

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 377 629**

51 Int. Cl.:
C12N 9/42 (2006.01)
C12P 19/14 (2006.01)
C11D 3/386 (2006.01)
D06M 16/00 (2006.01)
D21C 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **97909913 .2**
96 Fecha de presentación: **30.09.1997**
97 Número de publicación de la solicitud: **0932688**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **04.08.1999**

54 Título: **Celulasa de Chrysosporium y métodos de uso**

30 Prioridad:
10.10.1996 US 731170

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
29.03.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
29.03.2012

73 Titular/es:
**DYADIC INTERNATIONAL (USA), INC.
140 INTRACOASTAL POINTE DRIVE, SUITE 404
JUPITER, FL 33477, US**

72 Inventor/es:
**EMALFARB, Mark, Aaron;
SOLOVJEVA, Irina Vladimirovna;
BEN-BASSAT, Arie;
BURLINGAME, Richard, P.;
CHERNOGLAZOV, Vladimir Mikhaylovich;
OKOUNEV, Oleg Nicolaevich;
OLSON, Philip, T. y
SINITSYN, Arkady Panteleimonovich**

74 Agente/Representante:
Tomas Gil, Tesifonte Enrique

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).

ES 2 377 629 T3

DESCRIPCIÓN

Celulasa de *Chrysosporium* y métodos de uso

5 Campo de la invención

[0001] Esta invención se refiere a celulasas neutras y/o alcalinas y métodos nuevos para la producción de estas. Más específicamente, esta invención se refiere a celulasas producidas por hongos del género *Chrysosporium* y cepas particulares de *Chrysosporium lucknowense*. Esta invención también se refiere a usos industriales para estas celulasas neutras o alcalinas y composiciones que las comprenden.

Antecedentes de la invención

15 [0002] Ropa hecha de tejidos celulósicos, como algodón, lino, cáñamo, ramio, cupro, *lyocel*, *newcell*, rayón, polinósicas, son muy populares. De interés particular son prendas de ropa, como pantalones vaqueros hechos de tejidos de tela vaquera teñidos de azul índigo hechos de algodón o mezclas de algodón. Estas prendas de ropa se cosen típicamente de tela cortada y dimensionada y tienden a ser rígidas debido a la presencia de composiciones de encolado. En otros casos, las fibras o rollos de tejido se tratan con enzimas antes de la costura de la prenda final. Después de un periodo de desgaste, las prendas de ropa pueden desarrollar un cierto grado de blandura, una reducción total de matiz, al igual que áreas de variación de color localizadas. Además, después de lavados repetidos la prenda continúa para proporcionar un ajuste más cómodo, una sensación más suave y una apariencia gastada. En los últimos años tal comodidad, sensación y apariencia han llegado a ser cada vez más populares.

25 [0003] Los métodos más difundidos para producir esta comodidad, sensación y apariencia implican lavado de prendas de ropa con celulasas en lavadoras grandes con piedras pómez u otros abrasivos. La piedra pómez ayuda a suavizar el tejido y ayuda a proporcionar la superficie descolorida similar a la que se produce por el desgaste extendido del tejido. No obstante, el uso de pómez tiene algunas desventajas. Por ejemplo, la piedra pómez debe quitarse manualmente de prendas de ropa procesadas porque tiende a acumularse en bolsillos, en superficies interiores, en dobleces y en pliegues. También, las piedras pómez pueden causar daño de sobrecarga en motores eléctricos de lavadoras de piedra y obstruir los pasos de drenaje de la máquina y líneas de drenaje. Este tratamiento y problemas de equipamiento se pueden añadir significativamente al coste de hacer negocio y al precio de compra de los productos.

35 [0004] Vistos los problemas del uso de piedra pómez, métodos alternativos al uso de la piedra pómez u otros abrasivos en el proceso de lavado a la piedra se han presentado. Una alternativa implica el uso de tratamientos enzimáticos que descomponen la celulosa en tejidos (Geller patente estadounidense nº 4,951,366; Olson patentes US nº 4,832,864, 4,912,056, Olson et al. Patentes nº 5,006,126, 5,122,159 y 5,213,581, Christner et al. patente U.S. nº 4,943,530, Boegh et al. Patente U.S. nº 4,788,682). Métodos para el tratamiento de la celulosa con tejidos con enzimas hidrolíticas, como celulasas, se conocen en la técnica para mejorar la suavidad o sensación de estos tejidos (*Novo Brochure Cellulase SP 227*; *Novo Brochure Celluzyme*; Murata patente estadounidense nº 4,443,355; Parslow patente estadounidense nº 4,661,289; Tai patente estadounidense nº 4,479,881; Barbesgaard patente estadounidense nº 4,435,307; Browning patente UK nº 1,368,599).

45 [0005] Celulasas se conocen en la técnica como sistemas enzimáticos que hidrolizan celulosa (enlaces β -1,4-glucano), dando así como resultado la formación de glucosa, celobiosa, celo-oligosacáridos y similares. Composiciones de celulosa se componen de diferentes componentes enzimáticos, incluyendo aquellos identificados como exo-celobiohidrolasas, endoglucanasas y β -glucosidasas. Por otra parte, estas clases de enzimas pueden separarse además en isoenzimas individuales.

50 [0006] El sistema de celulosa completo se requiere para convertir eficazmente celulosa cristalina en glucosa. Generalmente, si se necesita hidrólisis total de un sustrato de celulosa, la mezcla de celulosa debería contener β -glucosidasas y celobiohidrolasas, al igual que endoglucanasas. La endoglucanasas catalizan hidrólisis aleatoria de enlaces β -1,4-glicosídicos entre unidades de glucosa de polímeros de celulosa. Estos componentes hidrolizan derivados químicos de la celulosa solubles como carboximetilcelulosa, reduciendo así la viscosidad de estas soluciones. Estos componentes enzimáticos actúan en regiones internas del polímero, provocando una reducción rápida en la longitud de cadena media del polímero junto con un aumento lento en el número de extremos de reducción. La reducción rápida en la longitud de cadena media del polímero de celulosa se pone de manifiesto por la reducción en la viscosidad de una solución de celulosa.

60 [0007] La especificidad de sustrato y modo de acción de las celulasas diferentes varía entre cepas de organismos que producen celulasas. Por ejemplo, el mecanismo habitualmente aceptado de acción de celulasa en la celulosa del hongo *Trichoderma reesei* es que la actividad de endoglucanasa primero rompe los enlaces β -1,4-glucosídicos internos en regiones de cristalinidad baja de la celulosa (Ruohnen L., et al. en: "Proceedings of the Second Tricel Symposium on Trichoderma Reesei Cellulases and Other Hydrolases", (ed. por P. Sudminen and T. Reinkainen) Foundation for Biotechnology and Industrial Fermentation Research 8; (1993):87-96) la actividad de celobiohidrolasa se une preferentemente a las regiones cristalinas del extremo no-reducido de la celulosa para liberar celobiosa como producto

primario. β -glucosidasa o actividades de celobiasa luego actúan en celo-oligosacáridos, por ejemplo, celobiosa, para dar glucosa como único producto.

[0008] Las celulasas se producen en hongos, bacterias y otros microbios. Los hongos típicamente producen un sistema de celulasa completo capaz de degradar formas cristalinas de celulosa. Por ejemplo, *Trichoderma reesei* produce y secreta todas las actividades enzimáticas necesitadas para descomposición eficaz de celulosa cristalina, llamada endo-1,4- β -D-glucanasas, celobiohidrolasas (exo-1,4- β -D-glucanasas) y 1,4- β -D-glucanasas, o β -glucosidasas. Las celulasas fúngicas tienen una ventaja añadida en que las celulasas en hongos pueden producirse fácilmente en cantidades grandes por medio de procedimientos de fermentación.

[0009] La celulasas, o sus componentes, se conocen en la técnica por ser útiles en una variedad de aplicaciones industriales textiles, además del proceso de lavado a la piedra. Por ejemplo, celulasas se usan en composiciones detergentes, con motivo de aumentar la capacidad de limpieza de la composición, como agente suavizante, para abrillantado de color, defrisado y otros usos. Cuando se usa así, la celulasa degradará una parte del material celulósico, por ejemplo, tejido de algodón, en el lavado, que facilita la limpieza y/o suavizado del tejido. Los componentes de endoglucanasa de celulasas fúngicas también se han usado para los fines de aumentar la capacidad de limpieza de composiciones detergentes, para uso como agente suavizante y para uso en mejora en la sensación de los tejidos de algodón y similares. No obstante, hay un problema usando la celulasa derivada de *Trichoderma spp.* y especialmente *Trichoderma longibrachiatum* en composiciones detergentes. Generalmente, estos componentes tienen su actividad máxima a pHs ácidos mientras que la mayoría de las composiciones de detergente para ropa se formulan para uso a condiciones alcalinas o neutras.

[0010] Otras aplicaciones textiles en las que las celulasas se han usado incluyen suavizado (Browning, patente UK n° 1,368,599, Parslow, patente U.S. n° 4,661,289, Tai patente U.S. n° 4,479,881 y Barbesgaard, patente U.S. n° 4,435,307), defibrillation (Gintis, D. Mead, E.J., *Textile Research Journal*, 29, 1959; Cooke, W.D., *Journal Of The Textile Research Institute*, 74, 3, 1983; Boegh, European Patent Application n° 0 220 016). Las celulasas también se han usado en combinación con un agente polimérico en un proceso para suministrar variación localizada en la densidad de color de las fibras. (WO/94/19528 y WP/94/1529).

[0011] Las celulasas se clasifican en la industria de la confección textil según su intervalo de pH de operación. Celulasas ácidas típicamente tienen su actividad de valor máximo a valores de pH de aproximadamente 4,0 a 5,5 y menos, celulasas neutras a sobre pH 5,5 a 7,5 y celulasas alcalinas a sobre pH 7,5 a 11,0. Algunas composiciones enzimáticas pueden tener intervalos más amplios de operación. Por ejemplo, las celulasas neutro/alcalinas puede operar a pH ácido, alcalino y neutro a entre de sobre 40°C a 60°C.

[0012] Celulasas ácidas, neutras y alcalinas se usan típicamente en el tratamiento "lavado a la piedra" de pantalones vaqueros de tela vaquera, con o sin tensioactivos, tampones, detergentes, agentes de anti-reposición, agentes suavizantes, piedras pómez u otros abrasivos, blanqueadores, como blanqueadores ópticos, enzimas, u otros medios.

[0013] Si la composición de celulasa no está formulada y/o pretamponada luego para celulasas ácidas, el pH es típicamente ajustado a entre pH 4,5 - 5,5, con, por ejemplo, un citrato sódico y tampón de ácido cítrico, y para celulasas alcalinas o neutras entre 5,5 - 7,5 con, por ejemplo, un tampón de fosfato disódico y monosódico. Celulasas alcalinas y neutras se usan típicamente como aditivos para detergentes de lavandería donde el pH de operación puede variar de sobre pH 7,0 a 11,5. En las celulasas de ácido típicas de aplicaciones de lavado a la piedra generalmente se proporcionan pérdida de contraste superior o reposición del tinte de índigo y pérdida de resistencia del tejido superior, mientras las celulasas alcalinas y neutras típicas generalmente proporcionan menos abrasión, pérdida de contraste inferior o reposición y menos pérdida de resistencia del tejido.

[0014] Las celulasas neutro/alcalinas son el tipo más preferido de celulasas para la industria de lavado a la piedra porque causan niveles inferiores de pérdida de contraste o reposición y pérdida de resistencia inferior que las celulasas ácidas (es decir, de *Trichoderma sp.*). Además, las celulasas neutro/alcalinas, a diferencia de sus equivalentes ácidos, operan en un intervalo de pH mucho más amplio y son capaces de mantener mejor rendimiento de lavado relativo dentro de un intervalo de pH más amplio (pH 5,0 - pH 8,0) en la industria de lavado a la piedra. Por lo tanto, las celulasas neutro/alcalinas proporcionan diferentes ventajas. Primero, el agua de alimentación entrante en las instalaciones de tratamiento mojadas está típicamente dentro de este intervalo de pH que reduce la necesidad de un control tan preciso de pH en comparación con celulasas ácidas. Esto hace el proceso de lavado a la piedra más tolerante a error del operador pH o a negligencia de dejar el procedimiento en general que en procedimientos que usan celulasas ácidas. En segundo lugar, se conoce que tejidos de tela vaquera son alcalinos en la naturaleza debido al hecho de que el proceso de teñido utiliza soda cáustica. Simplemente lavando la tela vaquera libera este cáustico en el agua de lavado y el pH del agua de lavado generalmente aumenta. La alcalinidad puede superar los tampones de baño, pero el efecto de pH aumentado es menos severo en celulasas neutro/alcalinas en comparación con celulasas ácidas porque las celulasas neutro/alcalinas operan no solo a pH más alto, sino también sobre un intervalo de pH más amplio.

[0015] El amplio espectro de usos industriales para celulasas o los componentes de celulasas, celulasas neutras y/o especialmente alcalinas, establece una necesidad clara para celulasas que son operativas a pH neutro y/o alcalino. La

presente invención proporciona un procedimiento para la producción de celulosas neutro/alcalinas con actividad enzimática a pH alcalino y/o neutro y composiciones que comprenden éstas.

Resumen de la invención

5

[0016] Esta invención se refiere, en general, a celulosas neutras y/o alcalinas y métodos nuevos para la producción de estas. Más específicamente, la presente invención proporciona un método para la producción de composiciones de celulosa de hongos del género *Chrysosporium* y *Chrysosporium lucknowense* en particular, donde las composiciones de celulosa tienen actividad enzimática a pH alcalino y/o neutro. Aplicaciones industriales para la composición de celulosa se proporcionan también.

10

[0017] Aquí se describen cultivos de tipo salvaje aislados y purificados y hongos mutantes del género *Chrysosporium* capaces de producir composiciones de celulosa alcalinas y/o neutras, en particular, a la cepa *Chrysosporium lucknowense* - GARG 27K y mutaciones de ésta.

15

[0018] Aquí se describen condiciones de cultivo para producir celulosas neutras o alcalinas de hongos del género *Chrysosporium*.

20

[0019] Aquí se describen métodos para la producción de una composición de celulosa alcalina y/o neutra a través de tecnología recombinante de hongos del género *Chrysosporium*.

[0020] Aquí descritos métodos para la generación y cultivo de cepas mutantes del género de hongos *Chrysosporium* capaces de producir celulosa alcalina y/o neutra se proporcionan.

25

[0021] Aquí se describen las secuencias de ácidos nucleicos que codifican las enzimas de las composiciones de celulosas producidas por *Chrysosporium* o cepas genéticamente modificadas de *Chrysosporium*.

[0022] Aquí se describen enzimas aisladas y se purifican de las composiciones de celulosa producidas por *Chrysosporium* o cepas genéticamente modificadas de *Chrysosporium*.

30

[0023] Aquí descritos métodos de uso se proporcionan para celulosas neutras y/o alcalinas producidas por *Chrysosporium* en aplicaciones textiles, como suavizado, blanqueo y procedimientos de lavado a la piedra, aplicaciones de teñido de prenda, desfibrilación, o biopolido, abrillantado del color y defrisado.

35

[0024] Otra forma de realización de esta invención se refiere a composiciones detergentes comprendiendo celulosa de *Chrysosporium* en preparaciones detergentes.

[0025] Otra forma de realización de esta invención es proporcionar métodos de uso para las composiciones de celulosa en la sacarificación de biomasa de lignocelulosa de agricultura, productos forestales, desperdicios sólidos municipales y otras fuentes.

40

[0026] Aún otras formas de realización de esta invención implican el uso de las composiciones de celulosa para la producción de combustibles y otros productos químicos para el bioblanqueo de pulpa de madera y para destintando del papel de impresión reciclado.

45

Descripción detallada de la invención

[0027] Como se utiliza aquí, referencia a una "celulosa neutro-alcalina" se refiere a una composición de celulosa que conserva actividad enzimática significativa a valores de pH de aproximadamente 5,5 y por encima. En una forma de realización preferida, las composiciones de celulosa alcalinas y/o neutras de la presente invención tienen actividad enzimática de valor máximo entre de sobre pH 5,5 a sobre 7,5 a de 40°C a sobre 60°C. En el evento que la actividad enzimática de valor máximo está a un pH inferior a sobre 5,5, la composición de celulosa neutro-alcalina tendrá al menos sobre un 50% de la actividad enzimática óptima a de sobre pH 6,0 a sobre 7,0 a de sobre 40°C a sobre 60°C. Por ejemplo, estas actividades se pueden medir por RBBCMCasa, CMCasa, Cellzyme, endoviscométrico o actividad de papel de filtro (FPA).

50

Así, las composiciones de celulosa de la presente invención tendrán actividad enzimática útil a pHs mayores de 5,5, de manera que la composición enzimática se puede usar en el lavado a la piedra, detergente, destintado u otras aplicaciones donde la actividad de celulosa alcalina y/o neutra se necesita.

60

[0028] La presente invención se refiere a composiciones de celulosas con actividad alta a pH alcalino o neutro y a métodos únicos para la producción de dichas composiciones de celulosa alcalinas y neutras. Las composiciones de celulosa neutro/alcalinas de esta invención se pueden obtener de *Chrysosporium lucknowense* GARG 27K (designado aislado C1) depositado bajo el tratado de Budapest con la International Depository at the All-Russian Collection of Microorganisms of the Russian Academy of Sciences, Bakhrushina St. 8: Moscow, Russia 113184, el 29 de agosto 29, 1996, y número de acceso asignado VKM F-3500D. Las composiciones de celulosa de la presente invención son

65

altamente ventajosas porque estas poseen actividad enzimática a pH neutro y/o alcalino por lo tanto proporcionan características de rendimiento provechosas en aplicaciones industriales.

5 [0029] Las composiciones de celulasa obtenidas a partir de cepas fúngicas de la presente invención que muestran actividad a entre de sobre pH 5,0 a sobre 12,0 a entre de sobre 40° a 60°C como determinado por ensayos de actividad de CMCasa, RBBCMCasa, Cellazyme, endoviscométrico o papel de filtro (FPA). En una forma de realización preferida para un procedimiento de lavado a la piedra, la composición de celulasa puede tener actividad óptima a entre de sobre pH 5,5 a 7,0 a de sobre 40°C a sobre 60°C. Actividad de rendimiento buena a pH alcalino y neutro (es decir: 6,0; 7,0 y 8,0) ha demostrado para las celulasas alcalinas y/o neutras de la presente invención en los ensayos de aplicación de lavado a la piedra y a pH 10,0 y mayor para ensayos de aplicación de detergentes.

15 [0030] Los procedimientos de fermentación para microorganismos celulolíticos de cultivo para la producción de celulasa se conocen en la técnica. Por ejemplo, sistemas de celulasa pueden producirse o bien por cultivo sólido o sumergido, incluyendo estado sólido, lote, lote alimentario y procesos de flujo continuo. La recogida y purificación de los sistemas de celulasa del caldo de fermentación pueden efectuarse también por procedimientos conocidos en la técnica. La composición de celulasa se aísla fácilmente del cultivo fúngico por, por ejemplo, centrifugado o pasos de filtración y concentración del filtrado por medio de membrana o equipamiento de ultrafiltración de fibras vacías.

20 [0031] La cepa fúngica de *Chrysosporium* usada para producir las composiciones de celulasa de la presente invención se pueden cultivar según métodos estándar y condiciones conocidas en la técnica. En una forma de realización preferida, la composición de celulasa de la presente invención se obtiene de la cepa C1. La cepa C1 de *Chrysosporium* puede crecer en un medio con sales inorgánicas, fuentes de nitrógeno orgánico, como peptonas, harina de semilla de algodón desgrasada, extracto soluble de maíz, o extracto de levadura y fuente de carbono. Ejemplos de fuente de carbono incluyen, pero no están limitados a, glucosa, lactosa, sacarosa, celulosa u otros carbohidratos. Más preferiblemente, la cepa fúngica se cultiva en medios con ambas lactosa y peptona o lactosa y extracto de levadura. Por ejemplo, los medios de fermentación pueden componer lactosa en de sobre 0,3% a sobre 1,0%, preferiblemente de sobre 0,5% a sobre 0,6%, peptona a de sobre 0,3% a sobre 1,0%, preferiblemente de sobre 0,5% a sobre 0,6%. Otras fuentes de nitrógeno y fuentes de carbohidrato conocidas en la técnica se pueden utilizar en los medios de crecimiento fúngicos incluyendo, pero no limitado a, pulpa de remolacha dulce, malta de cebada, salvado de trigo y otros conocidos en la técnica. Por ejemplo, concentrado de pulpa de remolacha dulce se puede usar en un intervalo de aproximadamente de 15 a sobre 30 gramos/litro (g/L), preferiblemente de sobre 20 a sobre 25 g/L; malta de cebada se puede usar en un intervalo de sobre 10 g/L a sobre 20g/L, preferiblemente de sobre 14 g/L o sobre 16g/L, moldura de trigo se puede utilizar en un intervalo de sobre 3g/L para sobre 8g/L, preferiblemente de sobre 5g/L para sobre 6 g/L. En una forma de realización, la cepa C1 se cultiva en frascos de agitación rotados en el medio de solución salina con pulpa de remolacha dulce, malta de cebada y salvado de trigo. Composiciones de celulasa se pueden aislar de hongos cultivados de sobre 3 a 7 días en un medio de crecimiento por centrifugado y concentración de ultrafiltración del medio de cultivo celular.

40 [0032] Alternativamente los cultivos de *Chrysosporium* se pueden cultivar a gran escala para uso comercial, usando técnicas de fermentación convencionales. En este contexto, la fermentación se usa aproximadamente para referirse a cualquier condición de cultivo fúngica controlada. Antes de la escala grande de crecimiento, un inóculo de dicho cultivo de crecimiento generalmente se cultiva. Los medios de inóculo pueden contener ingredientes convencionales incluyendo, pero no limitado a, fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno orgánico y sales inorgánicas. Fuentes de carbono pueden incluir, pero de forma no limitativa, glucosa, lactosa, glicerol, y/o celulosa en concentraciones en el intervalo de aproximadamente 0,5 a 200 g/L, más preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 5 a 50 g/L. Fuentes de nitrógeno orgánico pueden incluir, pero de forma no limitativa, extracto de levadura, peptona, o harina de semilla de algodón desgrasada en concentraciones en el intervalo de aproximadamente 0,5 a 30 g/L, más preferiblemente en el intervalo de 5 a 15 g/L. Sales inorgánicas pueden incluir, pero de forma no limitativa, fosfato potásico, por ejemplo, a de sobre 0,01 a sobre 10 g/L, sulfato de magnesio, por ejemplo, a de sobre 0,01 a 3,0 g/L, sulfato ferroso, por ejemplo, a de sobre 0,001 a 10 mg/L.

55 [0033] Un inóculo o un cultivo iniciador se pueden utilizar para iniciar el cultivo de *Chrysosporium* en una fermentadora por métodos conocidos en la técnica. Los medios usados para fermentación pueden comprender ingredientes convencionales para hongos de cultivo, incluyendo, pero no limitado a, celulosa, fuentes de nitrógeno orgánico, cloruro de magnesio y cloruro de calcio. Ejemplos de fuentes de nitrógeno orgánico incluyen, pero de forma no limitativa, peptona o harina de semilla de algodón desgrasada, como Pharmamedia.

60 [0034] Por ejemplo, los medios pueden comprender de sobre 5g/l a sobre 20 g/L de peptona o harina de semilla de algodón desgrasada, de sobre 10g/L a sobre 30g/L de celulosa, de sobre 0,03 g/L a sobre 0,06 g/L de heptahidrato de sulfato de magnesio y de sobre 0,4 g/L a sobre 0,8 g/L de cloruro de calcio dihidratado.

65 [0035] Un experto en la técnica apreciará que durante la fermentación la temperatura, oxigenación, pH y niveles de nutrientes de la mezcla de fermentación deberían mantenerse. Por ejemplo, niveles de oxígeno disuelto deberían mantenerse a de sobre 10 a 60% de saturación del aire, preferiblemente a de sobre 20 a 40% de saturación del aire. El pH debería mantenerse entre sobre 5 y 8, preferiblemente entre sobre 6,5 y 7,5, de la forma más preferida entre 6,9 y 7,1 y la temperatura se puede mantener a de entre sobre 25°C a sobre 40°C, preferiblemente a de sobre 28°C a 35°C.

La solución de alimentación puede comprender ingredientes similares a los medios de fermentación, pero a concentraciones más altas para minimizar la dilución cuando se añade a los medios de fermentación.

[0036] Las composiciones de celulasa producidas según los métodos de la presente invención son útiles para una variedad de otras aplicaciones para las que la actividad de celulasa, en particular, actividad de celulasa alcalina y/o neutra, se necesita. En una forma de realización de esta invención, las composiciones de celulasa alcalinas y/o neutras se pueden usar en los procedimientos de lavado a la piedra para pantalones vaqueros de tela vaquera. Por ejemplo, el margen de pH más preferido de aplicaciones de lavado a la piedra se sitúa entre de sobre 5,5 a 7,5, de forma más preferida a de sobre pH 6 a sobre 7. La composición de celulasa alcalina y/o neutra obtenida de aislados de *Chrysosporium* tiene ventajosamente actividad enzimática significativa a o por encima de pH neutro o alcalino. Procedimientos de lavado a la piedra llevados a cabo con celulasa alcalina y/o neutra que se ejecutan a pH alcalino y/o neutro son particularmente ventajosos comparados con procedimientos tradicionales que usan celulasas ácidas (por ejemplo: aquellos de *Trichoderma reesei*) debido a niveles inferiores de pérdida de contraste en las prendas, menos pérdida de resistencia en las prendas y la alcalinidad del agua que está presente naturalmente durante este proceso. Estos procedimientos de lavado a la piedra suponen pantalones vaqueros con sensación y apariencia altamente deseables. Por ejemplo, de 0,02 a 10g de preparación con celulasa 47.0528 descrita aquí, se pueden utilizar por 135g de tela vaquera. Un experto en la técnica sabrá regular la cantidad o concentración de la composición de celulasa producida por esta invención basada en tales factores como la actividad de la celulasa y las condiciones de lavado, incluyendo, pero no limitado a, temperatura y pH.

[0037] En otra forma de realización de esta invención, las composiciones de celulasa de esta invención pueden utilizarse para reducir o eliminar la aspereza asociada a tejidos hechos de celulosa por adición a composiciones detergentes. Por ejemplo, el intervalo preferido para composiciones detergentes se sitúa entre de sobre pH 8 a sobre 12, de forma más preferida de pH 10 a sobre 11. Las composiciones de celulasa de la presente invención se pueden usar en composiciones detergentes a pH neutro y/o alcalino. Ingredientes detergentes contemplados para uso con la composición de celulasa de la presente invención incluyen cualquier ingrediente detergente conocido en la técnica. Ejemplos de tales ingredientes incluyen, pero de forma no limitativa, detergentes, tampones, tensioactivos, blanqueadores, suavizantes, solventes, agentes formadores de sólidos, abrasivos, álcalis, electrolitos inorgánicos, activadores de celulasa, antioxidantes, constructores, silicatos, conservantes, y estabilizadores, y se conocen en la técnica. Las composiciones detergentes de esta invención preferiblemente emplean un agente activo de superficies, es decir, tensioactivo, incluyendo tensioactivos aniónicos, no iónicos y anfólicos bien conocidos para su uso en composiciones detergentes. Además de los componentes de celulasa y el agente activo de superficie, las composiciones detergentes de esta invención pueden contener además uno o más de los siguientes componentes: enzimas amilasas, celulasas, proteinasa, lipasas, óxido-reductasas, peroxidasas y otras enzimas; tensioactivos catiónicos y ácidos grasos de cadena larga; constructores; agentes anti-redeposición; blanqueadores; agentes de azulado y tintes fluorescentes; inhibidores de incrustado; agentes secuestrantes para inhibición de factores de la actividad de celulasa; activadores de celulasa; antioxidantes; y solubilizantes. Además, perfumes, conservantes, tintes y similares pueden usarse, si se desea, con las composiciones detergentes de esta invención. Ejemplos de composiciones detergentes que utilizan celulasas se ejemplifican en las patentes nº 4,435,307, 4,443,355, 4,661,289, 4,479,881, 5,120,463, que se incorporan aquí como referencia.

[0038] Cuando una base detergente usada en la presente invención está forma de polvo, puede ser una que se prepara por cualquier método de preparación conocido que incluye un método de secado por pulverización y/o un método de granulación. Los métodos de granulación son los más preferidos debido a la naturaleza sin polvo de gránulos en comparación con productos de pulverización secos. La base detergente obtenida por el método de secado por pulverización está vacío de gránulos que son obtenidos pulverizando una solución acuosa de ingredientes termorresistentes, como agentes activos de superficie y constructores, en un espacio caliente. Los gránulos tienen un tamaño de sobre 50 a sobre 2000 micrómetros. Después del secado por pulverización, perfumes, enzimas, blanqueadores, y/o constructores inorgánicos alcalinos pueden añadirse. Con una base de detergente granulosa muy densa obtenida por este método de secado de granulación de pulverización, varios ingredientes pueden añadirse también después de la preparación de la base. Cuando la base detergente es un líquido, puede ser o bien una solución homogénea o una solución inhomogénea.

[0039] Las composiciones de celulasa de esta invención preferiblemente muestran niveles altos de actividad a pH neutro o alcalino, pero también pueden mostrar actividad enzimática a pH ácido. Por lo tanto, las composiciones detergentes comprendiendo las celulasas de la presente invención se pueden usar en un intervalo de pH ancho de pH ácido a alcalino.

[0040] Otras aplicaciones textiles en las que estas composiciones de celulasa pueden utilizarse incluyen, pero de forma no limitativa, aplicaciones de teñido de prendas incluyendo, pero no limitado a, mercerización enzimática de viscosa, aplicaciones de biopulido, pulido de superficie enzimática; biolavado (lavado o lavado bajo tratamiento de materiales textiles), microfibrilación enzimática, "algodonización" enzimática de lino, ramio y cáñamo; y tratamiento de *Lyocel* o *Newcell* (es decir; "TENCEL" de del Courtauld's), cupro y otras fibras celulósicas o prendas, eliminación de tinte de sustratos teñidos celulósicos como algodón teñido (Leisola & Linko - (1976) *Analytical Biochemistry*, v. 70, p. 592. Determinación de la actividad de solubilización de un complejo de celulasa con sustratos teñidos; Blum & Stahl - *Enzymic Degradation Of Cellulose Fibers; Reports of the Shizuoka Prefectural Hamamatsu Textile Industrial Research*

Institute No. 24 (1985), como un blanqueante para hacer parecer a tela vaquera nueva teñida de índigo vieja (Fujikawa - Japanese Patent Application Kokai nº 50-132269), para mejorar la acción blanqueadora de agentes blanqueadores (Suzuki - patente Great Britain Patent nº 2 094 826), y en un proceso para composiciones para descolado enzimático y blanqueo de tejidos (Windbichtler et al., patente U.S. nº 2,974,001. Otro ejemplo de descolado enzimático usando celulasas se proporciona en Bhatawadekar (Mayo 1983) *Journal of the Textile Association*, pages 83-86.

[0041] En otras formas de realización industriales, las composiciones de celulasa se pueden usar en la sacarificación de biomasa de lignocelulosa de agricultura, productos forestales, desperdicios sólidos municipales y otras fuentes, para la producción de combustibles y otros productos químicos a través de fermentación, para bioblanqueo de pulpa de madera y para desentintado de papel de impresión de reciclaje, todos por métodos conocidos por un experto en la técnica.

[0042] En otra forma de realización de la presente invención, distintos componentes de las composiciones de celulasa alcalinas y neutras se pueden aislar y usar independientemente la una de la otra. Componentes específicos o composición de celulasa enriquecida con determinados componentes de celulasa se pueden producir o aislar por medios físicos y químicos de mutantes o específicamente producidos por métodos de ingeniería genética. El sistema de celulasa se puede purificar en componentes separados por cromatografía de intercambio iónico incluyendo técnicas de separación reconocidas en la técnica a un pH adecuado, cromatografía de afinidad, cromatografía de exclusión de tamaño y similares. Por ejemplo, en la cromatografía de intercambio iónico, es posible separar los componentes de celulasa por elución con un gradiente de pH, o un gradiente de sal, o ambos. Estas separaciones pueden hacerse por expertos en la técnica con el beneficio de las instrucciones proporcionadas aquí.

[0043] Una vez los componentes enzimáticos individuales de la composición de celulasa se fraccionan y aíslan, las proteínas pueden ordenarse parcialmente o microsecuenciarse a ADN sintético de diseño o sondas para aislar el gen que codifica las proteínas enzimáticas de interés. Generalmente la secuencia amino terminal de la proteína se determina por métodos de secuenciación de proteínas convencionales o por secuencia automatizada (Ausubel et al., (1987) in "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons. New York. New York). Alternativamente, otras regiones de la proteína se pueden ordenar en combinación con escisión química o escisión enzimática y técnicas de separación de proteína. (Ausubel et al., (1987) en "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons. New York. New York).

Un experto en la técnica entenderá que los clones de ADN sintéticos o sondas se pueden usar en las técnicas de clonación de rutina para aislar los genes correspondientes a las enzimas presentes en las composiciones de celulasa neutro/alcalinas producidas por *Chrysosporium*.

[0044] Se entenderá por un experto en la técnica que secuencias de ácidos nucleicos obtenidas por esta invención en la técnica pueden variar debido a la degeneración de las variaciones de código genético en la secuencia de ADN. Pero todavía producirá una secuencia de ADN capaz de codificar los componentes enzimáticos de las composiciones de celulasa.

[0045] Aquí se describen métodos para obtener las secuencias de ácidos nucleicos que codifican las enzimas de las composiciones de celulasa de esta invención y aquellas proteínas o péptidos con sustancialmente la misma función que las proteínas enzimáticas o péptidos de esta invención. Estas proteínas o polipéptidos incluyen, pero de forma no limitativa, un fragmento de la proteína, o una sustitución, adición o delección mutante. Aquí se describen proteínas o péptidos que son sustancialmente homólogos a las proteínas que codifican las enzimas que comprenden la composición de celulasa de esta invención. El término "análogo" incluye cualquier polipéptido con una secuencia de residuo de aminoácido sustancialmente idéntica a la secuencia específicamente, en la que uno o más residuos se han sustituido de forma conservadora por un residuo funcionalmente similar y que muestra los aspectos funcionales de las proteínas como se describe en este caso. Ejemplos de sustituciones conservadoras incluyen la sustitución de un residuo no polar (hidrofóbico) como isoleucina, valina, leucina o alanina para otro, la sustitución de un residuo polar (hidrofílico) para otro, como entre arginina y lisina, entre glutamina y asparagina, entre treonina y serina, la sustitución de un residuo básico como lisina, arginina o histidina para otro, o la sustitución de un residuo ácido, como ácido aspártico o ácido glutámico para otro.

[0046] Proteínas o polipéptidos aquí descritos también incluyen cualquier polipéptido con una o más adiciones y/o delecciones o residuos en relación a la secuencia de un polipéptido cuya secuencia se incluye en las proteínas de esta invención mientras la actividad necesaria se mantiene.

[0047] Aquí se describe una molécula de ADN recombinante que comprende todo o parte de las secuencias de ácidos nucleicos aisladas por esta invención y un vector. Vectores de expresión comprenden al menos un elemento de control de expresión unido de forma operacional a la secuencia de ácidos nucleicos. Los elementos de control de expresión se insertan en el vector para controlar y regular la expresión de la secuencia de ácidos nucleicos. Ejemplos de elementos de control de expresión incluyen, pero de forma no limitativa, sistema lac, operador y regiones promotoras de fago lambda, levadura u otros promotores de hongos. Ejemplos de promotores que pueden utilizarse incluyen, pero de forma no limitativa, glucoamilasa. Elementos operativos requeridos o preferidos adicionales incluyen, pero de forma no limitativa, secuencia líder, codones de terminación, señales de poliadenilación y cualquier otra secuencia necesaria o preferida para la transcripción apropiada y traducción posterior de la secuencia de ácidos nucleicos en el sistema huésped. Se entenderá por un experto en la técnica que la combinación correcta de elementos de control de expresión

preferida o requerida dependerá del sistema huésped elegido. Además, se entenderá que el vector de expresión debería contener elementos adicionales necesarios para la transferencia y replicación posterior del vector de expresión con la secuencia de ácidos nucleicos en el sistema huésped. Ejemplos de estos elementos incluyen, pero de forma no limitativa, orígenes de replicación y marcadores seleccionables. Además, se entenderá por un experto en la técnica que estos vectores se construyen usando métodos convencionales (Ausubel et al., (1987) en "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, New York, New York) o puede estar disponible comercialmente.

[0048] Aquí se describe también un organismo huésped en el que el vector de expresión recombinante con toda o parte de la secuencia de ácidos nucleicos se ha insertado. Las células huésped transformadas con la secuencia de ácidos nucleicos de esta invención incluye eucariotas, como animal, plantas o semillas, insecto y células de levadura, células fúngicas y procariotas, como *E. coli* u otras bacterias. Ejemplos de células huésped fúngicas incluyen, pero de forma no limitativa, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Humicola*, *Penicillium*, o *Neurospora*. El medio por el que el vector que lleva el gen se puede introducir en la célula incluye, pero de forma no limitativa, transformación, microinyección, electroporación, transducción, o transfección usando DEAE-dextrano, lipofección, fosfato cálcico u otros procedimientos conocidos por un experto en la técnica (Sambrook et al. (1989) en "Molecular Cloning. A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Press, Plainview, New York). Alternativamente, células de *Chrysosporium* se pueden transformar con la secuencia de ácidos nucleicos de esta invención para amplificar la producción de celulasas por *Chrysosporium*.

[0049] Vectores de expresión de los que función en células fúngicas se usan. Ejemplos de estos vectores incluyen, pero de forma no limitativa, plásmidos, descritos en las patentes (Ogawa; Japanese patent JP5095787 A 930420, Ozeki; Japanese patent JP7115976 A 950509, Murakami; Japanese patent JP3094690 A 910419, Ishida; Japanese patent JP3251175 A 911108, Uozumi; Japanese patent JP5268953 A 931019 DW9346 C12N-009/34 011pp, Gottschalk; German patent DE3908813 A 900920 DW9039 000 pp, Gysler; European patent EP-683228 A2 951122 DW9551 C12n-015/60 Eng 041 pp). Se prefiere que el vector de expresión de proteína recombinante se introduzca en células fúngicas, para asegurar tratamiento apropiado y modificación de la proteína introducida.

[0050] La proteína recombinante expresada por las células huésped puede obtenerse como un lisado crudo o se puede purificar por procedimientos de purificación de proteína estándar conocidos en la técnica que puede incluir precipitación diferencial, cromatografía de filtro molecular, cromatografía de intercambio iónico, isoelectroenfoque, electroforesis de gel, afinidad, e cromatografía de inmunoafinidad y similares. (Ausubel et al., (1987) en "Current Protocols in Molecular Biology" John Wiley and Sons, New York, New York). En el caso de cromatografía de inmunoafinidad, la proteína recombinante se puede purificar pasando a través de una columna con una resina que tiene unida a ella anticuerpos específicos para la proteína de interés (Ausubel et al., (1987) en "Current Protocols in Molecular Biology" John Wiley and Sons, New York, New York).

[0051] Todas o partes de las secuencias de ácidos nucleicos también pueden usarse como sondas para aislar otros homólogos en otros géneros o cepas. Los ácidos nucleicos se usan para seleccionar una biblioteca de *Chrysosporium*; clones positivos se seleccionan y se secuencian. Ejemplos de fuentes donde la genoteca puede ser sintetizada incluyen, pero de forma no limitativa, especies de *Chrysosporium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Humicola*, *Cephalosporium*, *Trichoderma* o bacterias como *Bacillus*.

Un experto en la técnica entenderá las condiciones de hibridación apropiadas para usarse para detectar los homólogos. Métodos convencionales para hibridación de ácidos nucleicos, construcción de bibliotecas y técnicas de clonación se describen en Sambrook et al., (eds) (1989). En "Molecular Cloning A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Press, Plainview, New York y Ausubel et al., (eds) en "Current Protocols in Molecular Biology" (1987), John Wiley and Sons, New York, New York.

[0052] Aquí se describen también cepas mutantes de *Chrysosporium*, en particular, cepas mutantes de *Chrysosporium lucknowense* capaces de producir celulasas alcalinas y/o neutras. Métodos de mutagénesis de ADN y selección para mutantes se conocen por estos expertos en la técnica e incluyen una variedad de métodos enzimáticos y químicos. Ejemplos de estos métodos incluyen, pero de forma no limitativa, exposición de los hongos a luz ultravioleta (UV), ácido nitroso, N-metil-N'-nitro- n-nitrosoguanidina (NG), y 4-nitroquinolina-N-óxido (4NQO). (Leninger (1972) Biochemistry. Worth Publishers Inc., NY ; Jeffrey H. Miller (1972) "Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Springs Harbor, New York). Métodos preferidos, incluyen UV y NG. Por ejemplo, cepas mutantes de *Chrysosporium* capaces de producir composiciones de celulasas de niveles aumentados mostrando actividad enzimática a pH neutro y/o alcalino pueden generarse por mutagénesis UV. A modo de ejemplos de mutantes pueden producirse por exposición de las esporas fúngicas a luz UV durante un periodo de aproximadamente 10 a sobre 180 segundos, preferiblemente de 45 a sobre 90 segundos y de forma más preferida de 65 a 75 segundos. Mutagénesis implicando NG puede implicar variación en la concentración del NG y tiempo de exposición. Por ejemplo, NG, a de sobre 13 miligramos/litro (mg/L) a sobre 400mg/L de NG puede usarse durante un periodo de exposición de aproximadamente de 15 minutos a sobre 120 minutos. Métodos alternativos para mutantes generadores incluyen técnicas en el campo de la biología molecular. Ejemplos de estas técnicas incluyen, pero de forma no limitativa, mutagénesis dirigida oligonucleótida, mutaciones de escaneado enlazador o mutagénesis oligonucleótida dirigida usando reacción de cadena de polimerasa (Ausubel (1987) *Current Protocols in Molecular Biology*).

[0053] Cribado y selección de clones de *Chrysosporium* mutantes mostrando producción de celulasa mejorada pueden también realizarse por metodología convencional. Ejemplos de criterios de selección para mutantes incluyen, pero no están limitados a, la capacidad de la colonia fúngica para descomponer la celulasa como se evidencia por compensación de la celulosa por los hongos crecidos en placas de medios con celulosa e índice de crecimiento aumentado en medios con celulosa. Por ejemplo, después de la mutagénesis, la muestra fúngica se puede colocar en placas de agar con celulosa por metodología convencional. Colonias mostrando crecimiento aumentado y compensación de celulosa (como se evidencia por compensación de los medios circundantes del aislado) se pueden seleccionar. No obstante, cualquier otro ensayo para compensación de celulosa puede utilizarse. Una vez que un mutante se aísla de la materia prima o esporas derivadas del mutante se pueden mantener por metodología convencional. Los mutantes aislados por este método pueden cultivarse o fermentarse bajo las condiciones descritas aquí y anteriormente para las cepas de tipo salvaje de *Chrysosporium*. Los componentes enzimáticos individuales de la composición de celulasa producidos por los mutantes pueden ordenarse parcialmente o microsecuenciarse a diseño sintético para aislar los genes que codifican las proteínas enzimáticas de interés. Los mutantes aislados pueden someterse además a mutagénesis y seleccionarse por los métodos descritos aquí arriba.

[0054] Aquí se describen también la producción, aislamiento y purificación de enzimas de celulasa, teniendo ambas actividad de endoglucanasa y/o de celobiohidrolasa de organismos de *Chrysosporium* de cualquier especie y cepa deseada y donde la metodología de purificación no se limita a las especies de organismo. Estas fracciones de proteínas purificadas, o parcialmente purificadas, y enzimas preparadas desde lo que son, conforme a la presente invención, altamente útiles en aplicaciones como lavado a la piedra, abrillantado del color, defrisado y suavizado del tejido, al igual que otras aplicaciones bien conocidas en la técnica. Estas preparaciones enzimáticas purificadas son susceptibles de usarse como aditivos en detergente y otros medios usados para este tipo de aplicaciones. Estos y otros métodos de uso fácilmente sugerirán ellos mismos a aquellos expertos en la técnica y no necesitarán ninguna descripción detallada aquí. No obstante, la descripción de métodos típicos de utilización de estas preparaciones se provee en los ejemplos que siguen.

[0055] Los siguientes ejemplos ilustran varios aspectos de la invención. Todos los porcentajes son en peso y todas las proporciones de mezcla de solvente son por volumen a menos que se indique lo contrario.

30 Materiales y métodos

[0056] Ensayos enzimáticos. El ensayo para CMCasa usó carboximetilcelulosa como sustrato enzimático, midió el nivel inicial de hidrólisis y cuantificó la cantidad de azúcares reductores liberados según el método de Somogyi y Nelson. El método se describe en *Methods in Enzymology*, Vol. 160A, pp. 102-104. La actividad de la endo-1,4- β -glucanasa se evaluó de manera viscométrica como un índice de la reducción de viscosidad de sustrato soluble CMC según *Bioorganicheskaya Khimia*, Vol. 6, pp. 1225-1242 (ensayo endoviscosométrico). Actividad de papel de filtro (FPA) o actividad total de celulasa usó papel de filtro como sustrato y estimó la actividad requerida para la liberación de 2 mg de glucosa de una muestra de papel de filtro de 50-mg. El ensayo se basa en la Commission on Biotechnology (IUPAC) para la medición para actividad total de celulasa o celulasa real y se describe en *Methods in Enzymology*, Vol. 160A, pp. 94-97. La actividad de avicelasa, se estimó como nivel inicial de formación de azúcar reductor durante hidrólisis si Avicel-celulosa (como descrito en *Bioresource Technology*, Vol. 52, pp. 119-124). El ensayo de celobiosa usó celobiosa como sustrato y midió la cantidad de glucosa liberada (descrito en *Methods in Enzymology*, Vol. 160A, pp. 111-112). El ensayo de actividad de β -glucosidasa usando p-nitrofenil- β -D-glucósido como sustrato (descrito en *Methods in Enzymology*, Vol. 160A, pp. 109-110). La proteína se determinó por método de Lowry (según *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 193, pp. 165-175). El ensayo de RBB-CMCasa se basa en determinación de la liberación de tinte de sustrato soluble RBB-CMC (CMC, teñido con Remazolbrilliant. Azul), referencia a ensayo - ver (Australia) Ltd., *Product Information Bulletin*, April, 1995. La endo-celulasa puede medirse también usando el ensayo Cellzyme con Azurine-reticulado He-celulosa como sustrato (ver *Megazyme Product Bulletin CEL*, January, 1996).

50 Ejemplo 1 -- Aislamiento de cepa C1

[0057] La cepa se aisló de muestras de tierra forestal alcalina de Sola Lake, este lejano de la Federación Rusa (costa pacífica de Rusia, sobre 5000 millas al este de Moscú). Una muestra de tierra mezclada se recogió de 10 sitios diferentes. Un gramo de cada muestra se transfirió en un matraz con 100 ml de agua del grifo estéril y se sometió a un baño de ultrasonidos con un dispensador ultrasónico durante 1 minuto (0,44 Amp, 22 KHz). La suspensión (diluido 1:500) se inoculó en placas de Petri con medio de Czapek (pH 5,5-6,0) con 100 mg/L de estreptomycin. El estudio se llevó a cabo en tres replicas. Colonias de varias formas y tamaños de colores se identificaron, para un segundo paso de aislamiento. Además, el aislamiento de la muestra se realizó en placas con medios de Czapek, agar de malta, agar de dextrosa de patata, o medio de solución salina de Getchinson pH 7,5 (tabla 2). Las placas se incubaron a sobre 28°C durante varios días. La selección para productores de celulasa se realizó en las placas de agar de celulosa que contenían los componentes mostrados en la tabla 1. La preparación de celulosa amorfa se describe en *Methods in Enzymology vol. 160A*.

Tabla 1. Placas de agar de celulosa	
Ingredientes	g/L
KH ₂ PO ₄	1
KCl	0,1
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,3
NaCl	0.1
FeCl ₃	0,01
NaNO ₃	2,5
Celulosa amorfa	5
Agar	15
pH	7,5

[0058] Las placas se incubaron durante 3-7 días a 28°C. La formación de halos de compensación de luz alrededor de las colonias indicaron actividad de celulasa. Una cepa, designada aquí como C1, que mostró niveles significativos de actividad de celulasa, se eligió para estudio adicional. La cepa se depositó en la All-Russian Collection of Microorganisms of Russian Academy of Sciences, (VKM), abreviatura en inglés - RCM), Bakhrushina St. 8: Moscow, Russia, 113184 bajo el Tratado de Budapest el 29 de agosto, 1996, como *Chrysosporium lucknowense* Garg 27K, VKM-F 3500 D).

10 Ejemplo 2 -- Caracterización de la cepa C1

[0059] Crecimiento de la cepa C1 en el agar de dextrosa de patata da colonias de 55-60 mm de diámetro después de 7 días. Las colonias C1 muestran un color blanco-crema, la superficie es tipo terciopelo y tiene un centro ligeramente elevado. El borde de las colonias es un *fiberial* plano y fino. El lado posterior de las colonias tiene un color crema claro.

[0060] El micelio tiene hialino y está ligeramente ramificado y homogéneo. Las hifas tienen pared fina. Hifas de aire están septadas y forman esporas de 2,0-3,0 micrómetros de anchura; las hifas de sustrato son estériles.

[0061] Las conidias son terminales y laterales. Ninguna conidia intercalada se encontró. La mayoría de conidias hifas se conectan con hifas a través de tallos cortos o ramas laterales cortas. Las conidias se separan pero adyacentes. Conidias son hialinas, de pared fina, oval o claviforme y con una única célula. Su tamaño varía de 4 a 10 micrómetros de diámetro.

[0062] La cepa C1 se puede mantener en el agar de extracto de malta (a 4°C) y transferir cada seis meses. Mantenimiento en el nitrógeno líquido y por liofilización también es posible. La cepa C1 es haploide, filamentosa, pueden crecer en placas de agar con agentes que restringen el crecimiento como bilis de bovino (1,5 %) y producir esporas.

30 Ejemplo 3 -- Clasificación de la cepa C1

[0063] Según la clasificación de Sutton (Van Dorschot, C.A.N. [1980] "A revision of *Chrysosporium* and allied genera," en *Studies in Mycology*, No. 20, *Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, The Netherlands*, pp. 1-36), la cepa C1 de la presente invención pertenece al orden de *Hyphomycetales*, familia de *Moniliaceae*, género de *Chrysosporium*, especie de *Chrysosporium lucknowense* GARG 1966. Esta clasificación se basó en la observación de las siguientes características de la cepa C1:

1. Señales del orden de *Hyphomycetales*. Las conidias se producen directamente en el micelio, en células esporógenas separadas o en conidioforas diferentes.

2. Señales de la familia de *Moniliaceae*. Ambas conidias y conidioforas (si están presentes) son hialinas o coloreadas brillantemente; las conidioforas están solas o en agrupaciones sueltas.

3. Señales del género *Chrysosporium* Corda 1833. Las colonias se suelen difundir normalmente, son blancas, amarillas o a veces de color crema, marrón claro, vellosa y/o en polvo. Las hifas son principalmente hialinas y de pared lisa, con ramificación irregular, más o menos ortotópica. La hifas fértiles muestran poca o ninguna diferenciación. Las conidias son terminales y laterales, tálicas, soportadas por todas las hifas, sésiles o en protuberancias cortas o derivaciones laterales, subhialinas o amarillo claro, de pared gruesa o fina, subglobosas, claviformes, piriformes, obovales, con una célula, raramente con dos células, truncadas. Las conidias intercaladas están a veces presentes, son solitarias, ocasionalmente encadenadas, subhialinas o amarillo claro, más amplia que las hifas de soporte, normalmente con una célula, truncadas a ambos extremos. Las clamidosporas están presentes ocasionalmente.

4. Señales de especie de *Chrysosporium lucknowense* Garg 1966. Las colonias alcanzan 55 mm de diámetro en el agar de glucosa Sabouraud en 14 días, son de color crema, vellosas y esponjosas; densas y de 3-5 mm de alto; los

márgenes son definidos, regulares, y fimbriados; de color reversible de amarillo claro a crema. Las hifas son hialinas, de pared lisa y fina, poco ramificadas. Las hifas aéreas son principalmente fértiles y estrechamente septadas, sobre de 1-3,5 mm de amplio. Las hifas sumergidas son estériles, de sobre 1-4,5 mm de amplio, con las hifas más finas frecuentemente son contorsionadas. Las conidias son terminales y laterales, principalmente sésiles o en corto, protuberancias frecuentemente cónicas o derivaciones laterales cortas. La conidias son solitarias pero muy próximas la una a la otra, 1-4 conidias se desarrollan en una célula hifal, subhialina, de pared lisa y suficientemente fina, principalmente subglobosa, también claviforme, obovoide, con una células, 2,5-11 x 1,5-6 mm, con cicatrices basales anchas (1-2 mm). Las conidias intercaladas están ausentes. La clamidosporas están ausentes.

5. Descripción de la cepa C1. Las colonias llegan de a sobre 55-60 mm de diámetro en tamaño en el agar de dextrosa de patata en sobre 7 días; son de color blanco crema, vellosas, 2-3 mm de altura en el centro; los márgenes están definidos, regulares, fimbriados, de color reversible de claro a crema. Las hifas son hialinas, de pared lisa y fina, poco ramificadas. Las hifas aéreas son fértiles, septadas, de 2-3 mm de amplio. Las hifas sumergidas son estériles. Las conidias son terminales y laterales; sésiles o en las derivaciones laterales cortas; ausentes; solitarias, pero muy próximas la una a la otra, hialinas, de pared lisa y fina, subglobosas, claviformes u obovoides, con una célula, de 4-10 mm. Las clamidosporas están ausentes. Las conidias intercaladas están ausentes.

[0064] Conclusión. La C1 es una cepa de *Chrysosporium lucknowense* Garg 1966. Por conveniencia, la celulasa hecha por esta cepa se denomina en este caso como "C1" o "celulasa C1".

Ejemplo 4-- Ensayo para actividad de celulasa

[0065] La cepa C1 creció en frascos de rotación 800 ml rotados a 220 r.p.m e incubados a 28°C. La cepa C1 creció en el medio de Getchinson de solución salina (ver tabla 2) (pH 7,5) con 5 g/L de varios nutrientes y, en algunos casos, con 2 g/L de celulosa microcristalina. Cien ml de media se añadieron a cada matraz.

	g/L
KH ₂ PO ₄	1
KCl	0,1
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,3
NaCl	0,1
FeCl ₃	0,01
NaNO ₃	2,5

[0066] Combinaciones de glucosa y celulosa microcristalina, dextrosa y celulosa microcristalina, glicerol y celulosa microcristalina, lactosa y celulosa microcristalina produjeron crecimiento muy bajo, formación de agregados de micelio grandes y ausencia de actividades de celulasa (ensayo CMCasa). Los resultados se presentan en la tabla 3. Adiciones de fuentes orgánicas de nitrógeno, es decir, peptona, extracto soluble de maíz, o crecimiento mejorado de extracto de levadura y producción de celulasa y no produjeron agregados de micelio.

[0067] Lactosa y extracto de levadura dieron la producción de celulasa mayor por C1. Resultados similares se obtuvieron cuando la lactosa y el extracto de levadura se sustituyeron con 25 g/L de pulpa de remolacha dulce, 15 g/L de malta de cebada y 5 g/L de salvado de trigo.

Sustrato	Actividad de CMCasa(unidades/ml) a pH 7,0		
	Días		
	3	5	7
Glucosa+celulosa	0	0	0
Dextrosa+celulosa	0	0	0
Glicerol+celulosa	0	0	0
Lactosa+celulosa	0	0	0
Lactosa+ extracto soluble de maíz	0	0	0,9
Lactosa+peptona	10,7	7,4	14,8
Lactosa+extracto de levadura	0	18,5	10,0
Celulosa+peptona	0,3	1,2	1,6
Celulosa+corn steep liquor	1,9	2,8	5,5

Ejemplo 5 -- Producción de celulasa para pruebas de lavado a la piedra

[0068] 1. Producción en frascos de agitación. La cepa C1 creció en frascos de agitación 800 ml rotados a 220 r.p.m. e incubados a 28°C durante siete días. El medio de crecimiento 100 ml por frasco fue medio de Getchinson de solución salina (ver tabla 2) (pH 7,5) con 25 g/L de pulpa de remolacha dulce, 15 g/L de malta de cebada y 5 g/L de salvado de trigo. La masa celular fue separada por centrifugado y el sobrenadante sin célula se liofilizó y almacenó para otras pruebas. Preparación de celulasa C1 n° de 47.1.1 a 47.15.1 se produjeron de esta manera. Preparaciones de C1 n° 47.16.1 se produjo de la misma manera, pero el sobrenadante sin célula después de centrifugado se ultrafiltró usando una membrana 10 kDa de corte antes de liofilización. Preparaciones de C1 n° de 47.18.1 a 47.22.1 se produjeron de la misma manera en frascos de agitación con medio de Getchinson, pero con lactosa (0,5 % p/v) y peptona (0,5 % p/v) en vez de pulpa de remolacha dulce, malta de cebada y salvado de trigo. La masa celular se separó por centrifugado y el sobrenadante sin célula se liofilizó y almacenó para otras pruebas. Las preparaciones n° 47.1000, 47.1001, 47.2000 y 47.2001 se produjeron en frascos de agitación de la misma manera que las preparaciones n° de 47.1.1 - 47.15.1, excepto que estas se produjeron usando otras cepas de *Chrysosporium*. Específicamente, 47.2001 se produjo por *Chrysosporium pannorum*, la preparación 47.2000 se produjo por *Chrysosporium pruinosum*, la preparación 47.1001 se produjo por *Chrysosporium keratinofilum* y la preparación 47.1000 se produjo por *Chrysosporium queenslandicum* (véase ejemplo 8). El contenido de proteína y huellas digitales de actividad de estas preparaciones de C1 se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Contenido de proteína y huellas digitales de actividad de preparaciones de C1 y preparaciones n° 47.1000, 47.1001, 47.2000 y 47.2001 que se prepararon a partir de otras especies de *Chrysosporium sp.*

Preparación n°	Proteína, %	FPA, FPU/g	CMC-asa, U/g	Endo (visc), U/g	Avicel-asa, U/g	β -Glucosidasa, U/g
47.1.1	22	13	170	120	23	135
47.2.1	26	14	137	110	22	190
47.3.1	15	19	140	128	18	198
47.4.1	18	23	150	133	55	220
47.5.1	16	20	179	120	71	185
47.6.1	17	22	224	134	82	280
47.7.1	8	4	78	123	10	22
47.8.1	22	14	168	123	19	124
47.9.1	28	15	204	174	23	151
47.10.1	24	11	181	185	16	147
47.11.1	28	16	234	191	25	269
47.12.1	26	14	167	138	20	178
47.13.1	25	9	137	110	13	141
47.14.1	15	6	39	33	9	59
47.15.1	14	6	95	44	10	75
47.16.1	16	10	146	39	15	107
47.17.1	7	3	100	34	5	29
47.18.1	10	30	120	38	10	42
47.19.1	14	4	28	10	4	11
47.20.1	14	6	17	5	1	9
47.21.1	13	3	34	5	3	9
47.22.1	14	5	35	6	3	10
47.1000	18	4	31	35	6	89
47.1001	13	6	103	38	10	66
47.2000	10	3	78	31	7	67
47.2001	13	3	45	39	7	4
47.0325	50	155	4965	964	184	248
47.0528	67	111	13500	1782	232	423

20

[0069] 2. Producción en fermentadores.

Celulasa C1 se produjo en un fermentador 10-L "ANKUM-1M" con medio de Getchinson, lactosa (0,5% p/v), peptona (0,5 % p/v) y cloranfenicol (50 mg/mL). El volumen inicial del medio de nutrición fue 7,0 L, el volumen final después de fermentación fue 7,3 L. La concentración de oxígeno disuelto (DO), velocidad de agitación, nivel de aireación, temperatura y pH se controlaron. La fermentación se efectuó como modo por lotes. La temperatura de la fermentación se controló a 28°C. El pH inicial fue 7,5 y se mantuvo más tarde a aquel nivel por adición de NH₄OH (12% p/v). La aireación fue a 4-5 l/minuto y la agitación a 400-500 r.p.m. La DO se mantuvo a sobre 50%. Muestras (30 ml) se tomaron para análisis cada 8 horas. Al final de la fermentación, biomasa fúngica se separó por centrifugado (10000g, temperatura ambiente, 20 minutos) y cultivo filtrado se liofilizó y almacenó para otras pruebas. Los resultados se muestran en la tabla 5. La preparación con celulasa n° 47.17.1 se produjo de esta manera. Contenido de proteína y huella digital de actividad de esta preparación de C1 se muestran en la tabla 4.

30

Tabla 5. Producción de C1 celulasa en fermentador 10-L

Tiempo (h)	DO (%)	Azúcares reductores (g/L)	CMCasa (U/mL)
0	100	4,8	0
8	90	4,7	0
16	54	4,4	0
24	66	1,2	4
32	70	0,4	10
40	73	0,3	11,5
48	70	0,1	5
56	70	0	1

5 [0070] 3. Producción de preparación de C1 nº 47.0325 y 47.0528. Preparación de celulasa C1 nº 47.0325 se produjo usando la cepa C1 de tipo salvaje, la preparación nº 47.0528 se produjo usando un mutante mejorado obtenido de la cepa C1 de tipo salvaje. Estas preparaciones crecieron sobre fermentadores bajo las condiciones descritas en los ejemplos 13 y 15. La preparación 47.0325 se produjo usando una fermentación por lotes y la 47.0528 se produjo usando un protocolo de fermentación con flujo discontinuo.

10

[0071] 4. La preparación de *Humicola* de tipo salvaje de las preparaciones nº 14.22.1 y 14.2.1 La preparación de *Humicola grisea var. thermoidea* nº 14.22.1 se produjo de la cepa de ATCC 16453 de tipo salvaje y la preparación de *Humicola insolens* nº 14.23.1 se produjo de la cepa de ATCC 16454 de tipo salvaje. Estas preparaciones de *Humicola* de tipo salvaje se produjeron en frascos de agitación que usan el mismo método como se describe arriba para (producción en frascos de agitación) de las preparaciones de C1 nº 47.1.1 - nº 47.15.1.

15

Ejemplo 6 -- Comparación de C1 a otras celulasas neutras

[0072] Las actividades de FPA, CMCasa y endoglucanasa de la preparación enzimática C1 nº 47.0528 se prepararon para *Humicola insolens* comercial (Denimax XT) y para *Humicola* de tipo salvaje ATCC (preparaciones nº 14.22.1 *Humicola grisea var. thermoidea* (ATCC 16453) y 14.23.1 *Humicola insolens* (ATCC 16454) celulasas neutras. Los resultados se dan en la tabla 6. Las actividades totales de C-1 nº 47.0528 son claramente superiores a aquellas de celulasas neutras de *Humicola* de tipo salvaje y de preparación comercial de *Humicola insolens*. Las actividades específicas de CMCasa y endoglucanasa (como unidades por gramo de preparación seca o unidades por gramo de proteína) de C-1 47.0528 son superiores a aquellas de todas las preparaciones de *Humicola* evaluadas enumeradas en la tabla 6. La FPA específica de C-1 nº 47.0528 es superior a la FPA específica de preparaciones de *Humicola* de tipo salvaje nº14.22.1 y 14.23 y ligeramente inferior a la FPA específica del producto comercial Denimax XT de *Humicola insolens*. El pH y termoestabilidad de celulasa C1 fue similar al Denimax XT.

20

25

Tabla 6. Comparación de C1 y celulasas de <i>Humicola</i>							
	Proteína %	FPA	CMCasa	Endo (visc)	FPA	CMCasa	Endo (visc)
		unidad/1 gramo de preparación seca			unidades/1 gramo de proteína		
CI (47.0528)	67	111	13500	1782	165	20115	2655
<i>Humicola sp.</i> (nº 14.23.1)	10	2	28	30	20	280	300
<i>Humicola sp.</i> (nº 14.23.1)	10	1	11	19	10	110	190
Denimax XT (commercial)	13	25	450	99	192	3460	761

(*) La actividades se midieron a pH 5.0 y 50°C

30

Ejemplo 7 -- El efecto del pH y la temperatura en la actividad y estabilidad de actividades de C1 FPA y CMCasa

[0073] Las actividades de FPA y CMCasa de C1 muestran estabilidad óptima y actividad a sobre pH 6-7 y sobre 50-60°C; el pH óptimo para actividad de CMCasa es sobre 6,5 y la temperatura óptima es sobre 55°C (ver tablas 8,9). A pH 8,0 (50°C), CMCasa posee 80% de actividad y FPA - 78% de actividad, a pH 9,0 (50°C), CMCasa posee 65% de actividad y FPA - 52% de actividad (ver tabla 7.).

35

Tabla 7. El efecto del pH en las actividades de FPA y CMCasa de celulasa C1 (nº47.19.1) a 50°C

pH (50°C)	FPA (%)	CMCasa (%)
4,0	50	60
4,5	68	70
5,0	75	78
5,0	80	80
6,0	92	90
6,5	100	100
7,0	95	95
7,5	90	92
8,0	78	80
8,5	60	75
9,0	52	65

[0074] El periodo de incubación para el ensayo de FPA fue de 60 minutos, el periodo de incubación para ensayo de CMCasa fue de 5 minutos.

5

Tabla 8. El efecto de temperatura en las actividades de FPA y CMCasa de celulasa C1 (nº47.19.1), a pH 7,0

Temperatura (C)	FPA(%)	CMCasa (%)
40	45	50
45	60	55
50	70	65
55	100	100
60	70	60
65	40	30
70	20	25

[0075] El periodo de incubación para el ensayo de FPA fue de 60 minutos, el periodo de incubación para el ensayo de CMCasa fue de 5 minutos.

Tabla 9. Estabilidad de de CMCasa de celulasa C1 (nº 47.19.1) a 50 °C

Tiempo (h)	actividad de CMCasa mantenida (%)			
	pH 5,1	pH 7,2	pH 7,7	pH 8,5
0	100	100	100	100
0,5	100	98	95	85
1	100	95	93	55
2	100	82	78	32
3	100	78	65	25
5	100	75	45	15

10

[0076] La CMCasa de C1 muestra alta estabilidad a pH y temperatura óptimos: por ejemplo, a pH 7,2 y 50 C CMCasa posee 95 % de actividad después de 1 hora y 75 % de actividad después de 5 horas, a pH 7,7 y 50 C CMCasa posee 93 % de actividad después de 1 hora y 45 % de actividad después de 5 horas (ver tabla 9.).

15 **Ejemplo 8 -- Actividad/rendimiento de celulasa alcalina o neutra demostrados en otras cepas de los mismos géneros de *Chrysosporium***

[0077] Varias cepas del género de *Chrysosporium* se evaluaron para la producción de celulasa. Los nombres completos y orígenes de estas cepas se describen abajo.

20

[0078] Cepas obtenidas de la American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, Maryland, incluyen:

1. ATCC 44006 *Chrysosporium lucknowense*
2. ATCC 34151 *Chrysosporium pannorum*

3. ATCC 24782 *Chrysosporium pruinorum*

[0079] Cepas obtenidas de la Russian Collection of Microorganisms (VKM) incluyen:

- 5 1. VKMF-2119 *Chrysosporium keratinofilum*
- 2. VKMF-2875 *Chrysosporium keratinofilum*
- 3. VKMF-2120 *Chrysosporium lobatum*
- 4. VKMF-2121 *Chrysosporium merdarium*
- 5. VKMF-2116 *Chrysosporium queenslandicum*
- 10 6. VKMF-2117 *Chrysosporium queenslandicum*
- 7. VKMF-2877 *Chrysosporium tropicum*

[0080] Dos tipos de medios de crecimiento se usaron en este estudio: medio A - Getchinson con presión de remolacha de azúcar, malta de cebada y salvado de trigo y medio B - Getchinson con peptona y lactosa. Las composiciones de los medios se describen en la tabla 11.

Tabla 11. Medios para estudios de frascos

Medio A	g/L	Medio B	g/L
K ₂ HPO ₄	1	K ₂ HPO ₄	1
KCl	0,1	KCl	0,1
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,3	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,3
NaCl	0,1	NaCl	0,1
FeCl ₃	0,01	FeCl ₃	0,01
NaNO ₃	2,5	NaNO ₃	2,5
Pulpa de remolacha dulce	25	Lactosa	5
Malta de cebada	15	Peptona	5
Salvado de trigo	5	pH	7,5
pH		pH	7,5

[0081] Las cepas crecieron en frascos de agitación a 220 r.p.m. y a 28°C. Muestras de cada cepa crecidas en el medio A se tomaron para análisis después de 6 y 7 días de cultivo. Muestras de cepas crecidas en el medio B se tomaron después de 5 días en cultivo. Todas las muestras se evaluaron para actividad CMCasa a pH 5 y 7. Los resultados del ensayo de CMCasa se muestran en la tabla 12.

Tabla 12. Producción de celulasas por cepas diferentes de *Chrysosporium*

Cepas	medio A (6 días)			medio A (7 días)			medio B (5 días)		
	RS	CMCasa		RS	CMCasa		RS	CMCasa	
		pH 5	pH 7		pH 5	pH 7		pH 5	pH 7
1 VKMF 2117	2,7	0	0,46	2,6	0,00	0,00	2,3	0,21	0,09
2. VKMF 2116	1,1	0,22	0,04	0,2	0,38	0,61	4,0	0,58	0,59
3. VKMF 2121	1,9	0	0,57	1,1	0,25	0,10	2,5	0,25	0,09
4. ATCC 24782	3,4	0,33	1,40	1,9	1,85	0,11	3,0	1,10	0,06
5. ATCC 34151	1,0	1,54	0,90	0,9	0,17	0,20	4,3	0,81	0,90
6. ATCC 44006	4,4	0,21	0,49	2,0	0,68	0,34	2,5	1,29	0,06
7. VKMF 2119	4,1	0	0,08	2,7	0,29	0,00	3,8	0,95	0,04
8. VKMF 2120	4,5	0	0,17	2,3	0,23	0,00	2,3	0,12	0,00
9. VKMF 2875	1,6	0	1,01	1,7	0,00	0,00	3,8	1,96	0,05
10. VKMF 2877	2,4	0	0,03	0,8	0,22	0,00	5,0	0,43	0,00
11. C1 (VKMF 3500D)	2,9	1,70	1,65	nt	nt	nt	0,1	0,89	0,80

Rs = concentración de azúcares reductores en el medio de fermentación al final de fermentación, g/L (método Nelson-Somogyi).
 pH 5, pH 7 = los valores de pH bajo que la actividad de CMCasa del caldo de fermentación se evaluaron.
 Actividad de CMCasa en U/ml.
 nt = no evaluado

[0082] En casos de cepas de ATCC 34151 *Chrysosporium pannorum*, ATCC 24782 *Chrysosporium pruinorum*, VKMF-2875 *Chrysosporium keratinofilum*, VKMF 2116 *Chrysosporium queenslandicum* la masa celular se separó por centrifugado y sobrenadante sin células se concentró de 5 litros a 0,5 litro usando ultrafiltración de 10 kDa de membrana cortada. Luego el concentrado ultrafiltrado se liofilizó y almacenó para pruebas.

[0083] Los siguientes números de preparaciones secas de celulasa se usaron:

47.2001 - ATCC 34151 *Chrysosporium pannorum*,
 47.2000 - ATCC 24782 *Chrysosporium pruinatum*,
 47.1001 - VKMF-2875 *Chrysosporium keratinophilum*.
 47.1000 - VKMF 2116 *Chrysosporium queenslandicum*.

[0084] EL contenido de proteína y huellas digitales de actividad de estas preparaciones se dan en la tabla 4.

Ejemplo 9 -- Pruebas de lavado a la piedra

[0085] A. pruebas con lavadora especial de 2-L. Este sistema evalúa las características de rendimiento de lavado a la piedra relacionadas con abrasión y pérdida de contraste usando solo pequeñas cantidades de enzima.

[0086] Desencolado. Cuarenta piezas (30 g cada una, 25 x 20 cm) de tejido vaquero (rollo) (1,2 kg) se desencolaron en una lavadora doméstica a 60°C durante 20 minutos usando una proporción tejido:líquido de 1:6 (7,2 L) y 0,5 g/L (3.6 g) de líquido Sandoclean PC (lavado no iónico y agente humectante en la base de alcoholes grasos etoxilados con un promedio de 6 moles de óxido de etileno, 1 g/L (7,2 g) de Sirrix 2UD (secuestro tamponado ácido) y 1 g/L (7,2 g) de líquido Bactosol TK (alfa-amilasa estable a alta temperatura) a un pH de aproximadamente 5 a 6. Después de 20 minutos, la solución se drenó y se lavó las piezas durante 5 minutos con agua fría (14 L) proporción líquida 1:10. Las piezas se secaron a 40°C y se usaron como materia prima de muestras comparables para la determinación de actividad de celulasa.

[0087] El tratamiento de celulasa de las piezas de prenda se efectuó en una lavadora que consiste en un tambor interno de 29 cm de diámetro de tambor - 10,6 l volumen total (el tambor gira a 20 r.p.m. - cinco giros a la izquierda - cinco giros a la derecha). Cada pieza de tejido se cosió junto con 4 tapones de caucho antes del tratamiento de celulasa para dar un embalaje de prenda que aseguró que el efecto mecánico ocurriera principalmente en el lado externo más oscuro de la prenda. Cada tambor se llenó con un embalaje y 10 tapones de caucho adicionales.

[0088] Las condiciones de lavado generales fueron: 30 g de tejido de tela vaquera desencolado, celulasa en 0,02 M de tampón citrato, 50°C, 60 minutos, proporción prenda:líquido 1:4. Después del tratamiento de celulasa el embalaje se lavó con agua caliente (50 C) (proporción prenda:líquido 1:20) durante 5 minutos y se secó para evaluación.

[0089] Ensayos de aplicación se llevaron a cabo usando varias preparaciones de celulasa C1 junto con otras preparaciones con celulasa obtenidas a partir de especies diferentes de *Chrysosporium* al igual que los productos comerciales neutros de celulosa Denimax XT de Novo Nordisk (patente estadounidense nº 4,435,307) y Ultra MG (WPO 91/17243). Estos ensayos de aplicación se configuraron para evaluar las características de rendimiento de lavado a la piedra de C-1 al igual que otras especies diferentes de celulasas de *Chrysosporium* frente a celulasas comerciales neutras de Novo. Los ensayos se realizaron a pH alcalino y neutro (6,5, 6,7, 7,0 y 8,0). Los resultados se presentan en la tabla 13. Prendas tratadas con varias preparaciones de C1 y otras con celulasa de *Chrysosporium* mostraron características de rendimiento de lavados similares a las de las celulasas comerciales neutras Denimax XT y Denimax Ultra MG. Las preparaciones C-1 y otras con celulasa de *Chrysosporium* mostraron efecto de suavizado bueno, reducción de matiz de blanqueo/total, niveles de abrasión al igual que valores de pérdida de contraste bajos cuando se realiza bajo condiciones de pH neutro y alcalino. La medición Datacolor se basa en el grado de claridad de la muestra (reflectancia). La muestra se expone a blanco ligero (2 lámparas de destello de xenón pulsadas) y la remisión se detecta entre 400 y 700 nm con 16 diodos. Reflectancia desde el lado anterior, entre valor más alto, más abrasión. Reflectancia desde el lado posterior, entre valor más alto, más pérdida de contraste.

Tabla 13. Lavado enzimático con máquina especial de 2 litros (135 gramos de tela vaquera por ejecución)

Enzima	Cantidad g	%OWG	CMCasa		Endo (visc)		°C	Proporción l líquido	PH	Tiempo (min)	Tampón	Abrasión Datacolor	Pérdida de contraste Datacolor
			U/g	/ru n	U/g	/ru n							
C-1 47.11.1	1,995	1,5	234	474	191	381	50	1:11	7,2	60	0,02M P	13,1	1,8
Denimax XT	0,133	0,10	450	60	99	13	50	1:11	7,0	60	0,02M P	13,1	2,4
C-1 47.12.1	2,100	1,5	167	338	138	290	50	1:11	6,7	60	0,02M P	14,2	1,8
Denimax XT	0,420	0,30	450	182	99	42	50	1:11	6,6	60	0,02M P	14,0	2,3
C-1 47.9.1	3,29	2,44	204	671	174	572	50	1:11	6,7	60	0,02M P	17,1	1,8
C-1 47.16.1U	2,3	1,7	146	336	39	90	50	1:11	6,7	60	0,02M P	16,2	2,3
47/1000.1	7,0	5,19	48	336	14	98	50	1:11	6,5	60	0,02M P	12,9	2,1
47/2001.1	7,15	5,30	47	336	20	143	50	1:11	6,5	60	0,02M P	14,7	1,7
Denimax UltraMG	0,132	0,10	134	18	243	32	50	1:11	7,3	60	0,02M P	14,1	3,5
C-1 47.19.1	7,14	5,29	28	200	9	64	50	1:11	6,5	60	0,02M P	14,7	1,9
C-1 47.0325	0,068	0,05	4965	338	964	66	50	1:11	7,0	60	0,02M P	15,1	2,31

Denimax XT	1,0	0,74	450	450	99	99	50	1:11	6,5	60	0,02M P	19,1	2,8
C-1 47.0528	0,08	0,05	4800	384	178 2	143	50	1:11	6,5	60	0,02M P	18,5	3,0
C-1 47.0325	0,136	0,10	4965	675	964	131	50	1:12	6,0	60	0,02M P	18,3	3,8
C-1 47.0325	0,136	0,10	4965	675	964	131	50	1:11	7,0	60	0,02M P	18,9	3,2
C-1 47.0325	0,136	0,10	4965	675	964	131	50	1:11	8,0	60	0,02M P	16,7	2,5
Humicola 14.22.1	9,18	6,80	28	257	30	275	50	1:11	6,7	60	0,02M P	14,9	1,3
Humicola 14.23.1	9,18	6,80	11	101	19	174	50	1:11	6,7	60	0,02M P	12,5	1,5
T. reesei CP	0,30	0,22	9190	273 7	200 0	600	50	1:11	4,8	60	0,02C A	17,5	8,0
Hueco	0,00	0,00	0	0	0	0	50	1:11	6,5	60	0,02M P	9,1	n/a

0.02MP = sistema de tampón de fosfato
0.01CA = sistema de tampón de ácido cítrico
T.reesei CP = producto comercial de celulasa ácida producida de *Trichoderma reesei*. Abrasión Datacolor = reflectancia desde el lado anterior, entre más altos son los valores, más abrasión, blanco = 9,1
Pérdida de contraste Datacolor = reflectancia desde el lado posterior, entre más bajos son los valores, más baja es la coloración posterior
% OWG = por ejemplo durante 1% OWG, 1 lb de enzima se usa en 100 lbs de prenda

5 [0090] B. Pruebas con lavadora 35 lb. Ensayos de aplicación se realizaron en una lavadora 35 lb (la marca de la lavadora 35 lb es Milnor - r.p.m. de lavado son 30). El tamaño de carga es 2400 g (3 prendas), las prendas usadas son pantalones vaqueros Levi's 505. El nivel de agua para baño de celulasa es de 15 L para una proporción de solución de 6.25:1 (baja). El nivel de agua para todos los otros baños es de 24 L para una proporción de solución de 10:1 (media). El sistema de tampón usado es MAP - fosfato de monoamonio y DAP - fosfato de diamonio para mantener el pH de 6,7 durante el baño de celulasa. En los ensayos 4, 5, 6 y 7 un detergente no iónico se añadió al baño de celulasa, se sabe que añadiendo un detergente al baño de celulasa ayudará a reducir la pérdida de contraste en las prendas. Zeke es un producto de desencolado. SSCE es Superscour, un detergente no iónico (Zeke y Super Scour son productos químicos comerciales de especialidades textiles químicos ofrecidos por CPN International, Ltd., Inc of Jupiter, Florida). Un ejemplo de las fórmulas de lavado usadas en estas pruebas es la prueba 2. más adelante;

10

Fórmula de lavado - Prueba 2. (C-1 47.0528)								
	Carga (g)	2400 (3 gmts)	Tejido:	Tela vaquera	Tiempo de fórmula:	1:30		
	Máquina:	35# Milnor	Peso:	14,5 oz	Desarrollado por:			
Paso	Operación	Tiempo (min)	Nivel	Temp (F)	Producto químico	Cantidad	%OWG	pH
1	Desencolado	10	Med	150	Zeke	48 g	2	
2	Equilibrio de drenaje							
3	Enjuague	2	Med	140				
4	Equilibrio de drenaje							
5	Enjuague	2	Med	130				
6	Equilibrio de drenaje							
7	Abrasión	75	Bajo (15L)	125	MAP	29 g	tampón	6,7
					DAP	10 g		
					C-1	1.2 g	0,05	
8	Equilibrio de drenaje							
9	Lavado	10	Med	160	SSCE	24 g	1	
10	Equilibrio de drenaje							
11	Enjuague	3	Med	120				
12	Equilibrio de drenaje							
13	Enjuagado	3	Med	100				
14	Equilibrio de drenaje							
15	Enjuague	3	Med	100				
16	Equilibrio de drenaje							
17	Extracto	2						

15 [0091] En el ejemplo de arriba y en uso comercial, un experto en la técnica apreciará que el uso de piedras pómez en el proceso de lavado a la piedra aumentará el efecto de lavado a la piedra total en las prendas.

[0092] Los resultados en la tabla 14 muestran que las preparaciones de celulasa C1 nº 47.0325 y nº 47.0528 realizadas mejor en cuanto al nivel total de abrasión conseguido en las prendas y bien en la gama del nivel de pérdida de contraste de los otros productos de celulasa comerciales neutros evaluados.

Tabla 14. Comparación de preparaciones de celulosa C-1 47.0325 y 47.0528 a celulasas comerciales neutras Denimax XT y BTU202 – 318 (que contiene Denimax XT)

Prueba	Celulasa	% OWG	Peso(g)	Detergente	T(°F)	pH	t(min)
1	Denimax XT	0,50	12,0	no	130	6,7	75
2	C-1 47.0528	0,05	1,2	no	125	6,7	75
3	C-1 47.0325	0,10	2,4	no	125	6,7	75
4	Denimax XT	0,50	12,0	sí	130	6,7	75
5	C-1 47.0528	0,05	1,2	sí	125	6,7	75
6	C-147.0325	0,10	2,4	sí	125	6,7	75
7	BTU 202-318	2,50	60,0	sí	130	SB	75

ABRASIÓN (De más a menos)	PÉRDIDA DE CONTRASTE (De menos a más)
Trial 5	Trial 4
Trial 6	Trial 5
Trial 2	Trial 6
Trial 3	Trial 3
Trial 4	Trial 1
Trial 1	Trial 2
Trial 7	Trial 7

- 5 [0093] La figura Legand para la tabla 14. Todos los ensayos en la tabla 14. se limpiaron con Super Scour (detergente no iónico) a 1,0 % OWG, 160 F durante 5 minutos. SB = auto tamponado - el producto comercial "ROCKSOFT" BTU 202-318 contiene Denimax XT, detergente y un sistema de tampón al igual que otros aditivos para ayudar a mejorar el rendimiento de lavado a la piedra de este producto comercial.
- 10 [0094] C. Pruebas con lavadora especial 60-L. Prendas de tela vaquera enteras se desencolaron como se describe para las pruebas de lavadora de 2-L. Cada prueba de lavado fue hecha con 1 par de pantalones vaqueros (700 g), 2,8 l de Líquido de (proporción de tejido:líquido 1:4). Todos los pantalones vaqueros tenían la misma cantidad de tinte. Se prelavaron usando un método oxidante durante 15 minutos, luego se secaron. Pantalones vaqueros azules lavados a pH neutro con preparaciones de celulosa C1 47.0325 formulada usando 2,4 gramos por prueba y usando 1,5 gramos para una prueba y usando 1,0 gramo para una segunda prueba se compararon directamente con pantalones vaqueros azules bajo condiciones de pH neutro y usando formulaciones similares Denimax XT a 12 gramos por prueba y otras dos celulasas comerciales neutras; Bactosol JE usando 2,0 % de OWG y BTU 202-318 usando 2,0 % de OWG (Bactosol JE y BTU 202-318 contienen Denimax XT, tampón, detergente al igual que otros aditivos para mejorar su rendimiento de lavado). La tabla 15. muestra que pantalones vaqueros azules de las tres pruebas C-1 superaron los tres productos de celulosa neutros comerciales en cuanto al nivel de abrasión conseguida al igual que la reducción de color total de las prendas. El nivel de pérdida de contraste en los pantalones vaqueros azules de los seis ensayos fue óptimo, fueron muy similares el uno al otro y en cuanto a lo que uno podría esperar y vería cuando se usa celulosa neutra Denimax XT de Novo. Los valores de pérdida de contraste para todas estas tres pruebas C-1 estuvieron en la gama de los valores de pérdida de contraste como se muestra en la tabla 13. Las prendas finales de estos ensayos y los ensayos como se muestran y se estiman en la tabla 14 arriba se estimaron en un estudio ciego para cuatro grupos independientes, de tres o más personas por grupo. La gente que componía cada uno de estos grupos se considera experta en la técnica de lavado a la piedra. Se le pidió que colocara cada una de las prendas en el siguiente orden: (1) abrasión mayor total y reducción de color para abrasión mínima total y reducción de color; y (2) pérdida de contraste, nivel mínimo de pérdida de contraste a nivel de máximo de pérdida de contraste (ver tabla 15).
- 30

Tabla 15

PRUEBA	ENZIMA	DOSIS	TAMPÓN	DETERGENTE	ABRASIÓN/ REDUCCIÓN DEL COLOR	PÉRDIDA DE CONTRASTE
Prueba A	C-1 47.0528	1,5 gramos	Fosfato	Sí	+++++	5
Prueba B	C-1 47.0528	1,0 gramos	Fosfato	Sí	+++++	2
Prueba C	C-1 47.0325	2,4 gramos	Fosfato	Sí	+++++	4
Prueba D	Denimax XT	12,0 gramos	Fosfato	Sí	++++	3
Prueba E	BTU 202-318	2,0% de OWG	Fosfato	Sí	+++	6
Prueba F	Bactosol JE	2,0% de OWG	Citrato	Sí	+++	1

Leyenda para la tabla 15:

5 [0095] Reducción de abrasión/color - + + + + + (+6) mejor (= > + + + + (4) se considera bueno y fue comparable a celulasas neutras comerciales (p. ej. - Denimax XT)

10 [0096] Pérdida de contraste - el número inferior, el mejor (todos los pantalones vaqueros se juzgaron para estar dentro del intervalo de pérdida de contraste como encontrado cuando se usa Denimax TX de Novo). Celulasa neutra significativamente disminuyó la pérdida de contraste comparado con celulasas ácidas tradicionales, como *Trichoderma* (véase ejemplo 13) %OWG - % de peso de prenda, por ejemplo, para 100 lbs de peso seco de pantalones vaqueros a 1 % OWG, 1 lb de enzima se usa.

15 [0097] D. Reflectancia de la luz. Otra prueba para evaluar pérdida de contraste es medir la reflectancia de la luz de un tejido tratado. Al final del tratamiento de lavado, muestras de pantalones vaqueros se analizaron usando un reflectómetro a dos longitudes de onda diferentes: (1) cuanto más alta la señal detectada a 680 nm (medida desde la parte exterior de los pantalones vaqueros), más baja es la pérdida de contraste; y (2) cuanto más alta la señal detectada a 420 nm (medido desde el interior de los pantalones vaqueros), más baja es la pérdida de contraste. La tabla 16. compara los valores de reflectancia de pantalones vaqueros de tela vaquera después del tratamiento con celulasas
20 comerciales de Novo Nordisk y Genencor Internacional con preparación C-1 nº 47.6.1.

Tabla 16

Enzima	680 nm	420 nm
Denimax L (celulasa neutra, Novo)	23	20
Primafast 100 (celulasa ácida, Genencor)	20	13
C1 47.6.1 (celulasa neutra/alcalina)	22	18

25 [0098] Los valores de reflectancia de la luz para celulasa C 1 fueron similares a los obtenidos con producto comercial del Denimax L de Novo Nordisk, una celulasa neutra, ambos a 680 y 420 nm y los valores de reflectancia de la luz para celulasa C1 fueron significativamente mejores que aquellos obtenidos con producto comercial Genecor Primafast 100, una celulasa ácida, ambos a 680 y 420 nm.

30 E. Pruebas en lavadora semi-industrial.

[0099]

Prueba nº 1.

2 pantalones vaqueros, peso 1343 gr

35 Proporción de agua 6:1

pH 5,5

Temp. 54 °C

Enzima: C1 (preparación nº 47.6.1) 12 gr (0,9%)

Tiempo de abrasión 90 minutos

40 Baño de caída

Enjuague 5 minutos con 1 % de detergente no iónico a 66°C

Baño de caída

Frío de enjuague

Baño de caída

45 Suavizar durante 5 minutos con suavizante catiónico a 49°C

Extracto y seco

[0100] Prueba nº 2. El mismo procedimiento que en la prueba nº 1, de arriba, excepto que enzima Denimax 700 T (2% OWG 28,9 gr) se usó y condiciones de lavado se llevaron a cabo a pH 7,0, 54°C.

[0101] Celulasa C1 fue se comparó con Denimax 700 T, un producto comercial de celulasa neutra hecho por Novo. Todos los pantalones vaqueros tuvieron la mismo cantidad de tinte. Se prelavaron durante 15 minutos usando un método oxidante luego se secaron.

[0102] Los pantalones vaqueros tratados con preparación de celulasa C1 nº 47.6.1 mostraron ligeramente menos abrasión y pérdida de contraste inferior que los pantalones vaqueros con celulasa Denimax 700T.

Ejemplo 10 --- Celulasa C1 como aditivo para detergente para ropa

A. Liberación de mancha en algodón

[0103] Rendimiento de lavado de preparación de celulasa C1 nº47.9.1 se evaluó usando el procedimiento de rendimiento de lavado PW 9406 (Solvay). Liberación de mancha (tinta) de tejido de algodón se evaluó por delta reflectancia (%). Prueba de lavado comparado con una preparación de celulasa C1 (nº 47.9.1) a Celluzyme 0,7 T de Novo Nordisk en presencia y ausencia de proteasa alcalina Opticlean L500. Los resultados de esta prueba se muestran en la tabla 17.

[0104] La celulasa C1 tiene propiedades de liberación de mancha de algodón machado de tinta a pH neutro en un detergente tipo color como la enzima de celulasa de *Humicola insolens*.

Tabla 17. Prueba de lavado con detergente con celulasa C1(*)

Enzima probada (pH 7,0)	Dosis de CMCasa (U/l)	Datos de reflectancia (%)	
		1	2
Celluzyme 0.7 T	200	3,68	4,75
Celluzyme 0.7 T	500	2,68	4,07
Celluzyme 0.7 T + 5000 DU/l (**)	200	2,07	3,13
Celluzyme 0.7 T + 5000 DU/l (**)	500	2,08	3,22
C1 #47.9.1	200	2,18	2,88
C1 # 47.9.1.	500	2,77	3,72
C1 #47.9.1 + 5000 DU/l (**)	200	1,15	1,91
C1 #47.9.1 + 5000 DU/l (**)	500	2,81	3,30
Ninguno (control)	ninguno	0	0

AAADU = Du = unidad Delft, Du/l = unidad Defft unit por litro
 (*) 40C°, 45 min, secado a 68°C, 75 min
 (**) Proteasa alcalina Opticlean L500

B. La estabilidad de celulosa C1 con serina proteasas

[0105] Como serina proteasas, una tripsina (3,2 µM, de páncreas bovino, actividad 10,000-13,000 N-bencil-L-argina etiléster (BAEE)/mg, Sigma T-8253) y una α-quimiotripsina (8 µM, de páncreas bovino, 40- 60 U/mg, Sigma C-4129) se usaron.

[0106] Las proteasas se incubaron con celulasa C1 a 20°C y pH 7,0. Quimiotripsina no redujo la actividad de C1 durante 12 horas y tripsina llevó a una reducción ligera (alrededor de 20%) de actividad de C1, ver tabla 18.

[0107] Tripsina y quimiotripsina significativamente no cambiaron la estabilidad de C1 CMCasa a pH 4,5 y 7,0 a 50° y 57°C, ver tabla 18.

Tabla 18. El efecto de proteasas en la actividad de CMCasa de celulasa C1 (# 47.9.1)

Proteasa	Temperatura (°C)	pH	Tiempo de incubación (h)	Actividad de CMCasa restante (%)
Ninguna (control)	20	7,0	12	70
+ Quimiotripsina	20	7,0	12	70
+ Tripsina	20	7,0	12	50
Ninguna (control)	50	4,5	3	100
+ Quimiotripsina	50	4,5	3	100
+ Tripsina	50	4,5	3	100
Ninguna (control)	50	7,0	3	78
+ Quimiotripsina	50	7,0	3	60
+ Tripsina	50	7,0	3	68
Ninguna (control)	57	4,5	3	62
+ Quimiotripsina	57	4,5	3	60
+ Tripsina	57	4,5	3	62
Ninguna (control)	57	7,0	3	30
+ Quimiotripsina	57	7,0	3	30
+ Tripsina	57	7,0	3	30

C. El efecto de citrato, EDTA, Tween-80 y persulfato en la actividad de CMCasa

5 [0108] El cambio de acetato a tampón de citrato (un agente quelante) no tiene efecto en la actividad de C1 CMCasa (molaridad de tampones - 0,1 M, pH 4,5, 50 y 57°C), ver tabla 19.

10 [0109] EDTA (etilendiamina ácido tetraacético) (5 mM) como agente quelante a pH 4,5 y 50°C no cambió la actividad de CMCasa. A pH 4,5 (57°C) y a pH 7,0 (50°C) EDTA provocó reducciones ligeras en la actividad de CMCasa. A pH 7,0 y 57°C, EDTA provocó aumento ligero en la actividad de CMCasa, ver tabla 19.

[0110] El detergente no iónico Tween-80 (3 g/L, polioxietileno sorbitán monooleato), no cambió la actividad CMCasa de C1 a pH 4,5 y 7,0 y a 50 y 57°C, ver tabla 19.

15 [0111] Persulfato de agente oxidante (3 g/L) no cambió la actividad de CMCasa de C1 (a pH 4,5 y 7,0 y a 50 y 57°C), ver tabla 19.

20 [0112] C1 CMCasa es resistente a serina proteasas (tripsina y quimiotripsina), agentes quelantes (EDTA; citrato), detergente no iónico (Tween-80) y a agente oxidante (persulfato).

Tabla 19. El efecto de citrato, EDTA, Tween-80 y persulfato en la actividad de celulasa C1 (nº 47.9.1). Tiempo de incubación - 3 horas

Efactor	Concentración	Temperatura (°C)	pH	Actividad de CMCasa restante (%)
Ninguno (control)	---	50	4,5	100
Citrato	0,1 M	50	4,5	100
EDTA	5 mM	50	4,5	100
Tween-80	3 g/L	50	4,5	100
Persulfato	3 g/L	50	4,5	97
Ninguno (control)	---	57	4,5	62
Citrato	0,1 M	57	4,5	65
EDTA ,	5 mM	57	4,5	60
Tween-80	3 g/L	57	4,5	68
Persulfato	3 g/L	57	4,5	65
Ninguno (control)	---	50	7,0	78
EDTA	5 mM	50	7,0	50
Tween -80	3 g/L	50	7,0	52
Persulfato	3 g/L	50	7,0	50
Ninguno (control)	---	57	7,0	30
EDTA	5 mM	57	7,0	38
Tween-80	3 g/L	57	7,0	25
Persulfato	3 g/L	57	7,0	30

Ejemplo 11 -- Pruebas de lavado a la piedra de muestras de celulasa producidas por cepas diferentes de *Chrysosporium*

5 [0113] Preparaciones nº 47.1000, 47.1001, 47.2000 y 47.2001 producidas por cepas diferentes de *Chrysosporium* se usaron para prueba de lavado con máquina de lavado especial de 2-L a pH 6,5, 50°C, durante 60 min con 135 g de tejido pantalones vaqueros de tela vaquera reducida. Cantidad total de actividad de CMCasa por prueba fue constante y igual a 336 U/ejecución.

10 [0114] Tras el secado, abrasión y pérdida de contraste de prenda se evaluaron por medición Datacolor. Los resultados se presentan en la tabla 20. Los resultados muestran que celulastas producidas de distintas cepas de *Chrysosporium* demuestran rendimiento de lavado similar a pH neutro en cuanto a abrasión y niveles de pérdida de contraste a las celulastas producidas por la C-1 de especies de *Chrysosporium lucknowense* Garg 1966.

Tabla 20. Actividad de lavado a la piedra de preparaciones con celulasa de distintas cepas de <i>Chrysosporium</i>		
Nº preparación	Abrasión (*)	Pérdida de contraste (**)
47.1000	12,3	1,6
47.1001	12,1	1,6
47.2000	14,2	1,7
47.2001	14,6	1,6
(*) - reflectancia desde la parte frontal, entre mayor valor, más abrasión, hueco = 9,1		
(**) - reflectancia desde la parte posterior, entre mayor valor, más pérdida de contraste		

15 Ejemplo 12. -- Purificación de componentes de celulasa

[0115]

1. Selección de muestras de C1 para purificación.

20 La preparación de celulasa C1 nº 47.11.1 se eligió para otra purificación en vista del hecho de que 47.11.1 tuvo (i) alto contenido de proteína; (ii) FPA alta y actividad de CMCasa (ver tabla 4).

2. Aislamiento y purificación de componente complejo de C1.

25 El primer paso de purificación incluyó cromatografía de intercambio iónico en una columna de DEAE-Toyopearl (TosoHaas, Japan). Preparación de celulosa C1 seca (1,5 g) se disolvió en 15 mL de 0,01 M de tampón de Na-fosfato, pH 7. La solución se centrifugó y el sobrenadante desalado usando una columna Acrilex P- 2. La muestra desalada se aplicó luego a la columna de DEAE-Toyopearl (1,5 x 30 cm) en 0,03 M de tampón de fosfato, pH 4,7 y proteínas adsorbidas se eluyeron en 0 - 0,2 M de gradiente de NaCl con velocidad de flujo de 1 mL/min. Tres fracciones combinadas se obtuvieron -- fracción (NB) no unida se eluyó en el tampón inicial, fracciones I y II se eluyeron a través de 0 - 0,2 M de gradiente de NaCl. Todas las fracciones tuvieron actividades celulolíticas.

3. SDS-PAGE de fracciones de proteína.

35 Después de electroforesis en gel de poliacrilamida dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE), la fracción NB incluyó proteínas con pesos moleculares de 30 y 70 kD. La fracción I incluye proteínas con pesos moleculares de 25 a 100 kD y la fracción II contenía proteínas con pesos moleculares de 35 y 100 kD. SDS-PAGE se llevó a cabo con un gel de separación 10% (100 X 80 X 0,75 mm) bajo condiciones de desnaturalización. Reactivos y equipos se obtuvieron de Bio-Rad (USA). Coomassie R-250 azul brillante en 25% de ácido tricloroacético se usó para coloración de proteína.

4. IEF de fracciones de proteína.

40 Después de isoelectroenfoque (IEF), la fracción NB incluye proteínas con puntos isoeléctricos (pI's) de 4,6 a 8,0. La fracción I contiene proteínas con valores de pI de 3,2 a 5,5, y la fracción II contiene proteínas con pI de 3,0 a 5,5. Isoelectroenfoque se efectuó con 7% de PAAG en el modelo mini-IEF 111 (de Bio-Rad). Reactivos y equipos se obtuvieron de Bio-Rad (USA). Coomassie azul brillante R-250 en 25 % de ácido tricloroacético se usó para coloración de proteína.

45 5. Dependencias de pH de actividad de CMCasa de fracciones de proteína.

50 La tabla 21 representa las dependencias de pH de actividades de CMCasa y RBB-CMCasa de fracciones NB, I y II de celulasa C1. Los siguientes sistemas de tampón se usaron: tampón de acetato (pH 4-5), tampón de fosfato (pH 6-8) y tampón carbonato (pH 8,5-10). Además, un sistema de tampón universal se usó que consistía en acetato, borato y fosfato (pH 4-10).

Tabla 21. El efecto de pH en actividades de CMCasa y RBB-CMCasa de fracciones de proteína de C 1			
pH	Actividad de CMCasa, 50°C (%)		
	Fracción NB	Fracción I	Fracción II
4,0	85	70	95
4,5	95	85	100
5,0	100	90	95
5,5	90	100	90
6,0	80	90	80
6,5	70	85	80
7,0	65	85	80
7,5	60	65	75
8,0	50	60	60
8,5	45	50	50
9,0	30	45	40
9,5	10	40	32
pH	Actividad de RBB-CMCasa, 50°C (%)		
	Fracción NB	Fracción I	Fracción II
4,5	65	95	100
5,0	100	100	95
5,5	95	100	90
6,0	95	95	90
6,5	80	87	90
7,0	80	85	87
7,5	60	65	85
8,0	50	60	70
8,5	45	60	60
9,0	30	50	40
9,5	10	40	32

[0116] Actividades de CMCasa y RBB-CMCasa de las fracciones NB, I y II después de cromatografía de intercambio iónico de DEAE-Toyopearl tuvo un perfil de pH tipo campana no simétrico. Actividad de CMCasa de la fracción NB mostró un máximo a pH 4,5 - 5,5 y 50% de actividad máxima a pH 8,0. Actividad de RBB-CMCasa de la fracción NB tuvo un máximo a pH 5,0 - 6,0 y 50% de actividad máxima a pH 8,0. Actividad de cMCasa de fracción I tuvo un máximo a pH 5,0 - 6,0 y 50% de actividad máxima a pH 8,5. Actividad de RBB-CMCasa de fracción I tuvo un máximo a pH 4,5 - 7,0 y 50% de actividad máxima a pH 8,5. Actividad de CMCasa de fracción II tuvo un máximo a pH 4,0 - 5,5 y 50% de actividad máxima a pH 8,5. Actividad de RBB-CMCasa de fracción II tuvo un máximo a pH 4,5 - 7,5 y 50% de actividad máxima a sobre pH 8,5.

[0117] 6. Estabilidad de CMCasa de fracción de proteína I (después de DEAE-Toyopearl). La tabla 22 muestra curvas de actividad de CMCasa temporal de fracción I después de cromatografía de intercambio iónico de DEAE-Toyopearl a pH diferente (5,2-8,7) y 50°C. La actividad de CMCasa de fracción I fue más estable a pH 5,2-7,2 (entre sobre 30% y 45 % de actividad se perdió más de 3 horas). A pH 7,7, 60% de actividad se perdió después de sobre 1 hora, mientras que a pH 8,3 y 8,7, 50% de actividad se perdió después de sobre 0,5 hora. A pH 8,3, 100% de actividad de CMCasa se perdió después de 3 horas y a pH 8,7, 100% de actividad se perdió después de 2 horas.

Tabla 22. Estabilidad de CMCasa de una fracción de proteína I después de DEAE-Toyopearl a 50°C					
Tiempo (h)	Actividad de CMCasa mantenida (%)				
	pH 5,2	pH 7,2	pH 7,7	pH8,3	pH 8,7
0	100	100	100	100	100
0,5	97	75	65	50	50
1	90	55	40	25	15
2	40	50	35	10	0
3	30	45	25	0	0

[0118] 7. Propiedades de fracciones después de cromatografía de intercambio iónico en DEAE-Toyopearl. Experimentos de adsorción usando Avicel (micro celulosa cristalina) como sustrato demostró que fracciones I y II no se unen con un sustrato cristalino y la fracción NB unida a Avicel con un coeficiente de distribución de 0,2 L/g. Actividades específicas de las fracciones NB, I y II hacia diferentes sustratos se presentan en la tabla 23. Todas las tres fracciones tuvieron CMCasa, endoglucanasa, avicelasa, β-glucanasa y actividades de xilanasas, pero la fracción NB no tuvo actividad de β-glucosidasa, a diferencia de las fracciones I y II. La micro prueba de lavado de tela vaquera para fracciones NB, I y II

mostraron que fracciones I y II tuvieron aproximadamente actividad igual en la tela vaquera a pH 7, mientras la fracción NB mostró actividad inferior (según la micro prueba de lavado de tela vaquera).

Tabla 23. Actividades específicas de fracciones después de cromatografía de intercambio de iones en DEAE-Toyopearl

Fracciones	CMCasa	Actividades específicas, U/mg proteína					Micro prueba de lavado de tela vaquera
		Endoglu - canasa	Avicelasa	β -gluco - sidasa	β -glucanasa	Xilanasa	
NB	9,9	6,2	0,18	0,0	11,0	5,3	+
I	3,7	2,3	0,02	3,6	1,9	0,7	++
II	0,8	0,2	0,02	0,02	1,2	0,04	++

[0119] 8. Micro prueba de lavado de tela vaquera. Esta prueba se efectuó usando 20 mL de solución enzimática tamponada con un nivel predeterminado de actividad de CMCasa. Muestras manchadas de tela vaquera de índigo reales se trataron a 50°C durante 60 minutos en condiciones de exceso de tensión mecánica (abrasión). El nivel de rendimiento de celulasa se evaluó por puntuación de panel según la reducción de color después de que las muestras se secaron. Instrumentos de medición de color y software podrían usarse también. Más valores "+" indican mejor abrasión.

[0120] 9. Además de purificación de proteínas de fracción I después de cromatografía de intercambio iónico en DEAE-Toyopearl. Fracción desalada I (25 mL, 0,8 g/l de proteína) se sometió a preparación de cromatografía de intercambio iónico Macro Prep Q. La columna MacroPrep Q (1.5x10 cm) se equilibró con 0,03 M de tampón acetato, pH 4,7, y las proteínas adsorbidas se eluyeron en 0 - 0,1 M de gradiente de concentración de NaCl. Tres fracciones, I.1, I.2, y I.3, se recogieron. La fracción I.2 mostró la actividad de micro lavado de tela vaquera máxima a pH 7 y fracción I.3 mostró el mínimo. Resultados SDS-PAGE mostraron que fracciones I.1 y I.2 difirieron por la presencia de una proteína de peso molecular bajo (25 kD) en la fracción I.2, que puede haber contabilizado para la actividad de lavado a la piedra. La fracción I.1 tuvo un pI de 4,2 como se muestra por mediciones IEF. La fracciones I.1 y I.3 tuvieron un contenido de proteína demasiado bajo para permitir otro estudio. Por lo tanto, la fracción I.2 se usó en otra purificación.

[0121] El siguiente paso de purificación implicó cromatografía de intercambio iónico en una columna Mono P. La fracción I.2 se equilibró con 0,03 M de tampón de imidazol, pH 6,8 y se aplicó a la columna. Proteínas adsorbidas se eluyeron con politampón 74 (1:8), pH 4,0, a partir de lo cual 2 valores máximos importantes en perfiles de proteína y actividad se observaron. El primer valor máximo, designado valor máximo A, mostró actividad de CMCasa específica inferior (2,5 unidades/mg) comparado con valor máximo B (3,6 unidades/mg). Electroforesis en gel de poli(acrilamida) nativa mostró la presencia de 2 bandas proteicas en el valor máximo A, con el enlace proteínico de peso molecular más alto siendo activo hacia CMC manchado con rojo Congo. Un enlace proteínico activo bajo condiciones nativas se observó en el valor máximo B. Datos de SDS-PAGE mostraron que valor máximo A incluyó 2 proteínas principales (60 kD y 70 kD) y valor máximo B contuvo una proteína principal (25 kD) y una proteína menor (27 kD). La fracción recogida dentro de valor máximo B se designó como 25 kD-endoC1 y se usó en otros estudios. La tabla 24 muestra las actividades específicas de 25 kD-endoC1 hacia distintos sustratos. La 25 kD-endoC1 tuvo CMCasa, RBB-CMCasa, endoglucanasa, FPA, avicelasa, β -glucanasa y actividades de xilanasa, pero no mostró actividad de β -glucosidasa. Esta combinación de diferentes actividades muestra que 25 kD-endoC1 es una endoglucanasa. El pH óptimo de actividades de CMCasa y RBB-CMCasa es aproximadamente 6,0 (tabla 24). El 25 kD-endoC1 tuvo actividad de lavado a la piedra alta (según una micro prueba de lavado de tela vaquera usando muestras de algodón) (ver tabla 24).

[0122] Durante elución de valor máximo A de la columna Mono P, varias fracciones se recuperaron que difirieron en la proporción de proteínas 60 kD a 70 kD, especialmente una fracción designada 70(60) kD-C1 que incluyó predominantemente una proteína 60 kD y una fracción designada 70 kD-endoC1 con predominantemente una proteína 70 kD. Actividades específicas de estas fracciones hacia diferentes sustratos se presentan en la tabla 24. Como se ve aquí, al fracción 70(60) kD-C1 tuvo actividad de endoglucanasa específica baja (0,5 U/mg) y de avicelasa específica alta (0,31 U/mg) comparado con la fracción 70 kD-endoC1 (2,8 U/mg de endoglucanasa y 0,18 U/mg de avicelasa) y tuvo actividad de β -glucosidasa muy baja. Actividades específicas hacia FP, β -glucano y xilano de la fracción 70(60) kD-C1 fueron bajas (ver tabla 24) y solo celobiosa se formó como producto de hidrólisis de avicel. Actividad de lavado a la piedra (según una micro prueba de lavado de tela vaquera usando muestras de algodón) de la fracción 70(60) kD-C1 fue baja (ver tabla 24). Estos datos muestran que la proteína 60 kD de la fracción I después de cromatografía de intercambio de iones en el DEAE-Toyopearl se puede designar como una celobiohidrolasa. El pH óptimo de 70(60) kD-C1 (hacia CMC y RBB-CMC) fue aproximadamente 5,0 (tabla 24).

[0123] El 70kD-endoC1 tuvo actividades altas de CMCasa específica, RBB-CMCasa, endoglucanasa, FPA, β -glucanasa y xilanasa y tuvo alguna actividad de avicelasa y β -glucosidasa (tabla 24). El 70kD-endoC1 también tuvo actividad de lavado a la piedra relativamente alta (según la micro prueba de lavado de tela vaquera usando muestras de algodón) (ver tabla 24). El 70kD-endoC1 de la fracción I después de cromatografía de intercambio iónico en el DEAE-Toyopearl parece ser una endoglucanasa. Como se ve en la tabla 24, el pH óptimo durante 70 kD-endoC1 es aproximadamente 6,0 para las actividades de CMCasa y RBB-CMCasa.

[0124] 10. Otra purificación de proteínas de la fracción II después de cromatografía de intercambio de iones en el DEAE-Toyopearl. La fracción II, obtenida como resultado de cromatografía DEAE, se dividió en 3 fracciones (fracción II.1, II.2, y II.3, respectivamente) usando 0-0,2 M de gradiente de NaCl más largo (sobre un periodo de 8 hr) en una columna de DEAE-Toyopearl. Resultados de SDS-PAGE mostraron que la fracción II.1 incluyó 2 proteínas importantes de peso molecular 60 kD y 100 kD, la fracción II.2 incluyó 3 proteínas importantes de 35 kD, 60 kD, y 100 kD, y la fracción II.3 incluyó 2 proteínas importantes de 43 kD y 60 kD. La fracción II.3 demostró la actividad de CMCasa mayor (10 unidades/mg de proteína), pero mostró actividad de lavado baja (usando una sub-micro prueba de lavado de tela vaquera) y actividad de CMCasa específica de 1 unidad/mg. La fracción II.2 no mostró ninguna actividad de lavado (pero la actividad de CMCasa fue 0,7 U/mg). Así, las fracciones II.1 y II.3 se purificaron además.

Tabla 24. Propiedades de enzimas C1

pH	25 kD endo	70(60) kD	70 kD endo	60 kD endo (II.1)	100kD (II.1)	43kD endo (II.3)	60kD endo (II.3)
Actividad de CMCasa (U/mg)							
5,0	4,6	1,10	3,5	0,70	0,03	1,02	1,32
6,0	5,0	0,83	3,8	0,52	0	1,01	1,07
7,0	3,9	0,65	3,0	0,45	0	0,90	1,03
RBB-CMCasa (U/mg)							
5,0	8,2	0,12	1,5	0,90	0	0,82	1,21
6,0	8,8	0,10	2,7	0,84	0	0,75	1,14
7,0	6,6	0,07	2,4	0,68	0	0,73	1,12
FPA (U/mg)							
5,0	1,0	0,17	0,61	0,31	0	0,45	0,52
Endoglucanasa (viscométrica) (U/mg)							
5,0	2,26	0,50	2,8	0,21	0	0,15	0,27
Avicelasa (U/mg)							
5,0	0,16	0,31	0,18	0,03	0	0,01	0,01
β -Glucosidasa (U/mg)							
5,0	0	0,02	0,16	0,02	0	0,02	0
β -Glucanasa (U/mg)							
5,0	0,66	0,07	2,4	1,3	0	3,9	4,4
Xilanasa (U/mg)							
5,0	0,40	0,16	0,50	0,06	0,01	0,07	0,01
Micro actividad de lavado de tela vaquera							
5,0	+++	-	++	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
7,0	+++	-	++	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Sub-micro actividad de lavado de tela vaquera							
5,0	n.d.	n.d.	n.d.	+++	-	+	+
7,0	n.d.	n.d.	n.d.	+++	-	+++	++

n.d. = no determinado

[0125] 11. Sub-micro prueba de lavado de tela vaquera. Esta prueba se realizó en fragmentos de tela vaquera manchada de índigo real en 2 mL de solución enzimática tamponada (2 unidades de actividad de CMCasa) a 50°C durante 2 horas en las condiciones de exceso de tensión mecánica. El nivel de rendimiento de celulasa se evaluó por puntuación de panel según la reducción de color después de que las muestras se secaron.

[0126] 12. Purificación de fracción II.1. Fracción II.1 se aplicó a una columna Macro Prep Q equilibrada con 0,03 M de tampón acetato, pH 4,75 y las proteínas adsorbidas se eluyeron en un gradiente de NaCl (0 - 0,3 M). Dos valores máximos de proteína se obtuvieron, pero solo la primera actividad de CMCasa se muestra. SDS-PAGE del material desde el primer valor máximo mostró que proteínas con 60 kD y 100 kD se aislaron en un estado homogéneo. Según datos IEF, las proteínas 60 kD y 100 kD tuvieron un pI ácido de aproximadamente 3. Las actividades de las proteínas 60 kD y 100 kD hacia sustratos diferentes se muestran en la tabla 24. La proteína 60 kD designada como 60 kD(II.1)-endoC1 se encontró que tenía actividades de endoglucanasa, CMCasa, RBB- CMCasa, FPA y β -glucanasa a pH 5 (0,2, 0,7, 0,9, 0,3, y 1,3 unidades/mg de proteína, respectivamente, como se muestra en la tabla 24). Actividades de avicelasa, β -glucosidasa y xilanasa fueron más bien bajas. Esta combinación actividades muestra que el 60kD(II.1)-endoC1 es una endoglucanasa. La 60kD(II.1)-endoC1 también posee actividad de lavado alta (por la sub-micro prueba de lavado de tela vaquera) a ambos pH 5 y a pH 7 (por tabla la 24). La dependencia de pH de actividades de CMCasa y RBB-CMCasa para esta proteína mostró máxima a pH 4,0 - 4,5, con 50% de actividad máxima hacia CMC y 85 % de actividad máxima hacia RBB-CMC retenido a pH 6, y 15-20% de ambas actividades retenido a pH 9 y 10 (ver tabla 25).

[0127] La proteína 100 kD de la fracción II.1 se designó como proteína 100kD(II.1) y casi no ha tenido actividad de celulasa (tabla 24). Esta proteína tuvo solo actividades de CMCasa (0,03 U/mg) y xilanasa (0,008 U/mg) muy bajas y podría no determinarse para ser una enzima celulítica. Según la sub-micro prueba de lavado de tela vaquera, la proteína

100 kD (II.1) no demostró ninguna actividad de lavado a la piedra (tabla 24) y también falló para mostrar cualquier actividad de proteasa a bien pH 5 o pH 7.

[0128] 13. Purificación de fracción II.3. La fracción II.3 se purificó también por cromatografía de macro Prep Q. Las proteínas adsorbidas se eluyeron en 0,2 - 0,6 M de gradiente de NaCl (el tampón inicial fue 0,03 M de acetato, pH 4,75). SDS-PAGE de las fracciones obtenidas después de la cromatografía de macro Prep Q mostró que las proteínas 43 kD y 60 kD se obtuvieron en forma homogénea. Isoelectrofocalización de estas fracciones mostró que las proteínas 43 kD y 60 kD tuvieron valores de pI de aproximadamente 3. Las proteínas 43 kD y 60 kD se designaron 43kD(II.3)-endoC1 y 60kD(II.3)-endoC1, respectivamente. Las actividades de estas enzimas hacia diferentes sustratos (ver tabla 24) mostraron que tenían actividades de CMCasa específica, FPA, avicelasa y xilanasa similares. La 60kD(II.3)-endoC1 tuvo actividades específicas de RBB-GMCase, endoglucanasa y de FPA más altas (tabla 24). Al mismo tiempo debe destacarse que la 43kD(II.3)-endoC1 y 60kD(II.3)-endoC1 tuvieron actividades de lavado a la piedra muy pequeñas a pH 5 (usando la sub-micro prueba de lavado de tela vaquera). No obstante, ambas 43kD(II.3)-endoC1 y 60kD(II.3)-endoC1 demostraron actividad de lavado a la piedra destacable a pH 7 y, al mismo tiempo, la 43kD(II.3)-endoC1 tuvo actividad de lavado a la piedra más alta en comparación con la 60kD(II.3)-endoC1. Como se ha visto de las dependencias de pH en la tabla 25, 43kD(II.3)-endoC1 mostró un pH óptimo amplio (de pH 4,5 a 8) en el caso de ambas actividades de CMCasa y RBB-CMCasa. La 43kD(II.3)-endoC1 tuvo actividades de 50% de CMCasa y 70% de RBB-CMCasa de un máximo a pH 9 y 20% de ambas CMCasa y RBB-CMCasa a pH 10. En cambio, 60kD(II.3)-endoC1 tuvo un pH óptimo estrecho a pH 4 - 4,5 hacia CMC y un pH óptimo amplio (de pH 4 a 8) hacia RBB-CMC y actividad de 30% RBB-CMCasa siendo retenida a pH 9.

[0129] Debe tenerse en cuenta que en cualquier caso de proteínas purificadas descritas aquí, pesos moleculares se determinaron usando electroforesis en gel (especialmente SDS-PAGE) y proteínas de referencia de peso molecular conocido como estándar. Como con todos los análisis usando estos métodos, los resultados son solo aproximados y alguna variación en el peso molecular se puede observar como geles diferentes se realizan por diferentes trabajadores usando conjuntos diferentes de peso molecular estándar como referencia.

[0130] Estas preparaciones enzimáticas purificadas, y parcialmente purificadas, son muy útiles como componentes de detergente, suavizado de tejido, defrisado, abrillantación de color y composiciones de lavado a la piedra. Así, las preparaciones enzimáticas anteriores aisladas y purificadas tienen utilidad en estas aplicaciones según la presente invención. Así, métodos para lavado a la piedra, suavizado de tejido, defrisado, abrillantación de color y limpieza como hasta aquí se han nombrado aquí, al igual que métodos típicos para realizar estas aplicaciones como ya se describen en la bibliografía fácilmente emplean estas preparaciones enzimáticas purificadas, o parcialmente purificadas, y composiciones con estos, como agentes aditivos o principales en la ejecución de los objetivos de estos procedimientos. El uso de otras preparaciones enzimáticas y purificadas diferente, o parcialmente purificadas, en estas aplicaciones se conocen en la literatura con muchas enzimas en uso comercial.

Tabla 25. El efecto de pH en actividades de CMCasa y RBB-CMCasa de enzimas de celulasa C1

pH	Actividad de CMCasa, 50°C (%)		
	60kD(II.1)-endo	43kD(II.3)-endo	60kD(II.3)-endo
3,5	85	80	85
4,0	100	100	100
5,0	65	100	85
6,0	50	100	70
7,0	45	90	65
8,0	25	70	45
9,0	17	30	30
10,0	15	20	10
11,0	15	5	5
pH	Actividad de RBB-CMCasa, 40°C (%)		
	60kD(II.1)-endo	43kD(II.3)-endo	60kD(II.3)-endo
3,5	85	85	80
4,0	100	100	100
5,0	90	100	100
6,0	85	95	95
7,0	70	90	90
8,0	50	80	85
9,0	20	70	70
10,0	15	20	30
11,0	15	15	15

[0131] Se debe entender que las celulasas alcalinas y/o neutras descritas hasta aquí pueden tener actividades enzimáticas diferentes dependiendo de la estructura química del sustrato usado en la medición de la actividad y el método de ensayo particular empleado para medir la actividad. Así, las celulasas alcalinas y/o neutras, purificadas, o

parcialmente purificadas, mostrarán perfiles de pH/actividad dependiendo del método de ensayo y sustratos empleados. Para resolver cualquier confusión en cuanto a la naturaleza de las actividades y propiedades de las enzimas de celulasa sustancialmente purificadas preparadas por los métodos de este ejemplo, lo siguiente es una descripción de las actividades y propiedades medidas para las celulasas de las fracciones purificadas.

[0132] Las celulasas purificadas, o parcialmente purificadas, preparadas aquí muestran ambas actividad de endoglucanasa y/o de celobiohidrolasa cuando el sustrato apropiado se empleó. Así, las preparaciones con celulasa que mostraron actividades de endoglucanasa todas tuvieron valores de pI entre sobre 3 y sobre 4,5. más específicamente, estas fracciones incluyeron celulasas (endoglucanasas) con pesos moleculares y valores de pI de la siguiente manera: PM sobre 25 kD (pI sobre 4,0), PM sobre 70 kD (pI sobre 4,2), PM sobre 60 kD (pI sobre 3,0) y PM sobre 43 kD (pI sobre 3,1). Estas fracciones también contenían proteínas mostrando una actividad de celobiohidrolasa. Más específicamente, esta última tuvo un PM de aproximadamente 60 kD y pI sobre 4,2.

[0133] Métodos de uso de las composiciones y enzimas purificadas según la presente invención han sido bien descritos en la literatura, incluyendo muchas patentes. Estos incluyen Clarkson (patente U.S. 5,290,474), que divulga el uso de enzimas de celulasa y composiciones con enzima de celulasa, incluyendo tensioactivos y otros aditivos, para uso en los medios de lavado acuosos, composiciones detergentes, medios diseñados para mejorar retención de color y/o restauración, al igual que impartiendo suavizado mejorado y propiedades de sensación, especialmente a tejidos con algodón. Las enzimas de celulasa y composiciones con celulasa según la presente invención se destinan también para uso en las mismas aplicaciones, descripciones específicas siendo descritas en muchas, si no todas, las referencias citadas. Además, la utilidad de enzimas de celulasa y composiciones para aplicaciones como reducción de aspereza, o suavizado de tejido, se muestran también en Barbesgaard et al (patente U.S. 4,435,307), específicamente revelando el uso de celulasas fúngicas, pero no aquellas del género de *Chrysosporium*, a pH alcalino varía e incluyendo varios agentes aditivos, como aquellos empleados conjuntamente con la celulasa nueva y composiciones de celulasa de la presente invención, para reducción de aspereza, o suavizado de tejido, y lavado como una única operación. Las celulasas y composiciones de celulasa de la presente invención son de forma similar útiles y las instrucciones de Barbesgaard respecto a las estas aplicaciones. Además, el uso de enzimas de celulasa y composiciones de celulasa, otro que las celulasas nuevas y composiciones de celulasa de la presente invención, para aplicaciones para abrillantación de color se describen específicamente en Boegh (patente europea EP 0 220 016).

[0134] Por supuesto, las enzimas de celulasa nuevas y composiciones de celulasa de la presente invención se entenderán por los expertos en la técnica para ser muy útiles para las mismas aplicaciones como descrito en las referencias precedentes, representando así la aclaración de cualquier detalle adicional de estas aplicaciones inútiles. No obstante, estas enzimas y composiciones con enzimas purificadas, o parcialmente purificadas, son también útiles en estas aplicaciones como desentintado y bioblanqueo de papel o materiales de pulpa y método de realización así fácilmente sugerirán ellos mismos a los expertos en la técnica, especialmente después ellos revisarán las instrucciones de aquí.

Ejemplo 13 -- Producción de celulasa C-1 en fermentador por lotes de 60 litros

1. Preparación del inóculo

[0135] Preparaciones de inóculo o cultivos iniciadores para la fermentación por lotes se prepararon de la siguiente manera. Un mililitro (1 ml) de cultivo de espora C-1 se usó para inocular cada uno de dos matraces para generar un total de 2,0 litros de inóculo. El cultivo iniciador se incubó a 150 r.p.m., a 30°C durante 56 horas.

Preparación* para medio para inóculo

K₂HPO₄ 0,5 g/L

MgSO₄ • 7H₂O 0,15

KCl 0,05

FeSO₄ • 7H₂O 0,007

Extracto de levadura (ohly KAT) 1,0

Peptona (Hormel PSR 5) 10,0

Lactosa 10,0

Glucosa 10,0

*El pH del medio de inóculo fue ajustado a pH 7.0 con NaOH, los medios se sometieron luego a autoclave durante 35 minutos a 121 °C en dos matraces disipados de dos litros cada con un litro de medio.

2. Producción de celulasa en fermentadora por lotes de 60 litros (preparaciones de 47.0325)

[0136] El cultivo de inóculo del matraz de agitación de dos litros preparado arriba, se usó para inocular 40 litros de medio contenidos en una fermentadora de 60 litros. El medio para fermentación fue de la siguiente manera:

Medio de fermentación*

K₂HPO₄ 0,22 g/L

KH₂PO₄ 0,08 g/L

- (NH₄)₂ SO₄ 4,0 g/L
 Na₃citrato • 2H₂O 4,0 g/L
 MgSO₄ • 7H₂O 0,03 g/L
 CaCl₂ • 2H₂O 0,4 g/L
 5 FeSO₄ • 7H₂O 0,5 mg/L
 MnSO₄ • 7H₂O 0,5 mg/L
 ZnSO₄ • 7H₂O 0,2 mg/L
 CoCl₂ • 6H₂O 0,24 mg/L
 Lactosa 5,0 g/L
 10 Extracto de levadura (ohly KAT) 0,05 g/L
 Harina de semilla de algodón desgrasada 5,0 g/L
 (Pharmamedia)
 Celulosa (Signmacell 50) 20,0 g/L
 pH 7,0
 15 *El medio de 40 litros estaba en agua desionizada y se esterilizó durante 45 minutos a 121°C.

[0137] Después de inoculación del medio de fermentación, el pH se mantuvo sobre de 6,9 por adición de NH₃ y por debajo de 7,1 por adición de H₂SO₄. La fermentadora se incubó durante 64 horas con agitación y aireación si necesario para mantener oxígeno disuelto mayor de 30% de saturación.

20 3. Recuperación de actividad de celulasa

[0138] Sólidos suspendidos del cultivo fermentado se quitaron por filtración en embudo Buchner grande usando papel de filtro Whatman 54 y 10 g/L de Celite 503 como filtro auxiliar. El filtrado se recogió y la celulasa concentrada por ultrafiltración usando 10,000 PM de filtro de fibra vacía de corte. El concentrado se liofilizó. El concentrado seco se designó preparación de celulasa 47.0325. La actividad de esta preparación se da en la tabla 4.

Ejemplo 14 -- Procedimiento de mutación usado para generar mancha mutante de C-1

30 [0139] Una suspensión de esporas se prepararon usando una placa de agar Pridham (4 g/L de extracto de levadura, 10 g/L de extracto de malta, 10 g/L de glucosa, 15 g/L de agar) con un cultivo esporulado de cepa C1. La placa se anegó con 10 ml de Tween 80 0,05 %. La suspensión se transfirió a un tubo de tapa de tornillo estéril y se removió a alta temperatura durante 1 minuto. La suspensión se filtró luego a través de una columna para eliminar micelio. Las esporas se contaron y se diluyeron a 7 x 10⁵ esporas por ml en agua. Diez ml de la suspensión de esporas se transfirieron a una
 35 placa de Petri de vidrio estándar. Las esporas se irradiaron durante 75 segundos a 720μWatts/cm² usando una lámpara UV Pen-Ray. La suspensión de esporas se agitó suavemente en toda la irradiación usando un clip estéril como barra agitadora magnética. Después de la Irradiación, la suspensión de esporas se tomó a un tubo envuelto de hoja, se diluyó en el agua y se colocó en placas con poca luz a NH₄ medio mínimo tal y como se define más adelante. Después de incubación de 20 días a 30 grados C, una colonia fue identificada como una colonia grande con una zona grande de
 40 compensación de celulosa alrededor de la colonia.

NH₄ medio mínimo, pH 7,5
 1 g/L de K₂HPO₄
 0,1g/L de KCl
 45 0,3g/L de MgSO₄ • 7H₂O
 0,1g/L de NaCl
 16mg/L de FeCl₃ • 6H₂O
 1,92g/L de (NH₄)₂SO₄
 15g/L de Difco Noble agar
 50 2,5g/L de celulosa ácida hinchada (añadida como un 1,25 % de materia prima después de autoclave)
 0,5g/L de deoxicolato de sodio (añadido después de autoclave)

Ejemplo 15 -- Producción de celulasa mutante C-1 en matraces de fermentación por lotes de 60 litros (preparación de 47.0528)

55 1. Preparación del inóculo

[0140] Preparaciones de cultivos iniciadores para la fermentación con flujo discontinuo se prepararon como se describe en el ejemplo 13 (sección 1).

60 2. Producción de celulasa en fermentación por lotes de 60 litros

[0141] El inóculo de dos litros se usó para inocular 40 litros de medio de fermentación como se describe abajo.

65 Medio de fermentación*
 K₂HPO₄ 0,44 g/L

- 5 KH_2PO_4 0,16 g/L
 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3,0 g/L
 $\text{Na}_2\text{citrato} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 4,0 g/L
 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,06 g/L
 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,8 g/L
 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1 mg/L
 $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,04 mg/L
 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,04 mg/L
 $\text{CoSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,048 mg/L
 10 Lactosa 5,0 g/L
 Extracto de levadura (ohly KAT) 0,1 g/L
 Harina de semilla de algodón desgrasada 10,0 g/L
 (Pharmamedia)
 Celulosa (Sigmacell 50) 20,0 g/L
 15 *El medio de 40 litros estaba en agua desionizada y se esterilizó por autoclave durante 45 minutos a 121°C.

3. Condiciones de fermentación

- 20 [0142] El pH se mantuvo a alrededor de 7,0 y se controló por adición de NH_3 a pH sobre de 6,9 y adición de H_2SO_4 a pH por debajo de 7,1. El periodo de incubación fue de 87 horas, agitación y aireación se realizaron si necesarias para mantener oxígeno disuelto más de 30% de saturación. A 40 horas, 3,0 litros de solución de alimentación como se describe abajo, se añadieron a razón de 5,0 ml cada 5 minutos.

Solución de alimentación para fermentadora

- 25 K_2HPO_4 0,88 g/L
 KH_2PO_4 0,32 g/L
 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 4,0 g/L
 $\text{Na}_2\text{citrato} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 4,0 g/L
 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,12 g/L
 30 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,16 g/L
 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2 mg/L
 $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,08 mg/L
 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,08 mg/L
 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,096 mg/L
 35 Lactosa 20,0 g/L
 Extracto de levadura (ohly KAT) 0,2 g/L
 Pharmamedia 20,0 g/L
 Celulosa (Sigmacell 50) 20,0 g/L

4. Recuperación de actividad de celulasa

- 45 [0143] Sólidos suspendidos se quitaron por filtración en embudo Buchner grande usando papel de filtro Whatman 54 y 10 g/L Celite 503 como filtro auxiliar. El filtrado se recogió y celulasa concentrada por ultrafiltración usando 10,000 PM de filtro de fibra vacía de corte. El concentrado se secó por liofilización. El concentrado se designó preparación de celulasa 47.0528 (la actividad se da en la tabla 4).

Ejemplo 16 - Ensayo de actividad de celulasa usando ensayo Cellazyme

- 50 [0144] Este ensayo se efectuó usando comprimidos Cellazyme C y el equipo de ensayo se obtuvo de Megazyme (Aust) Pty. Ltd., Sydney, NSW 2101, Australia. El sustrato usado es Azurine-crosslinked HE-celulosa (AZCL-celulosa) suministrado comercialmente como comprimidos Cellazyme C, listo para uso. Brevemente, 0,5 mL de partes alícuotas de preparación enzimática (diluido si es necesario) en 0,025 M de tampón de acetato (pH 4,5) se equilibran a 40°C durante 5 minutos en los tubos de prueba de vidrio (16 X 122 mm). La reacción de prueba se inicia luego por adición de un comprimido Cellazyme C (sin agitación). Después de exactamente 10 minutos a 40°C, la reacción se termina por
 55 adición de solución de base de Trizma (10.0 mL, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) y luego agitación en vortex. A los tubos se les permite luego representar sobre 5 minutos a temperatura ambiente a partir de lo cual la composición acuosa se agita nuevamente, se filtra a través de un círculo de filtro Whatman n°. 1 (9 cm) y absorbencia del filtrado medido a 590 nm. Las mediciones de absorbencia se leen contra una hueco con ambos sustrato y enzima, pero
 60 preparado añadiendo la base de Trizma a la solución enzimática antes de la adición del comprimido Cellazyme C. Esta composición acuosa se deja a temperatura ambiente mejor que 40°C. Un único hueco se usa para cada conjunto de determinaciones y se usó para poner a cero el espectrofotómetro.

- 65 [0145] En este ensayo, una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima requerida para liberación de un micromol de equivalentes de azúcar de glucosa reductor por minuto bajo las condiciones definidas de ensayo. Actividad de endo-celulasa se determinó luego por referencia a una curva estándar (una curva de muestra se

suministró con el equipo, pero podría generarse fácilmente en el laboratorio, si enzima diferente particular, dilución enzimática y condiciones se deben emplear para un conjunto dado de experimentos).

5 [0146] El uso de este ensayo para nuestra actividad enzimática neutro/alcalina propia, actividad de endo-celulasa encontrada (tomando la actividad a pH 7 como 100%) para ser 92,4 % (a pH 6), 75,6% (a pH 5,0) y 69,7% (a pH 4,0).

Ejemplo 17 - Prueba de lavado detergente para defrisado y atemorizado de color (anti-desvanecimiento)

10 [0147] Las pruebas se llevaron a cabo según la monografía de AATCC, "Standardization of Home Laundry Test Conditions" en el AATCC Technical Manual, 1997 (revisado en 1995), usando una lavadora de carga superior doméstica Kenmore, usando una secadora de tambor doméstica Kenmore. Tres estilos diferentes de calcetines rojos de talla de adulto (88 % de algodón, 10% de poliéster, 2 % de lycra) se usaron como prendas de prueba, (normal acanalado, pesada acanalado y tejido gofrado). Los calcetines se dividieron en 3 grupos con un número igual de cada estilo en cada grupo, con una prenda no lavada de cada estilo usada como una referencia. El peso aproximado de cada grupo fue 1 kg.

15 [0148] Las muestras de detergente se prepararon antes de cada lavado de la siguiente manera: a) Cheer Triple Guard (como comprado en el E.E.U.U. y comúnmente a pH alcalino) como es (para demostrar el defrisado y propiedades de cuidado de color de celulasas originalmente presente en Cheer, b) tratamiento térmico de la muestra de Cheer para inactivar todas las enzimas presentes originalmente en el detergente (para limitar el rendimiento de Cheer a sus otros componentes que enzimas. Para inactivación térmica, una muestra de 40 g de Cheer se suspendió en 200 mL de agua y se calentó a alta temperatura (1000 W) en un microondas doméstico durante 5 minutos, la temperatura final alcanzada fue 95°C. Luego, repetición de los mismos pasos (a) y (b) de arriba, pero añadiendo 5 g de C1 a la preparación.

20 [0149] Los ciclos de lavado/secado se realizaron 25 veces para cada grupo. Cada grupo se lavó en todos los 25 ciclos de lavado usando 1 kg de prendas en 20 litros de solución de lavado (el nivel de agua en la lavadora fue bajo) y 40 g de una de las preparaciones de detergente anteriormente mencionadas. La temperatura se fijó en caliente-caliente, la duración del lavado fue 30 minutos, seguido centrifugado de marcha rápida normal. La temperatura de secado se fijó a alta temperatura y el ciclo de secado se completó en 45 minutos. La prueba se completó después de 25 lavados, cuando las prendas se evaluaron, por diferentes grupos/paneles de expertos en la técnica, para defrisado y
30
35
abrilantación de color.

[0150] Un resumen del procedimiento es como sigue:

Preparación(es)	Inactivación de enzimas Cheer originales	Adición de enzimas de AARL
a. Cheer (completo)	No	No
b. Cheer (sin enzimas)	Sí	No
c. Cheer + C1	Sí	Sí (5 g de C1)

[0151] Los resultados de la evaluación para cada grupo de lavado son los siguientes (donde todos los 3 estilos de calcetines se evaluaron igual):

	Cheer (completo)	Cheer (enzimas inactivadas)	Cheer + C1
Defrisado	++++	-	+++
Abrillantado de color	++	-	++++

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición teniendo actividad de celulasa neutra y/o alcalina, obtenible por un método que comprende crecimiento de un tipo salvaje o mutante del hongo *Chrysosporium lucknowense* Garg 27K, número de acceso VKM F-3500D, **caracterizada por el hecho de que** dicha composición conserva actividad de celulasa a una temperatura entre 40°C y 60°C y a un pH entre 5,0 y 12,0.
- 10 2. Composición según la reivindicación 1, teniendo al menos 50% de la actividad óptima de celulasa, a un pH entre 6,0 y 7,0 y a una temperatura entre 40° y 60°C.
3. Composición según la reivindicación 1 o 2, donde dicha actividad de celulasa se evalúa por ensayo de cualquiera actividad de CMCasa, RBBCMCasa, endoviscométrico o papel de filtro.
- 15 4. Fracción de proteína sustancialmente purificada y aislada, obtenida de una composición según la reivindicación 1, conservación de actividad de celulasa a una temperatura entre 40°C y 60°C y a un pH entre 5,0 y 12,0.
- 20 5. Fracción de proteína según la reivindicación 4 teniendo al menos 50% de su actividad de celulasa máxima a un pH entre 6,0 y 7,0 según se mide por cualquier ensayo de actividad de CMCasa, RBBCMCasa, endoviscométrico o papel de filtro.
6. Endoglucanasa obtenible de una fracción según la reivindicación 4 o 5, con un peso molecular de aproximadamente 60 kD y pl de aproximadamente 3.
- 25 7. Endoglucanasa obtenible de una fracción según la reivindicación 4 o 5, con un peso molecular de aproximadamente 43 kD y pl de aproximadamente 3.
8. Composición detergente conteniendo una o más enzimas purificadas obtenibles de la fracción de proteína según la reivindicación 4 o 5, y además comprendiendo un tensioactivo, donde una o más enzimas purificadas conservan actividad de celulasa a una temperatura entre 40°C y 60°C y a un pH entre 5,0 y 12,0.
- 30 9. Composición suavizante de tejido con una o más enzimas purificadas obtenibles de la fracción de proteína según la reivindicación 4 o 5, donde una o más enzimas purificadas conservan actividad de celulasa a una temperatura entre 40°C y 60°C y a un pH entre 5,0 y 12,0.
- 35 10. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 - 3, composición comprendiendo una fracción de proteína según la reivindicación 4 o 5, o composición comprendiendo una endoglucanasa según la reivindicación 6 o 7, para la degradación parcial de material celulósico.
- 40 11. Composición según la reivindicación 10, donde la degradación parcial comprende suavizado, blanqueo, lavado a la piedra, teñido de prendas, desfibrilación, biopulido, abrillantado de color, defrisado, o desencolado de tejidos; microfibrilación enzimática, bioblanqueo o destintado de pulpa y papel; o eliminación de aspereza de tejidos celulósicos.
- 45 12. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 - 3, composición comprendiendo una fracción de proteína según la reivindicación 4 o 5, o composición comprendiendo una endoglucanasa según la reivindicación 6 o 7, para la sacarificación de biomasa de lignocelulosa.
- 50 13. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 10 - 12, comprendiendo además uno o más componentes seleccionados del grupo consistente en piedras pómez, abrasivos, suavizantes, solventes, conservantes, blanqueadores, agentes de azulado, tintes fluorescentes, antioxidantes, solubilizantes, detergentes, tensioactivos, enzimas, constructores, agentes de antireposición, tampones, inhibidores de aglutinación, agentes de enmascarado para factores inhibidores de la actividad de celulasa y activadores de celulasa.
- 55 14. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 10 - 13, donde el pH se sitúa entre 10,0 y aproximadamente 11,0.
- 60 15. Uso de una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 - 3 o 10 - 14, o de una fracción de proteína según la reivindicación 4 o 5, o de una enzima según la reivindicación 6 o 7 en aplicaciones textiles, como suavizado, blanqueo, lavado a la piedra, teñido de prendas, desfibrilación, biopulido, abrillantado de color, defrisado, o desencolado, o en aplicaciones detergentes, o en la sacarificación de biomasa de lignocelulosa, o en la microfibrilación enzimática, bioblanqueo o destintado de pulpa y papel, o en eliminación de aspereza de tejidos celulósicos.