquidas según la presente invención también pueden estar en "forma concentrada", en tal caso, las composiciones de detergente líquido según la presente invención contendrán una cantidad inferior de agua, en comparación con detergentes líquidos convencionales. Típicamente, el contenido de agua del detergente líquido concentrado es inferior a 30%, más preferiblemente menos que 20%, de forma más preferible menos que 10% en peso de las composiciones detergentes.

Las composiciones de la invención pueden, por ejemplo, ser formuladas como composiciones de detergente de lavado a mano y a máquina incluidas composiciones de aditivo de lavandería y composiciones adecuadas para uso en el pretratamiento de tejidos manchados, composiciones de suavizante adicionado al enjuague y composiciones para uso en operaciones de limpieza de superficies duras del hogar en general y operaciones de lavado de la vajilla.

Los siguientes ejemplos tienen el objeto de ejemplificar las composiciones para la presente invención, pero no necesariamente tienen el objeto de limitar o definir de otra manera el ámbito de la invención.

En las composiciones detergentes, las identificaciones de componente abreviadas tienen los siguientes significados:

LAS: sulfonato sódico de alquil benceno lineal C₁₂

TAS: alquil sulfato de sebo de sodio

XYAS: alquil sulfato de sodio C_{1X}-C_{1Y}

SS: tensioactivo de jabón secundario de fórmula ácido 2-butyl octanoico

ES 2 359 381 T3

25EY: un alcohol primario lineal C_{12} - C_{15} predominantemente condensado con un promedio de moles Y de óxido de etileno

45EY: un alcohol primario lineal C_{14} - C_{15} predominantemente condensado con un promedio de moles Y de óxido de etileno

XYEZS: alquil sulfato de sodio C_{1X} - C_{1Y} condensado con un promedio de moles Z de óxido de etileno por mol

No iónico: alcohol graso etoxilado/propoxilado mezclado C_{13} - C_{15} con un grado medio de etoxilación de 3,8 y un grado medio de

CFAA: propoxilación de 4,5 vendido bajo el nombre comercial de Plurafax LF404 por BASF GmbH alquil N-metil glucamida C_{12} - C_{14}

TFAA: alquil N-metil C_{16} - C_{18} glucamida

Silicato: silicato sódico amorfo ($SiO_2:Na_2 O$ proporción = 2,0)

NaSKS-6: silicato cristalino estratificado de fórmula $\delta-Na_2 Si_2 O_5$

Carbonato: carbonato de sodio anhidro

Fosfato: tripolifosfato de sodio

MA/AA: copolímero de 1:4 ácido maléico/acrílico, peso molecular medio aproximadamente 80.000

Poliacrilato: homopolímero de poliácido acrílico con un peso medio molecular de 8.000 vendido bajo el nombre comercial PA30 por BASF GmbH

Zeolita A: aluminosilicato de sodio hidratado de fórmula $Na_{12} (AlO_2SiO_2)_{12} 27H_2O$ con un tamaño de partícula primaria en la gama de 1 a 10 micrómetros

Citrato: dihidrato de citrato trisódico

Cítrico: ácido cítrico

Perborato: blanqueo de monohidrato de perborato sódico anhidro, fórmula empírica $NaBO_2H_2O_2$

PB4: perborato sódico tetrahidrato anhidro

Percarbonato: blanqueo de percarbonato de sodio anhidro de fórmula empírica $2Na_2CO_3 \cdot 3H_2O_2$

TAED: tetraacetil etilendiamina

CMC: carboximetilcelulosa de sodio

DETPMP: dietilentriamina penta (ácido fosfónico del metileno), comercializado por Monsanto bajo el nombre comercial Dequest 2060

PVP: polímero de polivinilpirrolidona

EDDS: ácido etilendiamina-N,N'-disuccínico, [S,S] isómero en forma de la sal sódica

Espumas 25% cera de parafina Mpt 50°C, 17% sílice hidrofóbico, 58%

Supresor: aceite de parafina

espuma granulosa 12% silicona/sílice, 18% de estearil alcohol, 70%

supresor: almidón en forma granulosa

Sulfato: sulfato de sodio anhidro

HMWPEO: óxido de polietileno de peso molecular alto

TAE 25: etoxilato de alcohol de sebo (25)

ES 2 359 381 T3

Ejemplo de detergente I

Una composición de limpieza de tejido granulosa conforme a la invención se puede preparar de la siguiente manera:

| | | |
|----|-------------------------------------|-----------|
| 5 | Sodio lineal alquil C ₁₂ | 6,5 |
| | Sulfonato de benceno | |
| | Sulfato de sodio | 15,0 |
| 10 | Zeolita A | 26,0 |
| | Nitilotriacetato de sodio | 5,0 |
| | Enzima de la invención | 0,1 |
| 15 | PVP | 0,5 |
| | TAED | 3,0 |
| | Acido bórico | 4,0 |
| 20 | Perborato | 18,0 |
| | Fenol sulfonato | 0,1 |
| | Menores | Hasta 100 |
| 25 | | |

Ejemplo de detergente II

30 Una composición de limpieza de tejido granulosa compacta (densidad 800 g/l) conforme a la invención se puede preparar de la siguiente manera:

| | | |
|----|---------------------------------|------------|
| | 45AS | 8,0 |
| 35 | 25E3S | 2,0 |
| | 25E5 | 3,0 |
| | 25E3 | 3,0 |
| 40 | TFAA | 2,5 |
| | Zeolita A | 17,0 |
| | NaSKS- | 12,0 |
| 45 | Acido cítrico | 3,0 |
| | Carbonato | 7,0 |
| | MA/AA | 5,0 |
| 50 | CMC | 0,4 |
| | Enzima de la invención | 0,1 |
| | TAED | 6,0 |
| 55 | Percarbonato | 22,0 |
| | EDDS | 0,3 |
| | Supresor de espuma granuloso | 3,5 |
| 60 | agua/menores | Hasta 100% |

65

ES 2 359 381 T3

Ejemplo de detergente III

Composiciones de limpieza de tejido granulosas conforme a la invención especialmente útiles en el lavado de tejidos coloreados fueron preparados de la siguiente manera:

5

| | | | |
|----|---|------------|------|
| | LAS | 10,7 | - |
| | TAS | 2,4 | - |
| 10 | TFAA | - | 4,0 |
| | 45AS | 3,1 | 10,0 |
| | 45E7 | 4,0 | - |
| 15 | 25E3S | - | 3,0 |
| | 68E11 | 1,8 | - |
| | 25E5 | - | 8,0 |
| 20 | Citrato | 15,0 | 7,0 |
| | Carbonato | - | 10 |
| | Acido cítrico | 2,5 | 3,0 |
| 25 | Zeolita A | 32,1 | 25,0 |
| | Na-SKS-6 | - | 9,0 |
| | MA/AA | 5,0 | 5,0 |
| 30 | DETPMP | 0,2 | 0,8 |
| | Enzima de la invención | 0,10 | 0,05 |
| | Silicato | 2,5 | - |
| 35 | Sulfato | 5,2 | 3,0 |
| | PVP | 0,5 | - |
| | Poli (4-vinilpiridina)-N-óxido/copolímero de vinilimidazol y vinilpirrolidona | - | 0,2 |
| 40 | Perborato | 1,0 | - |
| | Sulfonato de fenol | 0,2 | - |
| | Agua/menores | Hasta 100% | |

45

(Tabla pasa a página siguiente)

50

55

60

65

ES 2 359 381 T3

Ejemplo detergente IV

Composiciones de limpieza de tejido granulosas conforme a la invención que proporcionan capacidad “suavidad a través del lavado” se puede preparar de la siguiente manera:

| | | | |
|----|---|------------|------|
| 5 | 45AS | - | 10.0 |
| | LAS | 7.6 | - |
| 10 | 68AS | 1.3 | - |
| | 45E7 | 4.0 | - |
| | 25E3 | - | 5.0 |
| 15 | Cloruro amónico de hidroxietilo coco-alkuil-dimetil | 1.4 | 1.0 |
| | Citrato | 5.0 | 3.0 |
| | Na-SKS-6 | - | 11.0 |
| 20 | Zeolita A | 15.0 | 15.0 |
| | MA/AA | 4.0 | 4.0 |
| | DETPMP | 0.4 | 0.4 |
| 25 | Perborato | 15.0 | - |
| | Percarbonato | - | 15.0 |
| | TAED | 5.0 | 5.0 |
| 30 | Arcilla de esmectita | 10.0 | 10.0 |
| | HMWPEO | - | 0.1 |
| | Enzima de la invención | 0.10 | 0.05 |
| 35 | Silicato | 3.0 | 5.0 |
| | Carbonato | 10.0 | 10.0 |
| | Supresor de espuma granuloso | 1.0 | 4.0 |
| 40 | CMC | 0.2 | 0.1 |
| | Agua/menores | Hasta 100% | |

Ejemplo detergente V

Composiciones de limpieza de tejido líquidas de gran resistencia conforme a la invención se puede preparar de la siguiente manera:

| | | A | B |
|----|--------------------|-----|------|
| 50 | LAS forma ácida | - | 25.0 |
| | Acido cítrico | 5.0 | 2.0 |
| 55 | 25AS forma ácida | 8.0 | - |
| | 25AE2S forma ácida | 3.0 | - |
| | 25AE7 | 8.0 | - |
| | CFAA | 5 | - |
| 60 | DETPMP | 1.0 | 1.0 |
| | Acido graso | 8 | - |
| | Acido oleico | - | 1.0 |
| 65 | Etanol | 4.0 | 6.0 |
| | Propandiol | 2.0 | 6.0 |

ES 2 359 381 T3

| | | |
|--|------------|------|
| | 0.10 | 0.05 |
| Enzima de la invención | - | 3.0 |
| Coco-alkyl dimethylhydroxy ethyl ammonium chloride | - | 5.0 |
| Arcilla de esmectita | 2.0 | - |
| PVP | Hasta 100% | |
| Agua/menores | | |

10 Ejemplo 1

Medida de la estabilidad de pectato liasa en detergente líquido

15 La estabilidad detergente de las variantes de pectato liasa de la presente invención es evaluada midiendo la actividad de las variantes tras la incubación de una mezcla de detergente de enzima, que se describe más abajo.

Ensayo de actividad residual

20 30 microlitros de una solución enzimática (sobrenadante del cultivo o enzima purificada) se mezcla con 1 ml de detergente líquido típico de gran resistencia europeo o estadounidense en dos tubos de muestra. Uno de los tubos se almacena en hielo mientras que el otro se incuba a 40°C durante 90 minutos. Como referencia, 30 microlitros de agua se mezclan con 1 ml de detergente y se incuban en hielo. Tras la incubación, 9 ml de agua helada se añade a las muestras, que se mezcla enérgicamente y se almacena en hielo hasta el análisis posterior.

25 La actividad enzimática primero se mide mezclando 50 microlitros de mezcla de detergente de enzima con 5 ml de tampón de ensayo (100 mM Tris-HCL, 0,68 mM CaCl₂, pH 8,0), en segundo lugar, de esa solución, 75 microlitros se mezclan con 75 microlitros de solución de sustrato recién preparada (ácido poligalacturónico al 1% en tampón de ensayo) y se incuba a 40 grados Celsius durante 10 minutos. En tercer lugar, 100 microlitros de la mezcla de incubación se añaden en 100 microlitros de tampón de parada (50 mM H₃ PO₄) en una placa de microvaloración transparente de UV y la absorbencia a 235 nm se mide en un espectofotómetro. La muestra de detergente hidrosoluble se utiliza para ajustar en cero el espectofotómetro.

35 Ahora la actividad residual se calcula como la actividad (absorbencia A235) en la muestra incubada a 40 grados Celsius durante 90 minutos en relación a la actividad en la muestra almacenada en hielo:

$$\text{Actividad residual (AR)} = \text{absorbencia [muestra incubada a 40°C/absorbencia [muestra incubada a 0°] x 100}$$

40 Así, la actividad residual es equivalente a la estabilidad detergente de la enzima. La tabla 2 presenta la actividad residual mejorada de varias sustituciones de la pectato liasa de SEC ID N.º 2 incubadas en un detergente líquido de gran resistencia europeo típico. El mayoría de las sustituciones dan lugar a más que 50% de mejora en la estabilidad detergente en comparación con la pectato liasa progenitora como se muestra en SEC ID N.º 2. De forma equivalente, las sustituciones de pectato liasa de SEC ID N.º 2 catalogadas en la tabla 3 mejoran significativamente la estabilidad de la enzima cuando es incubada en un detergente líquido estadounidense de gran resistencia típico.

TABLA 2

Sustituciones en la pectato liasa de SEC ID N.º 2 dando lugar a actividad residual aumentada tras la incubación en detergente líquido europeo de gran resistencia

50

| Mutaciones | % actividad residual | Actividad residual en % de enzima parental |
|---|----------------------|--|
| Pectato liasa de SEC ID N.º 2 (enzima parental) | 23 | 100 |
| Q40E | 28 | 122 |
| F251I | 30 | 130.4 |
| A332P | 31 | 134.8 |
| L106Q | 31 | 134.8 |
| R272H | 31 | 134.8 |
| R272Y | 31 | 134.8 |
| A91E | 33 | 143.5 |

65

ES 2 359 381 T3

| | Mutaciones | % actividad residual | Actividad residual en % de enzima parental |
|----|---|----------------------|--|
| 5 | K115I+K213E | 33 | 143.5 |
| | K139I+K213N | 33 | 143.5 |
| | H5R+K257N+S302A | 34 | 147.8 |
| 10 | K139M | 34 | 147.8 |
| | K87A | 34 | 147.8 |
| | D48P | 35 | 152.2 |
| 15 | K99I+I196V | 35 | 152.2 |
| | T105P | 35 | 152.2 |
| | K115A+K118A | 36 | 156.5 |
| 20 | K115A+K118A+M122N | 36 | 156.5 |
| | K115Q | 36 | 156.5 |
| | K213T | 36 | 156.5 |
| 25 | V141E+C199S+K213E | 36 | 156.5 |
| | K115I+Q146H | 37 | 160.9 |
| | K257N | 37 | 160.9 |
| 30 | K71E+K118E | 38 | 165.2 |
| | S331P | 38 | 165.2 |
| | T49P+N156S | 38 | 165.2 |
| 35 | K314N+S340P | 39 | 169.6 |
| | V141E+I235V | 39 | 169.6 |
| | G46D+K257N | 40 | 173.9 |
| 40 | Q146H | 40 | 173.9 |
| | K218P | 41 | 178 |
| | A305P | 41 | 178 |
| 45 | S28T+S30F+K334E+N363S | 41 | 178 |
| | H193Y+S256C+V389I+A393V | 42 | 183 |
| | R272C | 42 | 183 |
| 50 | D48E+L106Q+I140V+F215Y+K218E | 42 | 183 |
| | K213N+T258I | 43 | 187 |
| | E9G+H31N+N50D+L106Q+A111E+T136S+V141L+F201L+N202K+F215Y+G286A+A381D+H384N | 43 | 187 |
| 55 | E9G+H31N+L106Q+D303S+A305P+T335S+H384N+S391N | 44 | 191 |
| | E9G+H31N+D48E+L106Q+A111E+S301Y+D303S+A305P+T378S+H384N+S391N | 45 | 196 |
| 60 | L45V+N50Y+N185H | 46 | 200 |
| | N11Y+K87E+K99N | 46 | 200 |
| | K115I+K213E | 48 | 209 |
| 65 | E9G+D48E+L106Q+S316F+A381 D | 48 | 209 |

ES 2 359 381 T3

| | Mutaciones | % actividad residual | Actividad residual en % de enzima parental |
|----|--|----------------------|--|
| 5 | S30P+K115I+K139I+Q146H+S337C | 49 | 213 |
| | K213N+T258I | 50 | 217 |
| | K47R+K257N | 50 | 217 |
| 10 | E9G+H31N+D48E+L106Q+I140V+F215Y+D303S+A305P+T378S+H384N+S391 N | 51 | 222 |
| | H31N+T105A+L106Q+A111E+V141L+K218E+D303S+A305P+D326N+T335S+H384N+S391N | 51 | 222 |
| 15 | E9G+L106Q+I140V+G204R+F215Y+D303S+A305P+T378S+H384N+S391 N | 52 | 226 |
| | K26Q+K47N+L106Q+I140V+F215Y+D303S+A305P+T378S+H384N+S391N | 53 | 230 |
| 20 | D48E+L106Q+I140V+F215Y+D303S+A305P+T378S+H384N+S391N | 56 | 243 |
| | D48E+L106Q+K213T+F215Y+K218L+A305P | 57 | 248 |
| 25 | L106Q+S337C | 57 | 248 |
| | K115I+K213N | 57 | 248 |
| | E9G+H31N+T61A+G74D+L75A+N76D+K79A+D86N+E107K+T136S+V141L+F215Y+K218E+V324A+A333E+S340K+G341S+T378S+H384N+S391N | 57 | 248 |
| 30 | T52M+K139I+Q146H+I196V+K213N+K257N+T258I+N323M+S366N | 57 | 248 |
| | N51Y+N186H+K213N+K257N | 59 | 257 |
| 35 | K213N | 60 | 261 |
| | K139I+Q146H+K213N+T258I+S337C | 60 | 261 |
| 40 | E9G+D48E+G74D+L75A+N76D+K79A+D86N+L106Q+T136S+V141L+K148E+I194V+G204R+F215Y+D303S+A305P+T378S+H384N+S391N | 61 | 265 |
| | H31N+D48E+L106Q+T136S+V141L+I194V+S331T+H384N+K386R+S387A+I390T | 62 | 270 |
| 45 | K213T+K218L+A305P | 64 | 278 |
| | S337C | 65 | 283 |
| | M122Q+K115Q+K118Q+K139I+Q146H+S337C | 66 | 287 |
| 50 | M64F+K213T+K218P+A305P | 66 | 287 |
| | K213T+K218P+A305P+D48P+T105P+K139I+T258I | 67 | 291 |
| | L45V+K139I+Q146H+N185H+N196V+S337C+G377E+S387I | 67 | 291 |
| 55 | M64F+L106Q+K213T+F215Y+K218L+A305P | 68 | 296 |
| | M64F+K213T+K218L+A305P | 70 | 304 |
| | M64F+M122K+K118E+K213T+K218L+A305P | 71 | 309 |
| 60 | K213T+K218P+A305P+D48P+T105P+K139T | 71 | 309 |
| | D48E+M64F+L106Q+M 122K+K118E+K213T+F215Y+K218L+A305P | 72 | 313 |

65

ES 2 359 381 T3

| Mutaciones | % actividad residual | Actividad residual en % de enzima parental |
|--|----------------------|--|
| L45V+K139N+Q146H+I196V+T258I | 72 | 313 |
| K139I+V141G+Q146H+S337C+I357V | 72 | 313 |
| K991+K139I+Q146H+N185H+I196V+K213N+K257N+T258I | 73 | 317 |
| K139I+Q146H+S337C | 74 | 322 |
| M64F+M122K+K118E+Q146H+K213T+K218L+A305P+S340Q | 74 | 322 |
| M122K+K118E+K139I+Q146H+S337C | 75 | 326 |
| K139N+E158N+Q146H+S337C | 75 | 326 |
| M64F+K118E+M122K+Q146H+K213N+K218P+A305P | 75 | 326 |
| K139I;Q146H+K257N+S337C | 75 | 326 |
| K991+I196V+K213N | 75 | 326 |
| K139I+Q146H+R272C | 75 | 326 |
| K139I+Q146H+N323M+S337C | 75,5 | 328 |
| M64F+M122K+K118E+Q146H++I196V+K218L+A305P | 76 | 330 |
| L45V+N116D+N185H+K257N+T258I+S337C+Q356H | 76 | 330 |
| M64F+M237I+K139I+Q146H+S337C | 77 | 335 |
| D48P+M64F+K213T+K218L+A305P+S331P | 77 | 335 |
| M64F+K139N+Q146H+E158N+S337C | 77 | 335 |
| K139I+Q146H+S337C | 77 | 335 |
| M64F+M122E+K139I+Q146H+S337C | 78 | 339 |
| M64F+M122K+K118E+K139I+Q146H+S337C | 78 | 339 |
| D48P+T105P+K139N+K213N+K218P+T258N+A305P+S331P | 78 | 339 |
| M64F+K139S+Q146H+S337C | 78 | 339 |
| M64F+M122K+K118E+Q146H+K213T+K218L+A305P | 79 | 343 |
| K139I+Q146H+K213N+S331P+S337C | 80 | 348 |
| Q146H+V338E | 81 | 352 |
| K139I+Q146H+N189D+S337R | 81 | 352 |
| M64F+K139H+Q146H+S337C | 81 | 352 |
| K139I+S337C+S340N | 81,5 | 354 |
| M64F+L106Q+K139I+Q146H+K213T+K218L+A305P+S337C | 82 | 357 |
| N76D+K139I+Q146I+S337C | 82 | 357 |
| M64F+K139F+Q146V+S337C | 82 | 357 |
| M64F+K139I+Q146H+Y308S+T335R+I336S+S337L+V338Y+F339I+S340A | 82 | 357 |
| D48P+M64F+T105P+K139N+Q146H+K213N+K218P+T258N+A305P+S331P | 83 | 361 |
| M64F+V123I+K139I+Q146H+S337C | 84 | 365 |
| M64F+M122K+K118E+Q146H+K213T+K218L+A305P+S337C | 84 | 365 |
| K139I+Q146H+S256C | 84 | 365 |

ES 2 359 381 T3

| | Mutaciones | % actividad residual | Actividad residual en % de enzima parental |
|----|---|----------------------|--|
| 5 | N37D+K139I+Q146H+K213E+S307R+S337C | 84 | 365 |
| | K139I+Q146H+S229T+S337C | 84 | 365 |
| | M64F+K139S+Q146V+S337C | 84 | 365 |
| 10 | M64F+M122V+K139Q+Q146L+S337C+K397D | 84 | 365 |
| | M64F+K139I+Q146V+S337C | 84 | 365 |
| | D48P+M64F+K118E+M122K+Q146H+D170N+K213N+K218P+A305P+S331P | 85 | 370 |
| 15 | L45V+K213N+K257N+S337C+T378G+H384N+S391N | 85 | 370 |
| | M64F+M122K+K118E+Q146H+K213T+K218L+A305P+S340P | 86 | 374 |
| | K139I+V141G+Q146H+V277D | 86 | 374 |
| 20 | M64F+K139L+Q146F+S337C | 86 | 374 |
| | M64F+K99I+T105P+M122K+K118E+Q146H+K213N+K218P+A305P+S331P | 86,5 | 376 |
| | K213T+K218P+A305P+D48P+T105P+K139I+T258I+S331P | 87 | 378 |
| 25 | D48P+M64F+T105P+K139N+Q146H+K213T+K218P+T258I+A305P+S331P | 89 | 387 |
| | M64F+K139I+Q146H+S337C | 90 | 391 |
| 30 | D48P+M64F+T105P+K139I+Q146H+K213T+K218P+T258I+A305P+S331P | 90,5 | 393 |
| | M64F+K139I+Q146H+K213T+K218L+A305P+S337C | 91 | 396 |
| 35 | D48P+T105P+K139N+K213T+K218P+T258I+A305P+S331P | 91 | 396 |
| | M64F+M122K+K118E+Q146H+K213T+K218L+A305P+S337K | 91 | 396 |
| | D48P+M64F+T105P+K139I+Q146H+K213T+K218P+T258I+A305P+S331P | 91 | 396 |
| 40 | V141E+C199S+K213E+Y295H | 91 | 396 |
| | D48P+M64F+T105P+M122K+K118E+K213T+K218P+A305P+S331P | 92 | 400 |
| 45 | D48P+M64F+K139I+Q146H+K213T+K218L+A305P+S337K | 92 | 400 |
| | D48P+T105P+K139N+K213T+K218P+T258I+A305P+S331P+S337R | 92 | 400 |
| | D48P+M64F+T105P+K139I+Q146H+K213T+K218P+T258I+A305P+S331P+S337K | 92 | 400 |
| 50 | D48P+M64F+L106Q+K139I+Q146H+K213T+K218L+A305P+S337C | 93 | 404 |
| | D48P+M64F+T105P+K139I+Q146H+K148E+K213T+K218P+T258I+A305P+S331P+S337R | 93 | 404 |
| | M64F+L75P+K139E+Q146V+G224S+S337C+G349R+V389I | 93 | 404 |
| 55 | M64F+K139I+Q146H+K213T+K218L+A305P+T258P+S331P+S337C | 94 | 409 |
| 60 | D48P+M64F+L106Q+K139I+Q146H+K213T+K218L+Y234H+A305P+S331P+S337C | 94 | 409 |
| 65 | M64F+M122K+K118E+Q146H+K213T+K218L+A305P+S337R | 97 | 422 |

ES 2 359 381 T3

| Mutaciones | % actividad residual | Actividad residual en % de enzima parental |
|---|----------------------|--|
| D48P+T105P+K139N+K213T+K218P+T258I+A305P+S331P+S337K | 97 | 422 |
| D48P+M64F+T105P+K139I+Q146H+K213T+K218P+T258I+A305P+S331P+S340P | 97 | 422 |
| M64F+K139I+Q146H+K213T+K218L+A305P+S331 P+S337C | 98 | 426 |
| D48P+M64F+K139I+Q146H+K213T+K218L+A305P+S337C | 98 | 426 |
| D48P+M64F+K139I+Q146H+K213T+K218L+A305P+S337R | 98 | 426 |
| D48P+M64F+T105P+K139I+Q146H+K213T+K218P+T258I+A305P+S331P+S337R | 99 | 430 |
| D48P+M64F+T105P+K139I+Q146H+N 189D+K213T+K218P+T258I+S298N+A305P+S331 P+S337R | 100 | 435 |
| D48P+M64F+T105P+K139I+Q146H+K213T+K218P+T258I+A305P+S331P+S337K+S340P | 100 | 435 |
| D48P+M64F+T105P+K139I+Q146H+K213T+K218P+T258I+A305P+S331P+K334E+S337K+S340P | 100 | 435 |

TABLA 3

Sustituciones en la pectato liasa de SEC ID N.º 2 dando lugar a actividad residual aumentada tras la incubación en detergente líquido estadounidense de gran resistencia

| Mutaciones | Actividad residual % | Actividad residual en % de enzima parental |
|---|----------------------|--|
| Pectato liasa de SEC ID N.º 2 (enzima parental) | 45 | 100 |
| D68*+N69*+L70*+K71* | 46 | 102 |
| N50L+K54V | 46 | 102 |
| I390N | 46 | 102 |
| V141N | 47 | 104 |
| L75P | 47 | 104 |
| K115N | 47 | 104 |
| L268Y+F251I | 48 | 107 |
| A91E | 48 | 107 |
| T105P | 48 | 107 |
| L106Q | 49 | 109 |
| K87A | 49 | 109 |
| S30T+K99I | 49 | 109 |
| K139I+K213N | 49 | 109 |
| R272Y | 50 | 111 |
| M237I | 51 | 113 |
| C199N | 51 | 113 |
| F215Y | 52 | 116 |
| K213T | 52 | 116 |
| A228I+F251I | 53 | 118 |

ES 2 359 381 T3

| | Mutaciones | Actividad residual % | Actividad residual en % de enzima parental |
|----|------------------------------------|----------------------|--|
| 5 | K115I+Q2146H | 57 | 127 |
| | K257N | 59 | 131 |
| | K213N+T258I | 60 | 133 |
| 10 | M122Q | 61 | 136 |
| | K386P | 61 | 136 |
| | K218P | 61 | 136 |
| 15 | A332P | 62 | 138 |
| | F251I | 64 | 142 |
| | A305P | 64 | 142 |
| 20 | D48P | 64 | 142 |
| | S134L+K257E | 66 | 147 |
| | M64F+K213T+K218L+A305P | 73 | 162 |
| | S331P | 75 | 167 |
| 25 | M64F+M122K+K118E+K213T+K218L+A305P | 78 | 173 |
| | M64F+K139I+Q146H+S337C | 91 | 202 |
| | M64F+V123I+K139I+Q146H+S337C | 91 | 202 |
| 30 | K139I+Q146H+S337C | 100 | Actividad residual en % de enzima parental |

35 Ejemplo 2

Estabilidad de pectato liasas en detergente líquido después de incubación prolongada

35 La estabilidad detergente de las variantes de pectato liasa de la presente invención es evaluada midiendo la actividad de las variantes tras la incubación de una mezcla de detergente de enzima, que es descrita más abajo.

Ensayo de actividad residual

45 30 microlitros de una solución enzimática (sobrenadante del cultivo o enzima purificada) se mezcla con 1 ml de detergente líquido europeo de gran resistencia típico en dos tubos de muestra. Uno de los tubos se almacena en hielo mientras que el otro se incuba a 40 grados Celsius durante 18 o 24 horas. Como referencia, 30 microlitros de agua se mezclan con 1 ml de detergente y se incuban en hielo. Tras la incubación, 9 ml de agua helada se añade a las muestras, que se mezcla enérgicamente y se almacena en hielo hasta el análisis posterior.

50 La actividad enzimática primero se mide mezclando 50 microlitros de mezcla de detergente de enzima con 5 ml de tampón de ensayo (100 mM Tris-HCL, 0,68 mM CaCl₂, pH 8,0), en segundo lugar, de esa solución, 75 microlitros se mezclan con 75 microlitros de solución de sustrato recién preparada (ácido poligalacturónico al 1% en tampón de ensayo) y se incuba a 40 grados Celsius durante 10 minutos. En tercer lugar, 100 microlitros de la mezcla de incubación se añaden en 100 microlitros de tampón de parada (50 mM H₃ PO₄) en una placa de microvaloración transparente de UV y la absorbencia a 235nm se mide en un espectrofotómetro. La muestra de detergente hidrosoluble se utiliza para ajustar en cero el espectrofotómetro.

55 Ahora, la actividad residual se calcula como la actividad (absorbencia A235) en la muestra incubada a 40 grados Celsius durante 90 minutos en relación a la actividad en la muestra almacenada en hielo:

$$60 \text{ Actividad residual (AR)} = \text{absorbencia [muestra incubada a 40°C/Absorbencia [muestra incubada a 0°]} \times 100$$

65 Así, la actividad residual es equivalente a la estabilidad detergente de la enzima. La tabla 4 presenta la actividad residual mejorada de varias sustituciones de la pectato liasa de SEC ID N.º 2 incubadas en un detergente líquido europeo de gran resistencia típico durante 18 horas. Asimismo, la tabla 5 presenta la actividad residual de variantes de pectato liasa incubadas durante 24 horas.

ES 2 359 381 T3

TABLA 4

Sustituciones en la pectato liasa de SEC ID N.º 2 dando lugar a actividad residual aumentada, que se mide tras la incubación en detergente líquido europeo de gran resistencia durante 18 horas

5

10

15

20

25

30

35

40

45

| Mutaciones | % actividad residual |
|---|----------------------|
| Pectato liasa de SEC ID N.º 2 (enzima parental) | <5% |
| K139I+Q146H+S337C | 22 |
| D48P+M64F+K139I+Q146H+K213T+K218L+A305P+S337C | 53 |
| D48P+M64F+T105P+M122K+K118E+K213T+K218P+A305P+S331P | 41 |
| M64F+M122K+K118E+Q146H+K213T+K218L+A305P+S340P | 38 |
| D48P+M64F+T105P+K139I+Q146H+K213T+K218P+T258I+A305P+S331P | 37 |
| D48P+M64F+K99I+K118E+M122K+Q146H+K213N+K218P+A305P+S331P | 24 |
| D48P+T105P+K139N+K213T+K218P+T258I+A305P+S331P | 23 |
| D48P+M64F+K139I+Q146H+K213T+K218L+A305P+S337K | 56 |
| D48P+M64F+K139I+Q146H+K213T+K218L+A305P+S337R | 46 |
| M64F+M122K+K118E+Q146H+K213T+K218L+A305P+S337K | 49 |
| M64F+M122K+K118E+Q146H+K213T+K218L+A305P+S337R | 59 |
| D48P+T105P+K139N+K213T+K218P+T258I+A305P+S331P+S337K | 60 |
| D48P+T105P+K139N+K213T+K218P+T258I+A305P+S331P+S337R | 57 |
| D48P+M64F+T105P+K139N+Q146H+K213T+K218P+T258I+A305P+S331P | 32 |
| D48P+K99I+T105P+K139N+K213T+K218P+T258I+A305P+S331P | 44 |
| D48P+M64F+L106Q+K139I+Q146H+K213T+K218L+Y234H+A305P+S331P+S337C | 52 |
| D48P+M64F+T105P+K139I+Q146H+K213T+K218P+T258I+A305P+S331P+S337R | 80 |
| D48P+M64F+T105P+K139I+Q146H+K213T+K218P+T258I+A305P+S331P+S340P | 64 |
| D48P+M64F+T105P+K139N+Q146H+K213T+K218P+T258I+A305P+S331P | 30 |
| D48P+M64F+T105P+K139I+Q146H+N189D+K213T+K218P+T258I+A305P+S331P+S337R | 80 |
| D48P+M64F+T105P+K139I+Q146H+K213T+K218P+T258I+A305P+S331P | 32 |

50

TABLA 5

Sustituciones en la pectato liasa de SEC ID N.º 2 dando lugar a actividad residual aumentada, que se mide tras la incubación en detergente líquido europeo de gran resistencia durante 24 horas

55

60

65

| Mutaciones | % actividad residual |
|---|----------------------|
| Pectato liasa de SEC ID N.º 2 (enzima parental) | <5 |
| D48P+M64F+T105P+K139I+Q146H+K213T+K218P+T258I+A305P+S331P+S337R | 67 |
| D48P+M64F+T105P+K139I+Q146H+K213T+K218P+T258I+A305P+S331P+S337K+S340P | 85 |
| D48P+M64F+T105P+K139I+Q146H+N189D+K213T+K218P+T258I+S298N+A305P+S331P+S337R | 77 |

ES 2 359 381 T3

| | Mutaciones | % actividad residual |
|----|---|----------------------|
| | D48P+M64F+T105P+K139I+Q146H+K148E+K213T+K218P+T258I+A305P+S331P+S337R | 77 |
| 5 | D48P+M64F+T105P+K139I+Q146H+K213T+K218P+T258I+A305P+S331P+K334E+S340P | 60 |
| | Mutaciones | % actividad residual |
| 10 | D48P+M64F+T105P+K139I+Q146H+K213T+K218P+T258I+A305P+S331P+K334E+S337K+S340P | 90 |
| | D48P+M64F+T105P+K139N+K213T+K218P+T258I+A305P+S331P+S337K | 69 |
| | D48P+M64F+T105P+K139N+K213T+K218P+T258I+A305P+S331 P+S337R | 63 |
| 15 | D48P+M64F+T105P+K139I+Q146H+K213T+K218P+T258I+A305P+S331P+S337K | 80 |
| | D48P+M64F+T105P+K139I+Q146H+K148Q+K213T+K218P+T258I+A305P+S331P+S337K | 83 |
| 20 | D48P+M64F+T105P+K139I+V141E+Q146H+K213T+K218P+T258I+A305P+S331P+S337K | 88 |
| | D48P+M64F+T105P+K139I+Q146H+C199S+K213T+K218P+T258I+A305P+S331P+S337K | 82 |
| 25 | D48P+M64F+T105P+K139I+Q146H+K213T+K218P+T258I+Y295H+A305P+S331P+S337K | 84 |
| | D48P+M64F+T105P+K139I+Q146H+K213T+K218P+T258I+A305P+S331P+K334E+S337K | 86 |
| 30 | D48P+M64F+K99R+T105P+K139I+Q146H+K213T+K218P+T258I+A305P+S331P+S337K | 82 |

Ejemplo 3

Calorimetría por análisis diferencial en pectato liasa de tipo salvaje y variantes

La termoestabilidad de variantes de pectato liasa de la invención fue medida calorimetría por análisis diferencial (DSC). Los experimentos fueron conducidos en un tampón (a diferencia del detergente). Muestras de enzima purificadas fueron dializadas dos veces contra 5 L 20 mM HEPES tampón, 0,68 mM CaCl₂, pH 8,0 en 10 kDa Slide-A-Lyzers (Pierce; EE. UU.) cortado y concentradas a aprox. 10 mg/ml por 2.400 g centrifugado en un Biofuge Stratos (Kendro, Alemania) en YM 10 kDa Centricon cells (Amicon). La DSC fue realizada en un MCS 4100 (Calorimetry Sciences Corporation, EE. UU.) con un gradiente 1°C/min de 5 a 110°C y datos analizados por software CpCalc 2,1 (Applied Thermodynamics, EE. UU.).

TABLA 6

Temperaturas de transición (T_t) para las enzimas de pectato liasa evaluadas

| | Mutaciones | T _t (°C) |
|----|---|---------------------|
| | Progenitor | 67.6 |
| 55 | D48P+M64F+T105P+K139I+Q146H+K213T+K218P+T258I+A305P+S331P | 71.5 |
| | K139I+Q146H+S337C | 72.4 |
| | D48P+M64F+T105P+K139I+Q146H+K213T+K218P+T258I+A305P+S331P+S34 OP | 74.1 |
| 60 | D48P+M64F+T105P+K139I+Q146H+K213T+K218P+T258I+A305P+S331P+K33 4E+S337K+S340P | 74.2 |
| | M64F+K139I+Q146H+S337C | 74.5 |
| | D48P+M64F+T105P+K139I+Q146H+N189D+K213T+K218P+T258I+S298N+A30 5P+S331 P+S337R | 74.7 |
| 65 | D48P+M64F+T105P+K139I+Q146H+K213T+K218P+T258I+A305P+S331P+S33 7K | 75.0 |
| | D48P+M64F+T105P+K139I+Q146H+K213T+K218P+T258I+A305P+S331P+S33 7R | 75.6 |

ES 2 359 381 T3

| Mutaciones | T _t (°C) |
|---|---------------------|
| D48P+M64F+T105P+K139I+Q146H+K148E+K213T+K218P+T258I+A305P+S33 1 P+S337R | 76.6 |
| D48P+M64F+T105P+K139I+Q146H+K213T+K218P+T258I+A305P+S331P+S33 7K+S340P | 77.7 |

Se observa que todas las variantes son térmicamente estabilizadas en comparación con el progenitor.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 359 381 T3

REIVINDICACIONES

1. Una variante de una enzima parental con actividad de pectato liasa, EC 4.2.2.2, teniendo la variante la estabilidad detergente mejorada en comparación con dicha enzima parental, y comprendiendo la variante una alteración en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en el número de posiciones: 5, 9, 11, 26, 28, 30, 31, 37, 40, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 54, 61, 64, 68, 69, 70, 71, 74, 75, 76, 79, 86, 87, 91, 99, 105, 106, 107, 111, 115, 116, 118, 122, 123, 134, 136, 139, 140, 141, 146, 148, 156, 158, 170, 182, 185, 186, 189, 193, 194, 196, 199, 201, 202, 204, 213, 215, 218, 224, 228, 229, 234, 235, 237, 251, 256, 257, 258, 272, 277, 286, 295, 298, 301, 302, 303, 305, 307, 308, 314, 316, 323, 324, 326, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 349, 356, 357, 363, 366, 378, 381, 384, 386, 387, 389, 390, 391, 393 y 397, donde

- a) la o las alteraciones son independientemente
 - i) una inserción de un aminoácido debajo del aminoácido que ocupa la posición,
 - ii) una deleción del aminoácido que ocupa la posición, o
 - iii) una sustitución del aminoácido que ocupa la posición con un aminoácido diferente;
- b) cada posición corresponde a una posición de la secuencia de aminoácidos de la pectato liasa con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º 2:
- c) la enzima parental es la pectato liasa mostrada en SEC ID N.º 2 o una pectato liasa con al menos 95% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º 2 y
- d) la variante tiene actividad de pectato liasa.

2. Variante según la reivindicación 1 donde la o las alteraciones son sustitución o sustituciones.

3. Variante según la reivindicación 1 o 2 que comprende una o más sustituciones seleccionadas del grupo que consisten en: H5R, E9G, N11Y, K26Q, S28T, S30F, S30P, S30T, H31N, N37D, Q40E, L45V, G46D, K47N, K47R, D48E, D48P, T49P, N50D, N50L, N50Y, N51Y, T52M, K54V, T61A, M64F, D68*, N69*, L70*, K71*, K71E, G74D, L75A, L75P, N76D, K79A, D86N, K87A, K87E, A91E, K99I, K99N, K99R, T105A, T105P, L106Q, E107K, A111E, K115A, K115I, K115N, K115Q, N116D, K118A, K118E, M122E, M122K, M122N, M122Q, V123I, S134L, T136S, K139E, K139F, K139I, K139M, K139N, K139S, I140V, V141G, V141E, V141L, V141N, Q146F, Q146H, Q146I, Q146V, K148E, K148Q, N156S, E158N, D170N, Q182D, Q182E, N185H, N186H, N189D, H193Y, I194V, I196V, C199N, C199S, F201L, N202K, G204R, K213E, K213N, K213T, F215Y, K218E, K218L, K218P, G224S, A228I, S229T, Y234H, I235V, M237I, F251I, S256C, K257E, K257N, T258I, L286Y, R272C, R272H, R272Y, V277D, G286A, Y295H, S298N, S301Y, S302A, D303S, A305P, S307R, Y308S, K314N, S316F, N323M, V324A, D326N, S331P, S331T, A332P, A333E, K334E, T335S, T335R, I336S, S337C, S337K, S337L, S337R, V338E, V338Y, F339I, S340A, S340K, S340N, S340P, S340Q, G341S, G349R, Q356H, I357V, N363S, S366N, T378G, T378S, A381D, H384N, K386P, K386R, S387A, V389I, I390N, I390T, S391N, A393V y K397D, y **caracterizada** por el hecho de que cada posición corresponde a una posición de la secuencia de aminoácidos de la pectato liasa con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º 2.

4. Variante según cualquiera de las reivindicaciones precedentes que comprende un conjunto de sustituciones seleccionadas del grupo que consisten en:

- K139I+Q146H+S337C;
- D48P+K99I+T105P+K139N+K213T+K218P+T258I+A305P+S331P;
- D48P+M64F+K139I+Q146H+K213T+K218L+A305P+S337C;
- D48P+M64F+K139I+Q146H+K213T+K218L+A305P+S337K;
- D48P+M64F+K139I+Q146H+K213T+K218L+A305P+S337R;
- D48P+M64F+K99I+K118E+M122K+Q146H+K213N+K218P+A305P+S331P;
- D48P+M64F+K99R+T105P+K139I+Q146H+K213T+K218P+T258I+A305P+S331P+S337K;
- D48P+M64F+L106Q+K139I+Q146H+K213T+K218L+Y234H+A305P+S331P+S337C;
- D48P+M64F+T105P+K139I+Q146H+C199S+K213T+K218P+T258I+A305P+S331P+S337K;

ES 2 359 381 T3

- D48P+M64F+T105P+K139I+Q146H+K148E+K213T+K218P+T258I+A305P+S331P+S337R;
D48P+M64F+T105P+K139I+Q146H+K148Q+K213T+K218P+T258I+A305P+S331P+S337K;
5 D48P+M64F+T105P+K139I+Q146H+K213T+K218P+T258I+A305P+S331P;
D48P+M64F+T105P+K139I+Q146H+K213T+K218P+T258I+A305P+S331P+S337R;
D48P+M64F+T105P+K139I+Q146H+K213T+K218P+T258I+A305P+S331P+S340P;
10 D48P+M64F+T105P+K139I+Q146H+K213T+K218P+T258I+A305P+S331P+S337K+S340P;
D48P+M64F+T105P+K139I+Q146H+K213T+K218P+T258I+A305P+S331P+K334E+S340P;
15 D48P+M64F+T105P+K139I+Q146H+K213T+K218P+T258I+A305P+S331P+K334E+ S337K+S340P;
D48P+M64F+T105P+K139I+Q146H+K213T+K218P+T258I+A305P+S331P+ S337K;
D48P+M64F+T105P+K139I+Q146H+K213T+K218P+T258I+A305P+S331P+K334E+S337K;
20 D48P+M64F+T105P+K139I+Q146H+K213T+K218P+T258I+Y295H+A305P+S331P+S337K;
D48P+M64F+T105P+K139I+Q146H+N189D+K213T+K218P+T258I+A305P+S331P+S337R;
25 D48P+M64F+T105P+K139I+Q146H+N189D+K213T+K218P+T258I+S298N+A305P+ S331P+S337R;
D48P+M64F+T105P+K139I+V141E+Q146H+K213T+K218P+T258I+A305P+S331P+S337K;
D48P+M64F+T105P+K139N+K213T+K218P+T258I+A305P+S331P+S337K;
30 D48P+M64F+T105P+K139N+K213T+K218P+T258I+A305P+S331P+S337R;
D48P+M64F+T105P+K139N+Q146H+K213T+K218P+T258I+A305P+S331P;
35 D48P+M64F+T105P+M122K+K118E+K213T+K218P+A305P+S331P;
D48P+T105P+K139N+K213T+K218P+T258I+A305P+S331P;
D48P+T105P+K139N+K213T+K218P+T258I+A305P+S331P+S337K;
40 D48P+T105P+K139N+K213T+K218P+T258I+A305P+S331P+S337R;
M64F+M122K+K118E+Q146H+K213T+K218L+A305P+S337K;
45 M64F+M122K+K118E+Q146H+K213T+K218L+A305P+S337R; y
M64F+M122K+K118E+Q146H+K213T+K218L+A305P+S340P;

50 5. Variante según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la pectato liasa progenitora se codifica por un polinucleótido que hibridiza bajo condiciones de astringencia alta, con el polinucleótido de SEC ID N.º 1 o su cadena complementaria.

55 6. Variante según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el número total de alteraciones es trece.

7. Variante según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el número total de alteraciones es doce.

8. Variante según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el número total de alteraciones es once.

60 9. Variante según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el número total de alteraciones es diez.

10. Variante según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el número total de alteraciones es ocho.

65 11. Variante según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el número total de alteraciones es siete.

12. Variante según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el número total de alteraciones es cuatro.

ES 2 359 381 T3

13. Variante según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el número total de alteraciones es tres.
14. Variante según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el número total de alteraciones es dos.
- 5 15. Polinucleótido que codifica la variante de cualquiera de las reivindicaciones precedentes.
16. Vector de expresión que comprende el polinucleótido según la reivindicación 15.
17. Célula huésped microbiana transformada con el vector de expresión según la reivindicación 16.
- 10 18. Célula huésped microbiana según la reivindicación 17, en la que la célula es una *Bacillus subtilis*.
19. Célula huésped microbiana según la reivindicación 17, en la que la célula es una *Aspergillus*.
- 15 20. Método para la producción de una variante de pectato liasa según cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en el que una célula huésped microbiana según cualquiera de las reivindicaciones 17-19 es cultivada bajo condiciones conductoras a la expresión y la secreción de la variante, y siendo la variante es recuperada.
21. Método para mejorar la estabilidad detergente de una pectato liasa, que comprende la alteración de una o más
20 posiciones seleccionadas a partir del grupo que consiste en el número de posiciones: 5, 9, 11, 26, 28, 30, 31, 37, 40, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 54, 61, 64, 68, 69, 70, 71, 74, 75, 76, 79, 86, 87, 91, 99, 105, 106, 107, 111, 115, 116, 118, 122, 123, 134, 136, 139, 140, 141, 146, 148, 156, 158, 170, 182, 185, 186, 189, 193, 194, 196, 199, 201, 202, 204, 213, 215, 218, 224, 228, 229, 234, 235, 237, 251, 256, 257, 258, 272, 277, 286, 295, 298, 301, 302, 303, 305, 307, 308, 314, 316, 323, 324, 326, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 349, 356, 357, 363, 366,
25 378, 381, 384, 386, 387, 389, 390, 391, 393 y 397, **caracterizada** por el hecho de que
- a) la o las alteraciones son independientemente
 - i) una inserción de un aminoácido debajo del aminoácido que ocupa la posición,
 - 30 ii) una delección del aminoácido que ocupa la posición, o
 - iii) una sustitución del aminoácido que ocupa la posición con un aminoácido diferente;
 - 35 b) cada posición corresponde a una posición de la secuencia de aminoácidos de la pectato liasa con la secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º 2;
 - c) la pectato liasa tiene al menos 95% de identidad a la secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º 2 y
 - 40 d) la variante tiene actividad de pectato liasa.
22. Método según la reivindicación 21, donde la o las alteraciones son sustituciones.
- 45 23. Método según la reivindicación 21 o 22 que comprende una o más sustituciones seleccionadas a partir del grupo que consisten en: H5R, E9G, N11Y, K26Q, S28T, S30F, S30P, S30T, H31N, N37D, Q40E, L45V, G46D, K47N, K47R, D48E, D48P, T49P, N50D, N50L, N50Y, N51Y, T52M, K54V, T61A, M64F, D68*, N69*, L70*, K71*, K71E, G74D, L75A, L75P, N76D, K79A, D86N, K87A, K87E, A91E, K99I, K99N, K99R, T105A, T105P, L106Q, E107K, A111E, K115A, K115I, K115N, K115Q, N116D, K118A, K118E, M122E, M122K, M122N, M122Q, V123I, S134L, T136S, K139E, K139F, K139I, K139M, K139N, K139S, I140V, V141G, V141E, V141L, V141N, Q146F, Q146H, Q146I, Q146V, K148E, K148Q, N156S, E158N, D170N, Q182D, Q182E, N185H, N186H, N189D, H193Y, I194V, I196V, C199N, C199S, F201L, N202K, G204R, K213E, K213N, K213T, F215Y, K218E, K218L, K218P, G224S, A228I, S229T, Y234H, I235V, M237I, F251I, S256C, K257E, K257N, T258I, L286Y, R272C, R272H, R272Y, V277D, G286A, Y295H, S298N, S301Y, S302A, D303S, A305P, S307R, Y308S, K314N, S316F, N323M, V324A, D326N, S331P, S331T, A332P, A333E, K334E, T335S, T335R, I336S, S337C, S337K, S337L, S337R, V338E, V338Y, F339I, S340A, S340K, S340N, S340P, S340Q, G341S, G349R, Q356H, I357V, N363S, S366N, T378G, T378S, A381D, H384N, K386P, K386R, S387A, V389I, I390N, I390T, S391N, A393V y K397D, y donde cada posición corresponde a una posición de la secuencia de aminoácidos de la pectato liasa con la secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º 2.
- 60 24. Composición de detergente o limpieza, preferiblemente una composición de lavado de lavandería o de vajillas, que comprende la variante tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-14 y además comprende un tensioactivo.
25. Composición según la reivindicación 24, que adicionalmente comprende una celulasa, una lipasa, una cutinasa, una oxidoreductasa, una proteasa, una amilasa, una hemicelulasa, tal como una mananasa, una xilanasas, una galactanasas, una arabinofuranosidasas, una esterasa, un liquenasa, una arabinanasas, otra pectato liasa o una mezcla de las mismas.

ES 2 359 381 T3

26. Uso de una variante de pectato liasa según cualquiera de las reivindicaciones 1-14 en una composición de detergente.

5 27. Uso de una variante de pectato liasa según cualquiera de las reivindicaciones 1-14 en el tratamiento de fibra celulósica y textil.

28. Método de descrudado enzimático, que comprende el contacto del material de la pared celular con la variante de pectato liasa definida en cualquiera de las reivindicaciones 1-14.

10 29. Método para la eliminación enzimática de material de pared celular de tejidos, que comprende el contacto del tejido con la variante de pectato liasa definida en cualquiera de las reivindicaciones 1-14.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 359 381 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Novozymes A/S
 <120> variantes de pectato liasa
 5 <130> 10190.010-DK
 <160> 2
 <170> PatentIn version 3,2
 10 <210> 1
 <211> 1200
 <212> ADN
 <213> *Bacillus subtilis*
 15 <220>
 <221> CDS
 20 <222> (1) .. (1200)
 <400> 1

| | | |
|----|---|-----|
| 25 | gct gat tta ggc cac cag acg tta gaa tca aat gat ggc tgg ggc gcg Ala Asp Leu Gly His Gln Thr Leu Glu Ser Asn Asp Gly Trp Gly Ala 1 5 10 15 | 48 |
| 30 | tac tcg acc ggc aca aca ggc gga tca aaa gct tcg tca tcc cac gtg Tyr Ser Thr Gly Thr Thr Gly Gly Ser Lys Ala Ser Ser Ser His Val 20 25 30 | 96 |
| 35 | tat acc gtc agc aac aga aac cag ctt gtc tcg gca tta ggc aag gac Tyr Thr Val Ser Asn Arg Asn Gln Leu Val Ser Ala Leu Gly Lys Asp 35 40 45 | 144 |
| 40 | acc aac aca acg cca aaa atc att tat att aag gga acg att gac atg Thr Asn Thr Thr Pro Lys Ile Ile Tyr Ile Lys Gly Thr Ile Asp Met 50 55 60 | 192 |
| 45 | aac gtc gat gac aat ctg aag cag ott ggt cta aat gat tat aaa gat Asn Val Asp Asp Asn Leu Lys Pro Leu Gly Leu Asn Asp Tyr Lys Asp 65 70 75 80 | 240 |
| 50 | cca gag tac gat ttg gac aaa tat ttg aaa gcc tat gac cct agc aca Pro Glu Tyr Asp Leu Asp Lys Tyr Leu Lys Ala Tyr Asp Pro Ser Thr 85 90 95 | 288 |
| 55 | tgg ggc aaa aag gag ccg tcg ggg aca cta gaa gag gcg aga gca cga Trp Gly Lys Lys Glu Pro Ser Gly Thr Leu Glu Glu Ala Arg Ala Arg 100 105 110 | 336 |
| 60 | tct cag aaa aat caa aaa gca cga gtc atg gtg gat att ccg gca aac Ser Gln Lys Asn Gln Lys Ala Arg Val Met Val Asp Ile Pro Ala Asn 115 120 125 | 384 |
| 65 | acg acg atc gtc ggt tca ggg aca aat gcc aaa atc gtg ggc gga aat Thr Thr Ile Val Gly Ser Gly Thr Asn Ala Lys Ile Val Gly Gly Asn 130 135 140 | 432 |

ES 2 359 381 T3

ttc cag atc aag agt gat aat gtc atc atc cgc aac atc gaa ttc cag 480
 Phe Gln Ile Lys Ser Asp Asn Val Ile Ile Arg Asn Ile Glu Phe Gln
 148 150 155 160

gat gct tac gat tat tct ccg caa tgg gat ccg act gac ggc agc tca 528
 Asp Ala Tyr Asp Tyr Phe Pro Gln Trp Asp Pro Thr Asp Gly Ser Ser
 165 170 175

gga aac tgg aac tca caa tac gac aac atc aca ata aac ggc ggc acg 576
 Gly Asn Trp Asn Ser Gln Tyr Asp Asn Ile Thr Ile Asn Gly Gly Thr
 180 185 190

cat ata tgg att gat cat tgt aca ttt aat gac ggt tcc cgt ccg gac 624
 His Ile Trp Ile Asp His Cys Thr Phe Asn Asp Gly Ser Arg Pro Asp
 195 200 205

agc aca tcg cca aag tat ttc ggc agc aaa tat cag cac cat gac ggc 672
 Ser Thr Ser Pro Lys Tyr Phe Gly Arg Lys Tyr Gln His His Asp Gly
 210 215 220

caa acc gat gct tct aac ggc gct aac tat atc acg atg tot tac aac 720
 Gln Thr Asp Ala Ser Asn Gly Ala Asn Tyr Ile Thr Met Ser Tyr Asn
 225 230 235 240

tat tat cac gat cat gat aaa agc tcc att ttc gga tca agc gac agc 768
 Tyr Tyr His Asp His Asp Lys Ser Ser Ile Phe Gly Ser Ser Asp Ser
 245 250 255

aaa aca tct gat gac ggc aaa tta aaa atc acg ctc cat cat aac cgc 816
 Lys Thr Ser Asp Asp Gly Lys Leu Lys Ile Thr Leu His His Asn Arg
 260 265 270

tat aaa aat atc gtc cag cgc gca ccg aga gtc cgc ttc ggc cag gtc 864
 Tyr Lys Asn Ile Val Gln Arg Ala Pro Arg Val Arg Phe Gly Gln Val
 275 280 285

cac gtt tac aac aac tat tat gaa ggc agc aca agc tcc tcg gat tat 912
 His Val Tyr Asn Asn Tyr Tyr Glu Gly Ser Thr Ser Ser Ser Asp Tyr
 290 295 300

ggc ttc agc tat gcg tgg gga atc gga aaa tca tot aaa atc tac gct 960
 Ala Phe Ser Tyr Ala Trp Gly Ile Gly Lys Ser Ser Lys Ile Tyr Ala
 305 310 315 320

caa aac aat gtc att gac gtg cct gga ctg tca gcc gct aaa acg atc 1008
 Gln Asn Asn Val Ile Asp Val Pro Gly Leu Ser Ala Ala Lys Thr Ile
 325 330 335

agc gta ttc agc ggc gga acg got tta tat gac tca ggc aca ttg ctg 1056
 Ser Val Phe Ser Gly Gly Thr Ala Leu Tyr Asp Ser Gly Thr Leu Leu
 340 345 350

aat ggc acg cag atc aac gca ccg got gca aac ggc ctg agt tot tot 1104
 Asn Gly Thr Gln Ile Asn Ala Ser Ala Ala Asn Gly Leu Ser Ser Ser
 355 360 365

gtc ggc tgg aca ccg tct ctg cac ggc aca atc gat gct tcc gcg cat 1152
 Val Gly Trp Thr Pro Ser Leu His Gly Thr Ile Asp Ala Ser Ala His
 370 375 380

gta aaa tcg aat gtt ata tct caa gcg ggt gcg ggt aaa tta aat taa 1200
 Val Lys Ser Asn Val Ile Ser Gln Ala Gly Ala Gly Lys Leu Asn
 385 390 395

65 <210> 2
 <211> 399

ES 2 359 381 T3

<212> PRT

<213> *Bacillus subtilis*

5 <400> 2

10 Ala Asp Leu Gly His Gln Thr Leu Glu Ser Asn Asp Gly Trp Gly Ala
 1 5 10 15

15 Tyr Ser Thr Gly Thr Thr Gly Gly Ser Lys Ala Ser Ser Ser His Val
 20 25 30

20 Tyr Thr Val Ser Asn Arg Asn Gln Leu Val Ser Ala Leu Gly Lys Asp
 35 40 45

25 Thr Asn Thr Thr Pro Lys Ile Ile Tyr Ile Lys Gly Thr Ile Asp Met
 50 55 60

30 Asn Val Asp Asp Asn Leu Lys Pro Leu Gly Leu Asn Asp Tyr Lys Asp
 65 70 75 80

35 Pro Glu Tyr Asp Leu Asp Lys Tyr Leu Lys Ala Tyr Asp Pro Ser Thr
 85 90 95

40 Trp Gly Lys Lys Glu Pro Ser Gly Thr Leu Glu Glu Ala Arg Ala Arg
 100 105 110

45 Ser Gln Lys Asn Gln Lys Ala Arg Val Met Val Asp Ile Pro Ala Asn
 115 120 125

50 Thr Thr Ile Val Gly Ser Gly Thr Asn Ala Lys Ile Val Gly Gly Asn
 130 135 140

55 Phe Gln Ile Lys Ser Asp Asn Val Ile Ile Arg Asn Ile Glu Phe Gln
 145 150 155 160

60 Asp Ala Tyr Asp Tyr Phe Pro Gln Trp Asp Pro Thr Asp Gly Ser Ser
 165 170 175

65 Gly Asn Trp Asn Ser Gln Tyr Asp Asn Ile Thr Ile Asn Gly Gly Thr
 180 185 190

ES 2 359 381 T3

His Ile Trp Ile Asp His Cys Thr Phe Asn Asp Gly Ser Arg Pro Asp
 195 200 205
 5
 Ser Thr Ser Pro Lys Tyr Phe Gly Arg Lys Tyr Gln His His Asp Gly
 210 215 220
 10
 Gln Thr Asp Ala Ser Asn Gly Ala Asn Tyr Ile Thr Met Ser Tyr Asn
 225 230 235 240
 15
 Tyr Tyr His Asp His Asp Lys Ser Ser Ile Phe Gly Ser Ser Asp Ser
 245 250 255
 20
 Lys Thr Ser Asp Asp Gly Lys Leu Lys Ile Thr Leu His His Asn Arg
 260 265 270
 25
 Tyr Lys Asn Ile Val Gln Arg Ala Pro Arg Val Arg Phe Gly Gln Val
 275 280 285
 30
 His Val Tyr Asn Asn Tyr Tyr Glu Gly Ser Thr Ser Ser Ser Asp Tyr
 290 295 300
 35
 Ala Phe Ser Tyr Ala Trp Gly Ile Gly Lys Ser Ser Lys Ile Tyr Ala
 305 310 315 320
 40
 Gln Asn Asn Val Ile Asp Val Pro Gly Leu Ser Ala Ala Lys Thr Ile
 325 330 335
 45
 Ser Val Phe Ser Gly Gly Thr Ala Leu Tyr Asp Ser Gly Thr Leu Leu
 340 345 350
 50
 Asn Gly Thr Gln Ile Asn Ala Ser Ala Ala Asn Gly Leu Ser Ser Ser
 355 360 365
 55
 Val Gly Trp Thr Pro Ser Leu His Gly Thr Ile Asp Ala Ser Ala His
 370 375 380
 60
 Val Lys Ser Asn Val Ile Ser Gln Ala Gly Ala Gly Lys Leu Asn
 385 390 395
 65