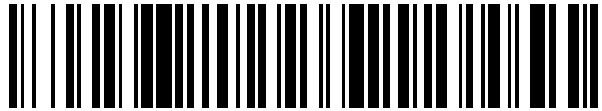


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 650 406**

51 Int. Cl.:

D21C 5/02 (2006.01)

D21C 9/08 (2006.01)

D21H 21/02 (2006.01)

D21C 5/00 (2006.01)

D21H 17/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.05.2002 PCT/DK2002/00326**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.07.2017 WO02095127**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.05.2002 E 02742833 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.11.2017 EP 1402109**

54 Título: **Uso de enzimas lipolíticas para el control de impurezas adhesivas**

30 Prioridad:

21.05.2001 DK 200100813

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

18.01.2018

73 Titular/es:

**NOVOZYMES A/S (100.0%)
KROGSHÖJVEJ 36
2880 BAGSVAERD, DK**

72 Inventor/es:

**BORCH, KIM;
LUND, HENRIK;
SHARYO, MASAKI;
SAKAGUCHI, HIROMICHI;
PEDERSEN, HANNE, HOST y
FITZHENRY, JAMES, WILLIAM**

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 650 406 T3

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

DESCRIPCIÓN

Uso de enzimas lipolíticas para el control de impurezas adhesivas

5 Campo técnico

[0001] Esta invención se refiere al uso de determinadas enzimas lipolíticas en la fabricación de papel y productos de papel a partir de papel reciclado. Usando estas enzimas se reducen los problemas referidos a las así llamadas impurezas adhesivas derivadas del papel de desecho.

10

Estado de la técnica

[0002] Los polímeros que comprenden acetato de vinilo son muy usados comúnmente como un material adhesivo y de revestimiento en sectores industriales (papel, textiles, etc.). Sin embargo, debido a sus propiedades adhesivas estos polímeros causan frecuentemente problemas en etapas de proceso posteriores.

15

[0003] Por ejemplo, en la industria papelera los polímeros que comprenden acetato de vinilo se usan como un material aglutinante y de revestimiento. Durante el reciclaje, estos polímeros tienden a aglomerarse junto con fibras y otras sustancias para formar las así llamadas "impurezas adhesivas", lo que reduce la calidad del producto de papel y provoca un significativo tiempo de inactividad de la máquina.

20

[0004] WO 00/34450, WO 01/92502 y la patente de EE.UU. Nº 5,176,796 informan del uso de ciertas lipasas y cutinasas en la fabricación de papel, en concreto para el control de resina. Según la anterior patente de EE.UU., la resina es un constituyente natural de la madera y los triglicéridos son un componente importante de la misma.

25

[0005] WO 01/98579 divulga el uso de lipasa y/o esterasa para el control del problema con las impurezas adhesivas durante el reciclaje de papel. Las lipasas designadas RESINASE A2X, y NOVOCOR ADL, se incluyen para fines de comparación en los ejemplos 1-3 de este documento.

30 Breve descripción de la invención

[0006] La invención se refiere al uso de una clase de enzimas lipolíticas tal y como se define en la presente reivindicación 1 en la fabricación de papel a partir de papel reciclado, además de los métodos para la elaboración de papel usando esta clase de enzimas lipolíticas. La clase de enzimas lipolíticas se define por referencia a ciertas pruebas para actividad hidrolítica en polímeros que comprenden acetato de vinilo.

35

Descripción detallada de la invención

Impurezas adhesivas

40

[0007] Según el Thesaurus of Pulp and Paper Terminology, 1991 (editado por Institute of Paper Science and Technology, Atlanta, EE.UU.), el término impurezas adhesivas designa contaminantes del papel de desecho con un carácter adhesivo que provocan que se peguen partes de la máquina de papel durante el reprocesado. Como ejemplos de tales contaminantes, se mencionan la tinta, el alquitrán y el látex.

45

[0008] Otros ejemplos de impurezas adhesivas son aglomerados pegajosos de fibras, adhesivos, recubrimientos, aglutinantes y otros materiales, que se forman en un proceso de fabricación de papel reciclado. Por consiguiente, las impurezas adhesivas son principalmente de interés en los procesos de fabricación de papel donde se usa papel reciclado.

50

[0009] Las impurezas adhesivas son insolubles en agua y tienden a aglomerarse y depositarse en varias partes del equipo de fabricación de papel, causando así problemas de calidad de papel, roturas de la banda de papel y costosos periodos de tiempo de inactividad para limpiar el equipo. Por ejemplo, las impurezas adhesivas se pueden depositar en el papel formando fieltros que hacen que el drenaje del agua de la banda de papel en formación sea por lo tanto menos eficaz, lo que de nuevo puede dar lugar a problemas como se ha descrito anteriormente.

55

[0010] Se han distinguido las impurezas adhesivas de varias maneras, por ejemplo por tamaño o por densidad relativa:

60

Las impurezas adhesivas primarias son tan pequeñas que normalmente no causan ningún problema, mientras que las impurezas adhesivas secundarias o macroimpurezas adhesivas son mayores y tienden a depositarse. Las macroimpurezas adhesivas son generalmente de tal tamaño que son retenidas en filtros finos. Ejemplos de filtros finos son aquellos que tienen ranuras de aproximadamente 50-200, 60-190, o 70-180, o 80-170, o 80-160, o de aproximadamente 80-150 micrómetros.

65

[0011] Las impurezas adhesivas de alta densidad y de baja densidad pueden ser eliminadas bajo ciertas condiciones mediante varios tipos de equipo mecánico, pero los problemas permanecen en particular con las llamadas impurezas adhesivas de densidad de gama neutral, es decir, las impurezas adhesivas de una densidad relativa de aproximadamente 0,9 a aproximadamente 1,1, o de aproximadamente 0,95 a aproximadamente 1,05, o de aproximadamente 0,98 a aproximadamente 1,02.

[0012] La composición química de las impurezas adhesivas de varias partes del mundo puede variar, principalmente dependiendo de las características de los procesos locales de fabricación de papel. Asimismo, por la misma razón, la composición de las impurezas adhesivas puede variar de una fábrica a otra fábrica.

[0013] Los siguientes componentes son ejemplos de componentes, uno o más de los cuales se encuentran típicamente en las impurezas adhesivas europeas: resinas acrílicas, acetato de polivinilo (PVAc), resina de estireno-butadieno (SBR), polietileno (PE) y polipropileno (PP).

[0014] En el contexto de la presente invención, el foco está sobre los polímeros que comprenden acetato de vinilo y las impurezas adhesivas son un ejemplo de tales polímeros. Un polímero que comprende monómero de acetato de vinilo puede ser un homopolímero de poli(acetato de vinilo) (PVAc) que comprende monómeros de acetato de vinilo o puede ser un copolímero que comprende acetato de vinilo y otros monómeros tales como etileno, acrilato de metilo, laurato de vinilo y ácido t-decanoico, éster de etenilo. También se incluyen combinaciones y mezclas de varios polímeros, donde al menos uno de los polímeros comprende monómeros de acetato de vinilo, en la definición de "polímero que comprende acetato de vinilo" como se utiliza en este caso. Lo mismo resulta cierto para mezclas de los mismos no solo con otros polímeros, sino también con cualquier otro compuesto.

[0015] Se han desarrollado varias maneras para controlar las impurezas adhesivas, tales como controlar la calidad del papel reciclado entrante, varios métodos de centrifugación y de filtrado mecánicos, y métodos de dispersión que usan varios productos químicos. También se ha propuesto el uso de enzimas (véase por ejemplo WO 01/98579 mencionada anteriormente).

[0016] Sin embargo, sigue habiendo problemas severos, que - según la invención - se disminuyen mediante el uso de determinadas enzimas lipolíticas, superiores a las enzimas previamente descritas para este propósito.

Enzimas lipolíticas

[0017] En el presente contexto, la expresión enzima "lipolítica" se refiere a una clase de enzimas que se selecciona del grupo que consiste en lipasa y cutinasa y que tiene además el rasgo unificador y característico de que son capaces de hidrolizar un polímero que comprende monómero de acetato de vinilo.

[0018] Para determinar si una enzima determinada se incluye dentro de esta clase de enzimas lipolíticas, se puede usar cualquiera de las pruebas siguientes:

(a) una determinación del grado de hidrólisis por electroforesis capilar después de 18 horas a 45°C en un sustrato de PVAc disperso, donde el sustrato de PVAc disperso se prepara inyectando 1,5 ml de 6 % de PVAc en metanol en un tampón de 40 ml, pH 6 o 8, y donde el peso molecular del PVAc es de aproximadamente 12800; o

(b) una determinación de la actividad hidrolítica de la enzima en cuestión en al menos una de las tres preparaciones de polímero siguientes donde todas comprenden monómero de acetato de vinilo: (i) una preparación de homopolímero de PVAc, (ii) una preparación de copolímero de etileno y acetato de vinilo, o (iii) una preparación de copolímero de etenil éster de ácido terc-decanoico y acetato de vinilo. La actividad hidrolítica en uno, dos o en los tres de estos sustratos muestra que la enzima es una enzima "lipolítica" tal y como se define aquí.

[0019] Con motivo de la prueba (a) anteriormente mencionada: si el grado de hidrólisis determinado según el ejemplo 8 de este documento es de al menos 0,1, la enzima en cuestión califica como una enzima lipolítica para su uso según la invención. La expresión un peso molecular de PVAc de aproximadamente 12800 significa peso molecular medio mediante cromatografía de permeación en gel (GPC). En este contexto, "de aproximadamente 12800" significa un peso molecular medio de entre 10000 y 20000. Un valor de pH de 6 o 8 del tampón puede ser bien pH 6 o bien pH 8. Ejemplos de tampones adecuados son tampón Hepes 5mM (pH 8), y MES 5mM (pH 6). En formas de realización particulares, el grado de hidrólisis es de al menos 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, o al menos de 2,0.

[0020] Sorprendentemente, parece que se requiere un grado relativamente pequeño de hidrólisis para reducir la pegajosidad de las impurezas adhesivas. En formas de realización particulares, el grado de hidrólisis es inferior al 10 %, o inferior al 9 %, o inferior al 8 %, o inferior al 7 %, o inferior al 6 %, o inferior al 5 %, o inferior al 4 %. En otras formas de realización particulares, el grado de hidrólisis está dentro de cualquier rango que se puede derivar de los valores superiores e inferiores anteriormente mencionados.

[0021] Para los fines de prueba según la prueba (b) anteriormente mencionada, el sustrato polimérico se emulsiona, y se seleccionan las condiciones de reacción tales como el pH, la temperatura y el período de incubación con la debida consideración de las características de la enzima en cuestión.

[0022] Ejemplos de temperaturas de reacción son: 10, 20, 30, 35, 37, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100°C.

[0023] Ejemplos de valores de pH de reacción son: pH 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o pH 12.

[0024] Ejemplos de tiempos de reacción son: 30 segundos, 1 minuto, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 60, 90, 120 o 180 minutos.

[0025] En una primera forma de realización particular la enzima puede tener, preferiblemente tiene, una actividad hidrolítica a 35°C, pH 8 durante 4 min con un 5 % (p/v) de preparación de homopolímero de poli(acetato de vinilo) (PVAc) como sustrato en una emulsión consistente en 50 mM de NaCl, 0,5 mM de KH₂PO₄, 9 % (p/v) de glicerol y 0,1 % (p/v) de goma arábica. En una forma de realización particular de esto, la preparación de homopolímero de poli(acetato de vinilo) (también llamado homopolímero PVAc) es un pegamento de dispersión de homopolímero de PVAc con un contenido de sustancia seca en el rango de 46 a 50 %, y una viscosidad en el rango de 5800 a 7200 mPa·s (Brookfield, 20°C). Un sustrato preferido es el producto GLUDAN™ 150-6.500 disponible en la compañía GLUDAN A/S, Vesterlundvej 5-7; DK-2730 Herlev, Dinamarca (como se usa en el ejemplo 1 de este documento). En esta primera forma de realización, la actividad hidrolítica se puede referir como "actividad hidrolítica de PVAc".

[0026] En una segunda forma de realización particular la enzima tiene una actividad hidrolítica a 35°C, pH 7 durante 4 min con un 5 % (p/v) de preparación de copolímero de etileno de acetato de vinilo como sustrato en una emulsión consistente en 50 mM de NaCl, 0,5 mM de KH₂PO₄, 9 % (v/v) de glicerol y 0,1 % (p/v) de goma arábica. En una forma de realización particular de esto, el copolímero de etileno de acetato de vinilo es un pegamento de dispersión de copolímero de etileno de PVAc con un contenido de sólido total de 56 a 60 %, y una viscosidad de 6000 a 7000 mPa·s (Brookfield, 20°C). Un sustrato preferido es el producto GLUDAN™ 534-6.500 disponible en la compañía GLUDAN A/S, Vesterlundvej 5-7; DK-2730 Herlev, Dinamarca (como se usa en el ejemplo 2 de este documento).

[0027] En una tercera forma de realización particular la enzima tiene una actividad hidrolítica a 35°C, pH 7 durante 4 min con un 5 % (p/v) de preparación de copolímero de etenil éster de ácido terc-decanoico y acetato de vinilo como sustrato en una emulsión consistente en 50 mM de NaCl, 0,5 mM de KH₂PO₄, 9 % (v/v) de glicerol y 0,1 % (p/v) de goma arábica. En una forma de realización particular de esto, la preparación de copolímero de etenil éster de ácido terc-decanoico y acetato de vinilo es un pegamento de dispersión de copolímero de acetato de vinilo y Veova con un contenido de sólido total de 55+/- 1 %, y una viscosidad de 1000 a 4000 cP (Brookfield, 23°C). Un sustrato preferido es el producto NOREMUL™ VW 1501 disponible en la compañía CHE-MARK ApS, Noerregade 10A, 2. T.v., DK-4600 Koege, Dinamarca (como se usa en el ejemplo 3 de este documento). Para las determinaciones de viscosidad, un viscosímetro adecuado es del tipo Brookfield LVF. Se puede usar un huso del nº 3 a una velocidad de 60 r.p.m.

[0028] Bajo estas condiciones la actividad hidrolítica (por ejemplo la actividad hidrolítica del PVAc) de una enzima lipolítica se determina añadiendo 200 microlitros de la enzima lipolítica, disueltos en agua desionizada que corresponde con A₂₈₀=0,15, para 15 ml de emulsión de sustrato, y una unidad de actividad hidrolítica (por ejemplo actividad hidrolítica de PVAc) se define como la liberación de 1 micromol de acetato medida por un pH-stat. Típicamente, A₂₈₀=0,15 corresponde a aproximadamente 0,10-0,40 mg proteína enzimática/ml, dependiendo del coeficiente de extinción para la enzima en cuestión. Para la mayor parte de las enzimas usadas en los ejemplos, A₂₈₀=0,15 puede corresponder a entre aproximadamente 0,20 y aproximadamente 0,30 mg de proteína enzimática/ml, por ejemplo 0,25 mg proteína enzimática/ml. En una forma de realización particular, la cantidad de proteína enzimática usada en los ensayos (es decir contenida en los 200 microlitros que se añaden a los 15 ml de emulsión de sustrato) es de entre aproximadamente 40 y aproximadamente 60, o de entre aproximadamente 45 y aproximadamente 55, o de aproximadamente 50 microgramos de proteína enzimática.

[0029] En una forma de realización particular, la enzima lipolítica puede tener, preferiblemente tiene, una actividad hidrolítica de PVAc superior a 0,2 unidades, particularmente 0,4 unidades o más particularmente 0,6 unidades.

[0030] En otra forma de realización particular, la enzima lipolítica tiene una actividad hidrolítica de PVAc de al menos 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,2, 2,4, 2,6, 2,8, 3,0, 3,2, 3,4, 3,6, 3,8, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10,0, 10,5, 11,0, 11,5, 12,0, 12,5, 13,0, o de al menos 13,5 unidades, por ml de la solución de enzima lipolítica con A₂₈₀ de 0,15.

[0031] En otra forma de realización particular, la enzima lipolítica tiene una actividad hidrolítica en el sustrato de copolímero de etileno y acetato de vinilo de al menos 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, o al menos 1,2 unidades/ml de solución enzimática con una A_{280} de 0,15.

5 [0032] En otra forma de realización particular, la enzima lipolítica tiene una actividad hidrolítica en el sustrato de copolímero de etenil éster de ácido terc-decanoico y acetato de vinilo de al menos 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, o de al menos 2,1 unidades/ml de solución enzimática con una A_{280} de 0,15.

10 [0033] En varias otras formas de realización, la enzima lipolítica:

(iv) está activa en la presencia de LAS ("activa" significa que la actividad (medida en unidades/ml) en cualquiera de los ensayos (i)-(iii), añadiendo 50 o 200 ppm de LAS a la reacción, es al menos del 50% en comparación con la actividad en un experimento de control sin adición de LAS); en otras formas de realización particulares la actividad es al menos del 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 120 o al menos de 130 % en comparación con el control;

15 (v) está estable en la presencia de LAS ("estable" significa que la actividad residual (medida en unidades/ml) usando cualquiera de los ensayos (i)-(iii), después de la preincubación de la enzima ($A_{280}=0;15$) durante 1, 2 o 3 horas, con pH 6 o 8, y una temperatura de 45°C, en 50 o 200 ppm de LAS (tampón de reposo pH 6 o 8), es al menos del 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 120 o al menos del 130 % en comparación con el control);

20 (v) muestra una turbidez más alta que el control después 20 minutos a 35, 45 o 55°C y pH=8 (utilizando tampón Hepes 5mM), en un sustrato de PVAc, donde el sustrato se prepara inyectando 0,15 ml 2 % p/v PVAc (PM \approx 113000) en una solución de MeOH en un tampón de 30 ml (véase tablas 4-6);

25 (v) es tolerante a peróxido de hidrógeno, es decir que se obtiene sustancialmente el mismo perfil de dosificación de enzima/turbidez con y sin adición de 15 ppm de peróxido de hidrógeno (véase tabla 9); y/o

(vi) es tolerante a LAS, es decir se obtiene sustancialmente la misma turbidez después de 20 minutos, pH 7, 45°C con 50 y 200 ppm LAS (véase tabla 11).

30 [0034] En una forma particular de realización la enzima lipolítica está bien definida, lo que significa que solo un componente enzimático principal está presente. En la alternativa, el término bien definido significa que solo un componente enzimático lipolítico principal está presente. Tales enzimas lipolíticas bien definidas, o purificadas, o, altamente purificadas, se pueden obtener como se conoce en la técnica y/o se describe en publicaciones sobre la enzima específica en cuestión. El fraccionamiento de una enzima bien definida en una columna de exclusión por tamaño apropiada revela solo un componente enzimático principal que es la enzima lipolítica en cuestión; o, en la alternativa, revela solo un componente enzimático lipolítico principal, que es la enzima lipolítica en cuestión.

35 [0035] Para que un valor máximo califique como un valor máximo principal, el área del valor máximo debería corresponder a al menos el 50, o 55, o 60, o 65, o 70, o 75, o 80, o 85, o 90, o 92, o 94, o 96, o al menos el 98 % del área de valor máximo total / área de valor máximo lipolítico total.

40 [0036] El trabajador experto sabrá cómo seleccionar una columna de cromatografía de exclusión por tamaño apropiada. Puede empezar fraccionando la preparación en por ejemplo una columna HiLoad26/60 Superdex75pg disponible en Amersham Biosciences UK Limited, Amersham Place, Little Chalfont, Buckinghamshire HP7 9NA, Reino Unido. Si los valores máximos no estuvieran claramente separados, el trabajador probaría con columnas diferentes (por ejemplo, con un tamaño de partícula de columna enmendada y/o longitud de columna), y/o corregiría el volumen de muestra. Véase el ejemplo 11 de este documento para detalles adicionales.

45 [0037] En otra forma de realización particular, la enzima lipolítica está desalada, es decir libre sustancialmente de materiales de bajo peso molecular tales como las sales. La cromatografía de filtración en gel es una técnica de desalación adecuada. Un material de columna preferido es Sephadex G-25, que asegura separaciones de grupo de proteínas/péptidos mayor que Mr 5000 de moléculas con una Mr inferior a 1000. Mr designa masa molecular relativa (peso molecular), y las unidades están en Dalton. Columnas adecuadas son columnas PD-10 disponibles por ejemplo en Amersham, cargadas con Sephadex G-25 M, o columnas NAP5. Se usa el procedimiento estándar prescrito por el proveedor y se usa agua desalada (MilliQ) para el equilibrado y la elución.

50 [0038] Para determinar la actividad lipolítica como se ha descrito anteriormente, se usa preferiblemente una preparación enzimática bien definida y/o desalada. Preferiblemente la preparación enzimática está bien definida y desalada. Como se describe en la sección Materiales y Métodos de este documento, para la realización de la prueba de actividad lipolítica, la preparación enzimática se diluye antes hasta una A_{280} de 0,15.

55 [0039] Ejemplos de enzimas lipolíticas tal como se ha definido anteriormente se encuentran típicamente entre las enzimas clasificadas en hidrolasas de éster carboxílico EC 3.1.1 según Enzyme Nomenclature (disponible en <http://www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/enzyme>, o en Enzyme Nomenclature 1992 (Academic Press, San Diego, California, with Supplement 1 (1993), Supplement 2 (1994), Supplement 3 (1995), Supplement 4 (1997) and

Supplement 5 (in Eur. J. Biochem. 1994, 223, 1-5; Eur. J. Biochem. 1995, 232, 1-6; Eur. J. Biochem. 1996, 237, 1-5; Eur. J. Biochem. 1997, 250, 1-6, y Eur. J. Biochem. 1999, 264, 610-650; respectivamente), que son enzimas capaces de hidrolizar enlaces de ésteres carboxílicos. La enzima lipolítica puede tener especificidad de sustrato con una actividad tal como lipasa de triacilglicerol EC 3.1.1.3 o cutinasa EC 3.1.1.74.

[0040] La cutinasa se puede derivar a partir de un hongo. Particularmente, la cutinasa se puede derivar a partir de una cepa de *Humicola*, particularmente *H. insolens*, más particularmente cepa de *H. insolens* DSM1800 (US 5,827,719) o a partir de una cepa de *Fusarium*, por ejemplo *F. roseum culmorum*, o particularmente *F. solani pisi* (WO 90/09446; WO 94/14964, WO 94/03578). La cutinasa fúngica también se puede derivar a partir de una cepa de *Rhizoctonia*, por ejemplo *R. Solani*, o una cepa de *Alternaria*, por ejemplo *A. Brassicicola* (WO 94/03578). La enzima lipolítica también puede ser una variante de una cutinasa progenitora tal como las que se describen en WO 00/34450 o WO 01/92502.

[0041] La SEQ ID NO:1 es la secuencia de aminoácidos de la cutinasa de *Humicola insolens* (correspondiente a la parte madura de la SEQ ID NO:2 de US 5,827,719), y la SEQ ID NO:2 es la secuencia de aminoácidos de la *Fusarium solani pisi* según la Fig. 1D de WO 94/14964.

[0042] Otro ejemplo es una lipasa como se clasifica en EC 3.1.1.3. Más particularmente, una lipasa derivada de *Pseudomonas*, tal como *P. putida* ATCC 53552 (WO 88/09367; WO 89/09263), *P. cepacia* (US 4,876,024), *P. mendocina* (US 5,389,536) *P. alcaligenes* (US 6,313,283), *P. gladioli* (EP 205208; EP 206390) o *Pseudomonas sp.* (US 5,942,431). La enzima lipolítica también puede ser una variante de una lipasa progenitora tal como las que se describen en por ejemplo EP 0943678, US 5,352,594 o WO 94/25578.

[0043] Otro ejemplo es lipasa B de *Candida antarctica* (US 5,273,898) o una enzima con una secuencia de aminoácidos, que tiene una homología de al menos el 60 %, particularmente el 65 %, más particularmente el 70 %, o el 75 %, o el 80 %, o el 85 %, o el 90 %, o el 92 %, o el 95 %, o el 97 %, o al menos el 99 % con lipasa B de *Candida antarctica* (US 5,273,898) tal como una lipasa de *Hyphozyma* (US 5,856,163). Esta lipasa tiene SEQ ID NO:3.

[0044] Otro ejemplo es una enzima con una secuencia de aminoácidos, que puede tener una homología de al menos el 70%, particularmente el 75 %, o el 80 %, el 90 %, el 92 %, el 95 %, el 97 %, o al menos el 99 % con la SEQ ID NO:1 o la SEQ ID NO:2.

[0045] En el contexto de la presente invención la homología se determina como el grado de similitud entre dos secuencias que indican una derivación de la primera secuencia a partir de la segunda. La similitud se determina mediante el programa de ordenador GAP proporcionado en el embalaje del programa de GCG (Program Manual for the Wisconsin Package, Version 8, agosto 1994, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, EE.UU. 53711) (Needleman, S.B. and Wunsch, C.D., (1970), Journal of Molecular Biology, 48, 443-453) usando GAP con la siguiente configuración para la comparación de la secuencia polipeptídica: penalización por creación de GAP de 3,0 y penalización por extensión de GAP de 0,1. En una forma de realización particular, la homología se determina como el grado de identidad utilizando el programa y los ajustes especificados anteriormente, en cuyo caso para los fines presentes "homología" se puede sustituir por "identidad" y "homólogos" por "idénticos".

Proceso de fabricación de papel

[0046] La presente invención se refiere a un método para elaborar papel que comprende: a) preparación de una pasta a partir de un material que comprende papel reciclado; b) tratamiento de la pasta con una enzima lipolítica seleccionada de lipasa y cutinasa que es capaz de hidrolizar un polímero que comprende monómero de acetato de vinilo; c) elaboración de papel a partir de la pasta tratada.

[0047] Para los fines de la presente invención, cualquier tipo de proceso de fabricación de papel es pertinente y/o cualquier pasta de fabricación de papel se puede aplicar, en tanto que comprenda papel reciclado. En formas de realización particulares, la cantidad de pasta basada en papel reciclado relativa a la cantidad total de pasta es de al menos el 2 %, o al menos el 4 %, o al menos el 6 %, o al menos el 8 %, o al menos el 10 %, o al menos el 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 o al menos el 95 %. En otras formas de realización particulares, la cantidad de pasta basada en papel reciclado relativa a la cantidad total de pasta no es más alta que el 25%, o no mayor que el 30%, o el 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o no mayor que el 98 %. En otras formas de realización particulares, la cantidad de pasta basada en papel reciclado relativa a la cantidad total de pasta se extiende dentro de cualquier intervalo que se puede derivar de los valores superiores e inferiores anteriormente mencionados. Se usa preferiblemente peso en seco para la determinación de la cantidad de pasta.

[0048] La parte de la pasta que no se deriva de papel reciclado se puede derivar de reducción a pasta mecánica, reducción a pasta química y cualquier mezcla de las mismas tales como reducción a pasta quimicomecánica, reducción a pasta termomecánica, reducción a pasta quimicotermeomecánica, etc.

- 5 [0049] Para la preparación de una pasta a partir de un material que comprende papel reciclado (o de desecho), también conocido como fibras secundarias, el material se mezcla, se dispersa o se suspende en agua. Este es el proceso conocido como reducción a pasta. Así se libera al menos parte de la tinta y otros contaminantes tales como pegamentos, adhesivos, recubrimientos, etc. de las fibras. Una pasta de papel comprende frecuentemente tanto papel reciclado como pasta nueva denominada pasta virgen. La pasta puede tener una consistencia alta (superior al 18 %), media (7-18 %), o baja (inferior al 7 %). En formas de realización particulares, el método y el uso de la invención se operan a consistencia de pasta alta, media o baja.
- 10 [0050] La fuente de fibra reciclada puede ser cualquiera de los grados de suministros reciclados conocidos en la técnica o mezclas de los mismos, al igual que mezclas de fibras recicladas con fibras vírgenes. Los grados principales de suministros de fibra reciclada son por ejemplo MOW (desechos de oficina mezclados), SOW (desechos de oficina clasificados), ONP (papel de periódico viejo), WM (revistas de desecho) y OCC (contenedores corrugados viejos).
- 15 [0051] Las enzimas lipolíticas para usar en el método y uso de la invención se describen en la sección de este documento con el encabezamiento "Enzimas lipolíticas".
- 20 [0052] La expresión "tratamiento de la pasta" significa básicamente añadir la enzima en cuestión a la pasta. El tratamiento tiene lugar en condiciones adecuadas. Las condiciones del tratamiento se pueden variar dependiendo de los parámetros o requisitos particulares del proceso de fabricación de papel y de las características de la enzima en cuestión, tales como los rangos de actividad y estabilidad del pH, rango de actividad y estabilidad de la temperatura, índice de hidrólisis, etc. Se describen ejemplos de condiciones de tratamiento en la sección de este documento encabezada por "Condiciones de proceso". En formas de realización particulares, las condiciones son adecuadas para reducir la cantidad de impurezas adhesivas, y/o para obtener un destintado (véase a continuación).
- 25 [0053] La fabricación de papel a partir de la pasta tratada comprende la formación de fibras tratadas con enzimas en los productos de papel o de cartón.
- 30 [0054] Además de los pasos a)-c), se pueden incluir pasos opcionales, por ejemplo uno o varios de los siguientes pasos:
- 35 d) destintado, por ejemplo mediante la reducción a pasta de las fibras en presencia de una solución alcalina acuosa, que contenga opcionalmente un compuesto de peróxido, tal como peróxido de hidrógeno;
- e) separación de las fibras de los contaminantes, por ejemplo mediante filtración (gruesas y/o finas);
- f) limpieza por centrifugación;
- 40 g) flotación, por ejemplo usando uno o más surfactantes;
- h) lavado, por ejemplo usando uno o más surfactantes;
- i) dispersión; por ejemplo usando uno o más surfactantes; y/o
- j) inactivación de las enzimas, si es necesario, por ejemplo mediante un paso de tratamiento térmico.
- 45 [0055] Se pueden incluir cualquier número de estos pasos adicionales y la secuencia no necesita ser como la que se indica a-b-c-d-e-f-g-h-i-j. En una forma de realización particular, se incluyen los pasos d) y/o j). Las enzimas lipolíticas tal y como se definen aquí se pueden usar ventajosamente también en el paso de destintado d).
- 50 [0056] La enzima se puede introducir antes de la reducción a pasta, durante una fase de reducción a pasta, durante o antes, preferiblemente justo antes, de una fase de preparación de la pasta, o después de una flotación o de una fase de destintado. En formas de realización particulares, se introduce en la caja de entrada de la máquina para papel, o en el agua blanca de la máquina de papel.
- 55 [0057] El proceso puede ser un proceso de bucle cerrado (donde al menos se reutiliza una parte del agua, por ejemplo reutilizando al menos un 10 %, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, o al menos un 80 % del agua (vol/vol)).
- 60 [0058] En otras formas de realización particulares del método y el uso de la invención, la enzima sirve el fin del control de impurezas adhesivas. Controlar impurezas adhesivas significa que la cantidad de impurezas adhesivas se reduce en comparación con un control no tratado con enzimas. En formas de realización preferidas, la cantidad de impurezas adhesivas en una muestra tratada con la enzima en cuestión es como máximo un 95 %, o 90 %, o 80 %, o 75 %, o 70 %, o 60 %, o 50 %, o 40 %, o 30 %, o como máximo un 20 % (p/p), en comparación con el control. Se puede utilizar cualquiera de los métodos descritos en los ejemplos 1-6 de WO01/98579 para esta determinación.
- 65 [0059] En otras formas de realización del método y el uso de la invención, la enzima sirve fines de destintado. La enzima se puede aplicar para eliminar la tinta del papel reciclado con la impresión hecha por cualquier método de

impresión, por ejemplo impresión offset, impresión de huecograbado e impresión tipográfica. El efecto de la enzima es mejorar la blancura o luminosidad y/o reducir la cantidad de tinta en el papel resultante. Esto se puede medir como se sabe generalmente en la técnica, por ejemplo, como se describe en la patente JP nº 96014078.

5 [0060] Los glicéridos presentes en la pasta virgen tienden a aglomerarse con un polímero que comprende monómero de acetato de vinilo procedente de la pasta de papel reciclado en las impurezas adhesivas. Así en otro ejemplo el método de la presente invención puede comprender una enzima lipolítica capaz de hidrolizar un polímero que comprende monómero de acetato de vinilo y una lipasa capaz de hidrolizar los enlaces estéricos en un glicérido, tales como los clasificados por EC 3.1.1.3.

10 [0061] Por consiguiente, el método y el uso según la invención se pueden realizar con una combinación de enzimas para hacer el proceso enzimático eficaz ante una gama más amplia de contaminantes, tales como impurezas proteicas, impurezas que contienen almidón, triglicéridos que contienen impurezas además de contaminantes que contienen hemicelulosas y pectinas. Las enzimas lipolíticas para uso según la invención
15 pueden por tanto combinarse con al menos una enzima adicional, seleccionada de entre proteasas, amilasas, pululanasa, lipasas, hemicelulasas, endoglucanasas, cutinasas y pectinasas. Estas enzimas pueden ser enzimas de tipo salvaje, o mutantes o variantes de las mismas con la actividad enzimática pertinente, es decir catalización de al menos una de las reacciones indicadas en el sitio web siguiente para la clase de enzima pertinente: <http://www.expasy.ch/enzyme/>.

20 [0062] Ejemplos de proteasas adecuadas son las proteasas ALCALASE, ESPERASE, SAVINASE, NEU-TRASE y DURAZYM. Otras serina proteasas preferidas son proteasas de *Nocardioptis*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Bacillus alcalophilus*, *B. cereus*, *B. natto*, *B. vulgatus*, *B. mycoide*, y subtilisinas de *Bacillus*, especialmente proteasas de las especies *Nocardioptis sp.* y *Nocardioptis dassonvillei* tales como las que se describen en WO 88/03947,
25 especialmente proteasas de las familias *Nocardioptis sp.*, NRRL 18262, y *Nocardioptis dassonvillei*, NRRL 18133. Otras proteasas preferidas son las serina proteasas de mutantes de *Bacillus subtilis*, por ejemplo aquellas que se describen en WO 91/00345 y EP 415296. Ejemplos de amilasas adecuadas son las amilasas BAN, AQUAZYM TERMAMYL y AQUAZYM Ultra. Un ejemplo de una lipasa es la lipasa RESINASE A2X. Un ejemplo de una hemicelulasa es la hemicelulasa PULPZYME HC. Ejemplos de endoglucanasas son los productos enzimáticos NOVOZYM 613, 342 y 476. Un ejemplo de una pectinasa es el producto enzimático NOVOZYME
30 863. Un ejemplo de una pululanasa es la pululanasa PROMOZYM. Las enzimas escritas en mayúsculas son enzimas comerciales disponibles en Novozymes A/S, Krogshoejvej 36; DK-2880 Bagsvaerd, Dinamarca.

35 [0063] Particularmente el método de la presente invención se puede utilizar en un polímero que comprende monómero de acetato de vinilo presente y/o en papel. Más particularmente, se puede usar para hidrolizar un polímero que comprende monómero de acetato de vinilo en una pasta de papel de papel reciclado para disminuir el problema de las impurezas adhesivas. Alternativamente, se puede usar para eliminar etiquetas, tal como etiquetas de correo y de botella. En otro ejemplo el método de la presente invención puede ser para el control de impurezas adhesivas durante el reciclaje de papel. El método de la presente invención se puede realizar
40 mediante agitación o agitación mecánica.

Condiciones del proceso

45 [0064] Para el método para elaborar papel y el uso en la fabricación de papel de al menos una enzima lipolítica tal y como se define aquí, la enzima lipolítica en cuestión no necesita ser tan pura como se ha descrito anteriormente. Ante todo, no necesita ser una preparación enzimática bien definida. En segundo lugar, la preparación enzimática puede no ser una preparación enzimática desalada.

50 [0065] En una forma de realización particular, sin embargo, la preparación enzimática está bien definida. Esto es así principalmente porque una preparación bien definida es ventajosa, por ejemplo en cuanto a la consistencia y reproducibilidad de resultados.

55 [0066] Las condiciones del proceso serán una función de la(s) enzima(s) aplicada(s), el tiempo de reacción y las condiciones dadas. Generalmente, la enzima se dosifica en una cantidad suficiente para controlar las impurezas adhesivas presentes en la pasta de papel. Sin embargo, se contempla que la(s) enzima(s) se puede(n) dosificar en una cantidad total de 0,1 a 5000 unidades por gramo de polímero que comprende monómero de acetato de vinilo, particularmente de 0,5 a 1000 unidades por gramo de polímero que comprende monómero de acetato de vinilo, más particularmente de 1 a 500 unidades por gramo de polímero que comprende monómero de acetato de vinilo donde una unidad se refiere a la actividad hidrolítica de PVAc como se ha descrito anteriormente.

60 [0067] En formas de realización particulares, la dosificación de la enzima lipolítica es de aproximadamente 100 a aproximadamente 100.000 unidades por tonelada de pasta de papel. En formas de realización particulares, estas unidades se refieren a (i) actividad hidrolítica de PVAc ; (ii) actividad en el copolímero de etileno de acetato de vinilo; o (iii) actividad en el copolímero de etenil éster de ácido terc-decanoico y acetato de vinilo (utilizando los métodos específicos en este documento). En una forma de realización preferida, las unidades se refieren a (i)
65 actividad hidrolítica de PVAc. Otros ejemplos de rangos de dosificación particulares (todos "de

aproximadamente" y "a aproximadamente" y en unidades por tonelada de pasta de papel) son los siguientes: 200-100.000, 400-100.000, 600-100.000, 800-100.000, 1000-100.000, 1200-100.000, 1500-100.000, 2000-100.000, 100-90.000, 100-80.000, 100-70.000, 100-60.000, 100-50.000, 100-40.000, 100-30.000, 100-20.000, 100-10.000; así como cualquier combinación de los valores superiores e inferiores aquí indicados.

[0068] En otras formas de realización particulares, la dosificación de la enzima lipolítica es de aproximadamente 0,1 mg de proteína enzimática a aproximadamente 100.000 mg de proteína enzimática por tonelada de pasta de papel. La proteína enzimática se puede determinar como se describe en el ejemplo 11 de este documento. Otros ejemplos de rangos de dosificación particulares (todos "de aproximadamente" y "a aproximadamente" y en unidades por tonelada de pasta de papel) son los siguientes: 0,5-100.000, 1-100.000, 5-100.000, 10-100.000, 20-100.000, 40-100.000, 60-100.000, 80-100.000, 100-100.000, 150-100.000, 200-100.000, 500-100.000, 0,1-90.000, 0,1-80.000, 0,1-70.000, 0,1-60.000, 0,1-50.000, 0,1-40.000, 0,1-30.000, 0,1-20.000, 0,1-10.000, 0,1-8.000, 0,1-6.000, 0,1-4.000, 0,1-2.000, 0,1-1.000; así como cualquier combinación de los valores superiores e inferiores aquí indicados.

[0069] El tratamiento enzimático se puede realizar a una temperatura de aproximadamente 10 a aproximadamente 100°C. Otros ejemplos de rangos de temperatura (todos "de aproximadamente" y "a aproximadamente") son los siguientes: 20-100, 30-100, 35-100, 37-100, 40-100, 50-100, 60-100, 70-100, 10-90, 10-80, 10-70, 10-60 y 30-60°C, así como cualquier combinación de los valores superiores e inferiores aquí indicados.

[0070] El tratamiento enzimático se puede realizar con un pH de aproximadamente 2 a aproximadamente 12. Otros ejemplos de rango de pH (todos "de aproximadamente" y "a aproximadamente") son los siguientes: 3-12, 4-12, 5-12, 6-12, 7-12, 8-12, 9-12, 2-11, 2-10, 2-9, 2-8, 4-10, 5-8 así como cualquier combinación de los valores superiores e inferiores aquí indicados.

[0071] Una duración adecuada del tratamiento enzimático puede estar en el rango de unos pocos segundos hasta varias horas, por ejemplo de aproximadamente 30 segundos a aproximadamente 48 horas, o de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 24 horas, o de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 18 horas, o de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 12 horas, o de aproximadamente 1 minuto a 5 horas, o de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 2 horas, o de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 1 hora, o de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 30 minutos.

Aditivos

[0072] Varios aditivos además de la enzima lipolítica se pueden usar en el proceso o uso de la invención. Por ejemplo, se puede utilizar talco, arcilla y otras partículas inorgánicas para hacer que las impurezas adhesivas sean menos pegajosas, y se pueden utilizar dispersantes, surfactantes, polímeros y solventes para reducir el tamaño de las impurezas adhesivas y/o tenerlas dispersas o suspendidas.

[0073] Los surfactantes y/o dispersantes se encuentran frecuentemente presentes y/o se añaden en una pasta de papel. Así pues, el método de la presente invención se puede realizar en presencia de un surfactante y/o dispersante aniónico, no iónico, catiónico y/o zwitteriónico usado de forma convencional en una pasta de papel. Una enzima capaz de hidrolizar un polímero que comprende monómero de acetato de vinilo puede ser una enzima, que está activa y estable en presencia de un surfactante y/o dispersante aniónico, no iónico, catiónico y/o zwitteriónico usado de forma convencional en una pasta de papel o durante el lavado de textiles.

[0074] Ejemplos de surfactantes aniónicos son carboxilatos, sulfatos, sulfonatos o fosfatos de alquilo, alquilo sustituido o arilo. Ejemplos de surfactantes no iónicos son compuestos de polioxietileno, tales como etoxilatos, propoxilatos o etoxilatos/propoxilatos de alcohol mezclados, poligliceroles y otros polioles, al igual que determinados copolímeros en bloque. Ejemplos de surfactantes catiónicos son polímeros catiónicos hidrosolubles, tales como sulfatos de amonio cuaternario y ciertas aminas, por ejemplo polímeros de epiclorohidrina/dimetilamina (EPI-DMA) y soluciones reticuladas de los mismos, cloruro amónico de polidialil dimetil (DADMAC), copolímeros DADMAC/Acrilamida y polímeros de ioneno, tales como los que se describen en las patentes de EE.UU. nº. 5,681,862; y 5,575,993. Ejemplos de surfactantes zwitteriónicos o anfotéricos son betaínas, glicinatos, propionatos de amino, iminopropionatos y varios derivados de imidazolina. También se pueden utilizar los polímeros que se describen en la patente de EE.UU. nº 5,256,252.

[0075] También según la invención, se pueden utilizar surfactantes tales como los anteriores, incluyendo cualquier combinación de los mismos, en un proceso de fabricación de papel junto con al menos una enzima lipolítica tal y como se define en este documento, y se pueden incluir en una composición junto con tal enzima. La cantidad de cada surfactante en tal composición puede ascender desde aproximadamente el 8 hasta aproximadamente el 40 % (p/p) de la composición. En formas de realización particulares la cantidad de cada surfactante es de aproximadamente 10 a aproximadamente 38, o de aproximadamente 12 a aproximadamente 36, o de aproximadamente 14 a aproximadamente 34, o de aproximadamente 16 a aproximadamente 34, o de aproximadamente 18 a aproximadamente 34, o de aproximadamente 20 a aproximadamente 34, o de

aproximadamente 22 a aproximadamente 34, o de aproximadamente 24 a aproximadamente 34, o de aproximadamente 26 a aproximadamente 34, o de aproximadamente 28 a aproximadamente 32 % (p/p).

5 [0076] En otra forma de realización particular, cada uno de los rangos anteriores se refiere a la cantidad total de surfactantes.

[0077] Las composiciones son preferiblemente aditivos para la fabricación de papel. En una forma de realización particular, son composiciones sin construir, es decir, que no contienen constructores. Ejemplos de constructores son determinados fosfatos, zeolitas, etc. usados de forma convencional en composiciones detergentes.

10 [0078] Las composiciones pueden comprender al menos una enzima adicional seleccionada del grupo siguiente de enzimas: proteasas, amilasas, pululanases, lipasas, hemicelulasas, endoglucanasas, cutinasas y pectinasas; así como cualquier combinación de las mismas.

15 [0079] Las composiciones se pueden estabilizar utilizando las formulaciones descritas en por ejemplo las patentes de EE.UU. nº 5,356,800; 5,780,283.

[0080] La invención también se refiere a:

20 (I) un método para la hidrolización de un polímero que comprende monómero de acetato de vinilo mediante tratamiento con una cutinasa; un método según lo anterior donde la cutinasa se deriva de un hongo; un método según lo anterior donde la cutinasa se deriva de *Humicola insolens* o *Fusarium solani* *pisii*; un método para la hidrolización de un polímero que comprende monómero de acetato de vinilo mediante tratamiento con una lipasa derivada de *Pseudomonas*; un método para la hidrolización de un polímero que comprende monómero de acetato de vinilo mediante tratamiento con una lipasa con una secuencia de aminoácidos, que tiene al menos un 60 % de homología con lipasa B de *Candida antarctica* SEQ ID nº 3; un método para hidrolizar un polímero que comprende monómero de acetato de vinilo mediante tratamiento con una enzima lipolítica que tiene una secuencia de aminoácidos, que tiene al menos un 70 % de homología con la SEQ ID NO.1 o la SEQ ID NO.2

30 (II) un método para la hidrolización de un polímero que comprende monómero de acetato de vinilo tratando el polímero con una enzima, que tiene una actividad hidrolítica a 35°C, pH 8 durante 4 min con 5 % (p/v) de homopolímero de poli(acetato de vinilo) (PVAc) como sustrato en una emulsión consistente en 50 mM de NaCl, 0,5 mM de KH₂PO₄, 9% (v/v) de glicerol y 0,1 % (p/v) de goma arábiga; y (III) uso de una enzima en la fabricación de papel, esta enzima tiene

35 a) un grado de hidrólisis por electroforesis capilar de al menos 0,1 después de 18 horas a 45°C en un sustrato de PVAc disperso, donde el sustrato de PVAc disperso se prepara inyectando 1,5 ml de 6 % de PVAc en el metanol en un tapón de 40 ml pH 6 o 8, y donde el peso molecular del PVAc es de aproximadamente 12800; y/o

40 b) una actividad hidrolítica a 35°C durante 4 min con un 5 % (p/v) de preparación de polímero que comprende acetato de vinilo como sustrato en una emulsión consistente en 50 mM de NaCl, 0,5 mM de KH₂PO₄, 9 % (v/v) de glicerol y 0,1 % (p/v) de goma arábiga, donde el polímero es:

45 (i) una preparación de homopolímero de PVAc y el pH de reacción es 8;
(ii) una preparación de copolímero de etileno de acetato de vinilo, y el pH de reacción es 7; y/o
(iii) una preparación de copolímero de etenil éster de ácido terc-decanoico y acetato de vinilo, y el pH de reacción es 7;

50 al igual que el uso anterior (III), donde la actividad hidrolítica bajo las condiciones de (i) es superior a 0,2 unidades, preferiblemente superior a 0,4 unidades, todavía más preferiblemente superior a 0,6 unidades; donde la enzima tiene una actividad hidrolítica de PVAc de al menos 0,7 unidades/ml; donde la actividad hidrolítica bajo las condiciones de (ii) es al menos 0,2 unidades/ml; donde la actividad hidrolítica bajo las condiciones de (iii) es al menos 0,2 unidades/ml; donde para la determinación del grado de hidrólisis según a), y para la determinación de la actividad hidrolítica según cualquiera de los pasos (i)-(iii), la enzima está bien definida; donde para la determinación del grado de hidrólisis según a), y para la determinación de la actividad hidrolítica según cualquiera de los pasos (i)-(iii), la enzima está desalada; donde para la determinación de la actividad hidrolítica según cualquiera de los pasos (i)-(iii), 200 microlitros de una solución enzimática de A₂₈₀ = 0,15, o 50 microgramos de proteína enzimática se añaden a 15 ml de emulsión de sustrato; para el control de impurezas adhesivas y/o para la fabricación de papel preparado al menos parcialmente basándose en papel reciclado; donde para la fabricación de papel la dosificación enzimática es de 0,1 a 5000 unidades de actividad hidrolítica de PVAc por gramo de polímero que comprende monómero de acetato de vinilo; donde la dosificación enzimática por tonelada de pasta de papel es: (i) de aproximadamente 100 a aproximadamente 100.000 unidades según (i) de (III); o (ii) de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 100.000 mg de proteína enzimática; donde la enzima está activa y estable en presencia de LAS y/o peróxido de hidrógeno: comprende

además el uso de al menos una enzima adicional, dicha enzima adicional se selecciona del grupo siguiente de enzimas: proteasas, amilasas, pululanasa, lipasas, hemicelulasas, endoglucanasas, cutinasas y pectinasas; y/o comprende además el uso de al menos un surfactante o dispersante aniónico, no iónico, catiónico y/o zwitteriónico.

5 Materiales y métodos

Enzimas

10 [0081]

- A) Cutinasa de *Humicola insolens* según US 5,827,719.
- B) Variante termoestable de A).
- C) Variante termoestable de A) según WO 00/34450.
- 15 D) Cutinasa de *Fusarium solani pisi* según WO 94/14964.
- E) Lipasa B de *Candida antarctica* según US 5,273,898.
- F) Lipasa de *Pseudomonas cepacia* según US 4,876,024.
- G) Lipasa de *Pseudomonas* sp. de según US 5,942,431.
- H) Fosfolipasa de páncreas porcino.
- 20 I) Lipasa NOVOCOR ADL.
- J) Lipasa RESINASE A 2X.
- K) Variante de J) con lipasa y actividad fosfolipásica según WO 00/32758.
- L) Esterasa de ácido ferúlico de *Aspergillus niger*.

25 [0082] Las lipasas NOVOCOR ADL y RESINASE A 2X son productos enzimáticos comerciales disponibles en Novozymes A/S, Krogshoejvej 36; DK-2880 Bagsvaerd, Dinamarca.

30 [0083] Las variantes de la cutinasa de *Humicola insolens* mostradas a continuación en la tabla A fueron preparadas como se describe en WO 00/34450 y WO 01/92502 y evaluadas para actividad lipolítica como se describe a continuación. Los resultados de la prueba para dos de estas variantes se indican en los ejemplos como B) y C).

TABLA A

R51P
E6N/Q+L138I
A14P+E47K
E47K
E179N/Q
E6N/Q+E47K+R51P
A14P+E47K+E179N/Q
E47K+E179N/Q
E47K+D63N
E6N/Q+E10N/Q+A14P+E47K+R51P+E179N/Q
E6N/Q+A14P+E47K+R51P+E179N/Q
E6Q +A14P +E47K +R51P +E179Q
Q1P+L2V+S11C+N15T+F24Y+L461+E47K
E6Q+A14P+E47K+R51P+E179Q+S48E+A88H+N91H+R189V
E6Q+A14P+E47K+R51P+E179Q+N44D+A130V
E6Q+A14P+E47K+R51P+E179Q+Q1C+L2V+G120D
E6Q+A14P+E47K+R51P+E179Q+A88L+R189A
E6Q+A14P+E47K+R51P+E179Q+S48E+L661+A88L+1169A+R189H
E6Q+A14P+E47K+R51P+E179Q+A88V+S116K+S119P+Q139R+1169V+R189V
E6Q+A14P+E47K+R51P+E179Q+A88V+R189A
E6Q+A14P+E47K+R51P+E179Q+S48K+A88H+1169G+R189H
E6Q+A14P+E47K+R51P+E179Q+Q1L+L2Q+A4V+S11T
E6Q+A14P+E47K+R51P+E179Q+T164S
E6Q+A14P+E47K+R51P+E179Q+L174F
E6Q+A14P+E47K+R51P+E179Q+H49Y
E6Q+A14P+E47K+R51P+E179Q+G8D+N15D+A16T

ES 2 650 406 T3

E6Q+A14P+E47K+R51P+E179Q+A130V
E6Q+A14P+E47K+R51P+E179Q+Q1C+L2V
E6Q+A14P+E47K+R51P+E179Q+G8D+N15D+S48E+A88H+N91H+A130V+R189V
E6Q+A14P+E47K+R51P+E179Q+G8D+N15D+T29M+S48E+A88H+N91H+A130V+R189V
E6Q+A14P+E47K+R51P+E179Q+G8D+N15D+T291+S48E+A88H+N91H+A130V+R189V
E6Q+A14P+E47K+R51P+E179Q+G8D+N15D+T29C+S48E+A88H+N91H+A130V+R189V
E6Q+A14P+E47K+R51P+E179Q+G8D+N15D+S48E+A88H+N91H+A130V+L174F+I178V+R 189V
E6Q+A14P+E47K+R51P+E179Q+G8D+N15D+S48E+A88H+N91H+A130V+T166M+I168F+ R189V
E6Q+A14P+E47K+R51P+E179Q+G8D+N15D+S48E+A88H+N91H+A130V+T166I+L167P+R 189V
E6Q+A14P+E47K+R51P+E179Q+G8D+N15D+V38H+S48E+A88H+N91H+A130V+I169T+R 189V
E6Q+A14P+E47K+R51P+E179Q+G8D+N15D+V38H+S48E+A88H+N91H+A130V+R189V
E6Q+A14P+E47K+R51P+E179Q+G8D+N15D+T29M+S48E+A88H+N91H+A130V+T166I+L1 67P+R189V

Reactivos/sustratos

[0084]

5

0,025 M de NaOH

Tampón MES 5 mM pH 6-6,5

10 [0085]

0,98 g de MES Hidrato de Ácido 2-[N-Morfolino]Etanosulfónico

0,44 g de CaCl₂, 2 H₂O

0,246 g de MgSO₄, 7 H₂O

15 Agua Milli Q adicionada hasta 1 litro

pH ajustado con NaOH o HCl débil

Tampón Hepes 5 mM pH 7-9

20 [0086]

1,19 g de Hepes (N-[2-Hidroxietilo] Piperazina-N'-[2-Ácido Etanosulfónico])

0,44 g de CaCl₂, 2 H₂O

0,246 g de MgSO₄, 7 H₂O

25 Agua Milli Q adicionada hasta 1 litro

pH ajustado con NaOH o HCl débil

6 % p/v de poli(acetato de vinilo) PVAc en solución MeOH

30 [0087]

6 g de PVAc PM ≈12800 (GPC) (Aldrich Chemical Company. Inc. Cat. Nº 43,043-9)

disuelto en aprox. 80 ml de MeOH a aprox. 50°C. Dejar enfriar.

Se añade MeOH hasta 100 ml

35

2 % p/v de poli(acetato de vinilo) PVAc en solución MeOH

[0088]

40 2 g de PVAc PM ≈113000 (Aldrich Chemical Company. Inc. cat. Nº 18.948-0)

disuelto en aprox. 80 ml de MeOH a aprox. 50°C. Dejar enfriar.

Se añade MeOH hasta 100 ml

LAS (LAS Nansa 1169 A, sal de sodio de sulfonato de benceno de dodecilo, Albright & Wilson).

Reactivo de emulsión

[0089]

50 17,9 g de NaCl

0,41 g de KH₂PO₄

540 ml de glicerol

ES 2 650 406 T3

6,0 g de goma arábica

[0090] NaCl, KH_2PO_4 , glicerol y 400 ml de agua destilada se mezclan antes de añadir goma arábica bajo agitación fuerte. La agitación continúa hasta que se disuelve completamente. Se añade agua destilada hasta 1 l.

5

Emulsión de sustrato para los ejemplos 1-3

[0091]

10	15 g	PVAc o de homopolímero o copolímero (Gludan, Dinamarca) (ejemplo 1, y ejemplos 2-3, respectivamente)
	50 ml	Reactivo de emulsión
	235 ml	Agua destilada

15 [0092] La solución se agita durante aproximadamente 30 min hasta que se disuelve todo el sustrato.

Equipo

[0093]

20	Valorador:	radiómetro Titralab (Vit 90)
	Electrodo:	Orión 8103 Ross - semimicroelectrodo de pH de combinación, cuerpo de vidrio.
		Turbidímetro: turbidímetro HACH 2100AN con un filtro USEPA cat. 30312-00, que incluye un vidrio especial (celdas de muestra cat. N° 20849-00) que se ajusta en el equipo.
25	Baño de agua: mm)	baño de agua que incluye un agitador magnético (barras de agitación oblongas, 15 mm)
	Baño de agua:	baño de agua con control de temperatura.
	Filtros:	filtros 0,22 micro-m (filtros de uso único Millex-GV de Millipore)
30	Electroforesis capilar:	Hewlett Packard 3D CE con software Chemstation
	Tampón de Agilent:	Tampón de aniones básico de Agilent para HPCE, N° pieza 5064-8209
	Capilar de Agilent:	Agilent, sílice fundida, CE ext. Tapa del recorrido de la luz. Diámetro interno de 50 micro-m, longitud eficaz de 104 cm, longitud total de 112,5 cm, n° pieza G1600-64232
35	Tensiómetro:	KSV Sigma 70 modelo 6000, equipado con una placa de Wilhelmy de platino (dim. 10 mm x 20 mm), regulación de temperatura y agitación de solución

EJEMPLOS

EJEMPLOS 1-3

40

[0094] Las preparaciones poliméricas que comprenden monómero de acetato de vinilo se hidrolizan a un pH constante bajo liberación de acetato por una enzima. La liberación de acetato en función del tiempo se mide mediante neutralización con base por valoración de pH-stat.

45

[0095] El valorador (véase equipo) se enciende, el baño de agua se fija a 35°C y el electrodo se calibra utilizando tampones de calibración regulares. Se añaden quince ml de emulsión de sustrato a cada vaso de precipitados y se permite que se calienten durante 3 min para obtener la temperatura adecuada (el sustrato debería agitarse en todo momento antes del uso para evitar la precipitación). El pH se ajusta con una solución de NaOH (25 mM) recientemente disuelta. Se preparan soluciones enzimáticas (en agua desionizada) basándose en enzimas altamente purificadas y enzimas desaladas que corresponden con enzimas A)-L). Las soluciones corresponden a una absorbancia de $A_{280} = 0,15$, y se añaden 200 microlitros de las mismas a la emulsión de sustrato y la valoración se inicia, usando 25 mM de NaOH. Después de 4 min la valoración se detiene. El consumo medio en ml por minuto de NaOH se calcula para el periodo de 2-4 minutos, y este valor se usa para el siguiente cálculo de unidad.

50

[0096] Se define 1 unidad de enzima como la cantidad de enzima que libera 1 micromol de acetato valorable por min por hidrólisis del sustrato bajo las condiciones dadas. Las unidades/ml como se indica en las tablas siguientes se refieren a ml de la solución enzimática de $A_{280}=0,15$.

55

Ejemplo 1

Hidrólisis de homopolímero de PVAc

60

[0097] La capacidad de diferentes enzimas lipolíticas para degradar una preparación de homopolímero de PVAc se midió como se ha descrito anteriormente. Antes de añadir la enzima a la emulsión de sustrato, se ajustó el pH a 8. Los resultados se muestran en la tabla 1.

Tabla 1

Tipo de enzima	Enzima	actividad hidrolítica de PVAc de (U/ml)
Cutinasa	A) <i>H. insolens</i>	2,9
	B) Variante termoestable de A)	1,8
	C) Variante termoestable de A)	3,0
	D) <i>F. solani pisi</i>	1,0
Lipasa B de <i>C. antarctica</i>	E) <i>C. antarctica</i>	13,6
Lipasa de <i>Pseudomonas</i>	F) <i>P. cepacia</i>	0,6
	G) <i>P. sp.</i>	0,2
Otras lipasas	H) Fosfolipasa de páncreas porcino	0
	I) Lipasa NOVOCOR ADL	0
	J) Lipasa RESINASE A 2X	0
	K) Variante de J)	0
	L) Esterasa de ácido ferúlico de <i>A. niger</i>	0

Ejemplo 25 Hidrólisis de un copolímero de acetato de vinilo

[0098] La capacidad de las enzimas lipolíticas para degradar una preparación de copolímero de acetato de vinilo consistente en acetato de vinilo y etileno se midió como se ha descrito anteriormente. Antes de añadir la enzima a la emulsión de sustrato, se ajustó el pH a 7. Los resultados se muestran en la tabla 2.

10

Tabla 2

Tipo de enzima	Enzima	Actividad hidrolítica (U/ml)
Cutinasa	A) <i>H. insolens</i>	1,2
	B) Variante termoestable de A)	0,6
	C) Variante termoestable de A)	0,5
Lipasa B de <i>C. antarctica</i>	G) <i>C. antarctica</i>	0,3
Otras lipasas	J) Lipasa RESINASE A 2X	0

Ejemplo 315 Hidrólisis de un copolímero de acetato de vinilo a base de látex

[0099] La capacidad de enzimas lipolíticas para degradar una preparación de copolímero de etenil éster de ácido terc-decanoico y acetato de vinilo se midió como se ha descrito anteriormente. Antes de añadir la enzima a la emulsión de sustrato, se ajustó el pH a 7. Los resultados se muestran en la tabla 3.

Tabla 3

Tipo de enzima	Enzima	actividad hidrolítica (U/ml)
Cutinasa	A) <i>H. insolens</i>	1,9
	B) Variante termoestable de A)	1,9
	C) Variante termoestable de A)	2,1
Otras lipasas	J) Lipasa RESINASE A 2X	0

20

Ejemplos 4-10

[0100] En los ejemplos 4-10 se usa poli(acetato de vinilo) puro, abreviado PVAc, como un sustrato. El PVAc no es soluble en agua sino en metanol. Cuando cantidades pequeñas de PVAc solubilizadas en metanol se inyectan en agua, el PVAc se precipita momentáneamente en partículas extremadamente pequeñas y el líquido se vuelve turbio. Estas partículas tienden a aglomerarse en partículas mucho mayores debido a su pegajosidad, dando como resultado una turbidez disminuida. Con enzimas que muestran actividad lipolítica (por ejemplo actividad hidrolítica de PVAc) se puede evitar esta aglomeración. Por consiguiente, el efecto de una enzima lipolítica se mide directamente como la turbidez de la dispersión de PVAc en función del tiempo. La turbidez se mide en unidades NTU (unidades nefelométricas de turbidez). Un número bajo indica que la muestra está clara, y un número alto que la muestra está turbia (es decir, las enzimas trabajan para reducir la pegajosidad). En estos ejemplos, la dosificación enzimática se da en ppm (p/p) de proteína enzimática.

25

30

Ejemplo 4

Capacidad para aglomerar PVAc

5 [0101] Añadir una barra de agitación y 30 ml de tampón al vidrio. Poner el vidrio en el baño de agua y esperar que se ajuste a la temperatura prescrita. La velocidad del agitador magnético se mantiene constante. Eliminar una cantidad del tampón que corresponde con el volumen de la solución enzimática que se va a adicionar (para asegurar que el volumen es constante). Añadir la enzima. Inyectar 0,15 ml 2 % p/v de PVAc (PM ≈113000) en la
 10 solución de MeOH e iniciar el temporizador. Después de agitar durante 10 segundos, se determina la turbidez en tiempo = 0. Medir la turbidez en función del tiempo.

15 [0102] Los resultados utilizando 10 ppm de enzima B), a 35, 45 o 55°C, respectivamente, y pH=8 (utilizando tampón Hepes de 5mM) se muestran en las tablas 4-6 siguientes, respectivamente.

Tabla 4

Tiempo (min)	Turbidez (NTU) Muestra sin alterar 35°C	Turbidez (NTU) 10 ppm enzima B) 35°C
0	118	
1	110	
2	97	
3	87	
4	80	
8	31	
0		134
1		126
2		120
3		117
4		115
5		113
6		113
13		109
18		107
37		106
60		105
120		97

Tabla 5

Tiempo (min)	Turbidez (NTU) Muestra sin alterar 45°C	Turbidez (NTU) 10 ppm enzima B) 45°C
0	107	
1	104	
2,5	81	
4	71	
6	59	
8	49	
10	37	
12	32	
13	29	
0		118
1,5		112
4		108
7		106
10,5		105

ES 2 650 406 T3

53		103
60		103

Tabla 6

Tiempo (min)	Turbidez (NTU) Muestra sin alterar 55°C	Turbidez (NTU) 10 ppm enzima B) 55°C
0	101	
1	98	
3	77	
5	67	
7	60	
9	53	
11	49	
13	44	
15	40	
17	37	
20	33	
22	31	
0		135
2		132
3		132
6		132
11		130
13		130
20		129
75		125

[0103] La tabla 7 muestra cifras dosis/respuesta para dos enzimas lipolíticas a 45°C, pH=8 utilizando tampón Hepes 5 mM. La turbidez se midió después de 20 minutos. Las figuras son un promedio de tres experimentos.

5

Tabla 7

Dosificación de enzima (ppm)	Turbidez (NTU) Enzima B)	Turbidez (NTU) Enzima C)
0	11	
0,5	45	
1	57	
1,5	88	
2	91	
3,5	112	
5	115	
10	120	
0		11
10		43
50		51

[0104] La tabla 8 muestra el efecto de una enzima lipolítica frente pH (45°C; turbidez después de 20 minutos; dosificación enzimática 10 ppm de enzima B). Las figuras son un promedio de tres experimentos.

Tabla 8

pH	Turbidez (NTU) Muestra sin alterar	Turbidez (NTU) 10 ppm enzima C)
6	8,6	44,3
6,5	10,5	118
7	10,5	114,7
8	12,3	130
9	19	129

10	12,6	127,5
----	------	-------

Ejemplo 5

Tolerancia hacia peróxido de hidrógeno

5 [0105] Se utilizó la misma disposición que en el ejemplo 4. La turbidez se mide después de 20 minutos, pero aquí se añadieron 15 ppm de peróxido de hidrógeno a nivel constante a diferentes niveles de dosificación de enzima de enzima B); temperatura 48°C; pH = 8,5 utilizando tampón Hepes 5 mM. Los resultados se muestran en la tabla 9 siguiente.

10 Tabla 9

Dosificación Enzima B) (ppm)	Turbidez (NTU) con 15 ppm de peróxido	Turbidez (NTU) sin peróxido
0	19	12
0,1	37	32
0,5	82	86
1	118	114
2,5	123	130

15 [0106] En otro experimento se combinó un nivel de dosificación de enzima constante de 0,5 ppm de enzima B) con varios niveles de peróxido de hidrógeno (0-1000 ppm). Los resultados se muestran en la tabla 10 siguiente.

15 Tabla 10

Dosificación de peróxido (ppm)	Turbidez (NTU)
0	93
15	86
200	102
600	101
1000	92

Ejemplo 6

Tolerancia ante LAS (sulfonato de alquilbenceno lineal)

20 [0107] Se usó la misma disposición que en el ejemplo 4. Tampón Hepes 5 mM pH=7; 45°C; la turbidez se midió después de 20 minutos. Se añadieron dos niveles diferentes de LAS al ensayo: 50 y 200 ppm. Los resultados se muestran en la tabla 11 siguiente.

25 Tabla 11

	Turbidez (NTU)
Muestra sin alterar pH 7, 50 ppm LAS	116
Muestra sin alterar pH 7, 200 ppm LAS	133
0,5 ppm Enzima B; pH 7, 50 ppm LAS	226
0,5 ppm Enzima B; pH 7, 200 ppm LAS	220

Ejemplo 7

Medición del grado de hidrólisis de homopolímero de acetato de vinilo.

30 [0108] El grado de hidrólisis (desacetilación) de un polímero que comprende monómero de acetato de vinilo se puede medir mediante detección de acetato liberado en la solución. Se puede detectar acetato en pequeñas concentraciones de acetato y se puede cuantificar mediante análisis de electroforesis capilar.

ES 2 650 406 T3

[0109] 40 ml de tampón Hepes 5 mM, pH = 8 se calientan a 50°C en matraces de Erlenmeyer cerrados en el baño de agua caliente. La enzima se dosifica en el tampón en cantidades según la tabla siguiente. Luego se inyecta 6 % p/v de PVAc en el metanol (PM ≈12800) en el tampón en cantidades según la tabla siguiente. Se toman muestras después de 18 horas y se filtran a través de filtros de 0,22 micro-m. La cantidad de acetato en estas muestras se detecta mediante electroforesis capilar, utilizando tampón de Agilent y capilar de Agilent (véase lista de equipo).

Programa: temperatura 30°C, Voltaje -30kV. Descarga 4 min con tampón. Inyectar muestra a 50 mbar, 6 seg., inyectar tampón a 50 mbar, 10 seg. Elución durante 20 min. Señal de detección: 350/20 nm. Señal de referencia: 275/10 nm.

[0110] Una curva estándar de acetato 0-450 ppm de acetato se realiza en paralelo. Los valores máximos de acetato se integran, y las cantidades en las muestras se determinan con relación a la curva estándar. El grado de hidrólisis del PVAc se determina mediante el cálculo de la cantidad real de monómero de acetato de vinilo en el matraz desde el principio. El acetato de vinilo tiene un PM de 86 g/mol.

[0111] Para los experimentos nº 1-6 con inyección de 1,5 ml de solución de PVAc, los cálculos son de la siguiente manera:

$$\frac{0,0015 \text{ litros} * 60 \text{ g VAc/litro}}{86 \text{ g/mol} * 0,0415 \text{ litros}} = 2,522 * 10^{-2} \text{ mol/litro}$$

[0112] Los resultados se muestran en la tabla 12 siguiente. Un grado de hidrólisis del 1 % dará lugar a una concentración de acetato de $2,522 * 10^{-4}$ mol/litro = 15,1 mg/litro = 15,1 ppm de acetato. Para los experimentos 1-6, el grado de hidrólisis (%) se calcula con respecto al 1 % de hidrólisis que corresponde con 15,1 ppm de acetato. Para los experimentos 7-12, los cálculos dan un 1 % de hidrólisis que corresponde con 29,2 ppm de acetato.

Tabla 12

Experimento nº	PVAc inyectado	Dosificación de enzima	Grado de hidrólisis después de 18 horas
1	1,5 ml	10 ppm de enzima B)	1,9
2	1,5 ml	10 ppm de enzima B) + 1 ppm de enzima J)	1,4
3	1,5 ml	10 ppm de enzima B) + 10 ppm de enzima J)	1,6
4	1,5 ml	1 ppm de enzima J)	0
5	1,5 ml	10 ppm de enzima J)	0
6	1,5 ml	Muestra sin alterar	0
7	3,0 ml	10 ppm enzima B)	1,1
8	3,0 ml	10 ppm enzima B) + 1 ppm de enzima J)	1,3
9	3,0 ml	10 ppm enzima B) + 10 ppm de enzima J)	1,3
10	3,0 ml	1 ppm de enzima J)	0
11	3,0 ml	10 ppm de enzima J)	0
12	3,0 ml	Muestra sin alterar	0

Ejemplo 8

Medición del grado de hidrólisis de homopolímero de acetato de vinilo a pH y temperaturas diferentes.

[0113] Este ejemplo se realiza exactamente como en el ejemplo 7, pero con condiciones diferentes, es decir pH=6 utilizando tampón MES 5 mM o pH=8 utilizando tampón Hepes 5 mM a 35°C, 45°C y 55°C. Los resultados se muestran en la tabla 13 siguiente.

Tabla 13

Experimento nº	PVAc inyectado	Temperatura	pH	Dosificación de enzima	Grado de hidrólisis después de 18 horas
1	1,5 ml	35°C	8	Muestra sin alterar	0
2	1,5 ml	35°C	8	10 ppm de enzima C)	1,4

3	1,5 ml	35°C	8	10 ppm de enzima B)	2,0
4	1,5 ml	35°C	6	Muestra sin alterar	0
5	1,5 ml	35°C	6	10 ppm de enzima C)	1,0
6	1,5 ml	35°C	6	10 ppm de enzima B)	-*
7	1,5 ml	45°C	8	Muestra sin alterar	0
8	1,5 ml	45°C	8	10 ppm de enzima C)	1,4
9	1,5 ml	45°C	8	10 ppm de enzima B)	1,5
10	1,5 ml	45°C	6	Muestra sin alterar	0
11	1,5 ml	45°C	6	10 ppm de enzima C)	1,1
12	1,5 ml	45°C	6	10 ppm de enzima B)	1,4
13	1,5 ml	55°C	8	Muestra sin alterar	0
14	1,5 ml	55°C	8	10 ppm de enzima C)	2,2
15	1,5 ml	55°C	8	10 ppm de enzima B)	3,0
16	1,5 ml	55°C	6	Muestra sin alterar	0
17	1,5 ml	55°C	6	10 ppm de enzima C)	1,3
18	1,5 ml	55°C	6	10 ppm de enzima B)	1,5
* error experimental, resultado descartado					

Ejemplo 9

Prevenición de deposición de aglomerados de PVAc en metal

5

[0114] Los aglomerados de PVAc tienen una alta tendencia a precipitarse y adherirse a superficies diferentes como metales y materiales hidrofóbicos usados por ejemplo para formar fieltros, prensar fieltros, etc. Las enzimas lipolíticas descritas en este documento cuando se añaden al PVAc que contiene la solución evitarán la formación de estas impurezas adhesivas (los aglomerados no se adhieren a superficies de vidrio).

10

[0115] Se calientan 200 ml de un tampón Hepes 5mM pH=8 a 45°C. Se añaden 10 ppm de enzima B) a un vaso de precipitados. Se ejecuta un vaso de precipitados sin adición de enzima en paralelo como una muestra sin alterar de enzima. La agitación se realiza mediante imanes recubiertos de vidrio. Se sumerge una superficie metálica en las soluciones. 4 ml 2 % p/v de PVAc (PM = 113000) en la solución de metanol se inyectan en las soluciones. El experimento se detiene después de 10 minutos.

15

[0116] Una foto de las superficies metálicas se anexa como Fig. 1. La barra de la izquierda se refiere al experimento con enzima B adicionada, y la barra de la derecha se refiere al experimento de control sin enzima adicionada. La superficie de la barra de la izquierda aparece limpia, mientras la solución de PVAc permanece turbia. En cambio, el experimento de control (barra de la derecha) muestra aglomerados de PVAc adheridos a la superficie metálica, y la solución circundante se vuelve clara.

20

Ejemplo 10

Prevenición de deposición de PVAc en la superficie metálica

25

[0117] La deposición de aglomerados en superficies metálicas se puede cuantificar como la absorción de masa en una superficie bien definida. Para este propósito se puede aplicar un tensiómetro equipado con una placa de Wilhelmy. El tensiómetro se acciona para medir el aumento de peso de la placa de Wilhelmy después de sumergir lentamente la placa totalmente en una solución de PVAc cada 2 minutos. Se determina el peso después de 10 minutos.

30

[0118] La placa de Wilhelmy se limpia mediante inmersión en etanol y quemándola en una llama de quemador de gas. La placa limpia se coloca en la balanza electrónica del tensiómetro. 100 ml del tampón Hepes 5 mM pH=8 se calientan a la temperatura deseada (35°C o 45°C) en el vaso de precipitados del tensiómetro. Se añade enzima.

35

[0119] Se inyectan 2 ml de 2% p/v de PVAc (PM = 113000) en la solución de metanol. Se inicia el movimiento arriba/abajo de la placa de Wilhelmy. Después de 10 minutos se determina el peso de la placa. Una baja absorción de peso indica prevención de deposición de PVAc. Los resultados obtenidos a una temperatura de 35 y 45°C, respectivamente, se muestran en tablas 13 y 14, respectivamente.

40

Tabla 13

Dosificación	Dosificación	Absorción de masa
--------------	--------------	-------------------

Enzima B) (ppm)	Enzima C) (ppm)	(mg) t=10 min
0		127
2		114
5		67
6		8
7,5		8
10		7
	0	127
	10	129
	50	66
	100	22

Tabla 14

Dosificación Enzima B) (ppm)	Dosificación Enzima C) (ppm)	Absorción de masa (mg) t=10 min
0		32
0,5		12
1		4,3
2		4,5
5		5,4
10		5,7
	0	32
	100	26

Ejemplo 115 Determinación de pureza de enzimas lipolíticas

[0120] La concentración de proteína de una muestra enzimática se determina con un equipo de ensayo de proteína BCA de PIERCE (idéntico a PIERCE cat. 23225). La sal de sodio de ácido bicinónico (BCA) es un compuesto hidrosoluble estable capaz de formar un complejo morado intenso con iones de cobre (Cu^{1+}) en un ambiente alcalino. El reactivo BCA forma la base del equipo de ensayo de proteína BCA capaz de supervisar iones de cobre producidos en la reacción de proteína con alcalino Cu^{2+} (reacción de Biuret). El color producido en esta reacción es estable y aumenta en una forma proporcional con concentraciones de proteína en aumento (Smith, P.K., et al. (1985), Analytical Biochemistry, vol. 150, pp. 76-85). La solución de trabajo de BCA se hace mezclando 50 partes de reactivo A con 1 parte de reactivo B (el reactivo A es PIERCE cat. N° 23223, contiene BCA y tartrato en un tampón carbonato alcalino; el reactivo B es PIERCE cat. N° 23224, contiene 4 % de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$). Una muestra de 300 ml se mezcla con 3,0 ml de solución de trabajo de BCA. N° 23223, contiene BCA y tartrato en un tampón carbonato alcalino; el reactivo B es PIERCE cat. N° 23224, contiene 4 % de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$). Una muestra de 300 ml se mezcla con 3,0 ml de solución de trabajo de BCA. Después de 30 minutos a 37°C, la muestra se enfría a temperatura ambiente y se lee A_{490} como una medida de la concentración de proteína en la muestra. Diluciones de albúmina de suero bovino (PIERCE cat. N° 23209) se incluyen en el ensayo como un estándar.

[0121] Si la enzima lipolítica está en forma sólida, el producto primero se disuelve/suspende en 20 volúmenes de 100 mM de H_3BO_3 , 10 mM ácido 3,3'-dimetilglutámico, 2mM de CaCl_2 , pH 6 (tampón A) durante al menos 15 minutos a 5°C, y si la enzima en esta fase es una suspensión, la suspensión se filtra a través de un filtro de 0,45 micro-m para dar una solución clara. La solución se trata a partir de este punto como una enzima lipolítica líquida.

[0122] Si la enzima lipolítica es un líquido, el producto primero se dializa en un tubo de diálisis SpectraPor de corte 6-8000 Da (n° de catálogo. 132 670 de Spectrum Medical Industries) contra 100 volúmenes de tampón A + 150 mM de NaCl (tampón B) durante al menos 5 horas a 5°C, para eliminar productos químicos de la formulación que podrían dar lugar a una alta viscosidad, que es perjudicial para la cromatografía de exclusión por tamaño.

[0123] La enzima lipolítica dializada se filtra a través de un filtro de 0,45 micro-m si se formó un precipitado durante la diálisis. La concentración de proteína en el producto enzimático dializado se determina con el ensayo

de concentración de proteína descrito anteriormente y el producto enzimático se diluye con el tampón B, para dar una muestra preparada para cromatografía de exclusión por tamaño con una concentración de proteína de 5 mg/ml. Si el producto enzimático tiene una concentración de proteínas inferior a 5 mg/ml después de la diálisis, se usa tal cual.

5 [0124] Una columna HiLoad26/60 Superdex75pg de 300 ml (Amersham Pharmacia Biotech) se equilibra en el tampón B (flujo: 1 ml/min). Se aplica 1,0 ml de la muestra enzimática a la columna y la columna se eluye con el tampón B (flujo: 1 ml/min). Se recogen fracciones de 2,0 ml de la salida de la columna, hasta que la muestra ha eluido de la columna. Las fracciones recogidas se analizan para actividad lipolítica. Un valor máximo de proteína con actividad en uno o más de los ensayos descritos en este documento se define como un valor máximo de enzima lipolítica. La pureza de un valor máximo de enzima lipolítica se calcula como la cantidad de proteína en el valor máximo dividido entre la cantidad de proteína total en todos los valores máximos identificados. En una forma de realización particular la pureza se refiere a la cantidad de proteínas en el valor máximo dividido entre la cantidad de proteína total en todos los valores máximos de lipolíticos identificados.

15 LISTADO DE SECUENCIAS

[0125]

20 <110> Novozymes A/S

<120> Uso de enzimas lipolíticas para el control de impurezas adhesivas

<130> 10142

25 <160> 3

<170> Versión de PatentIn 3.1

30 <210> 1

<211> 194

<212> PRT

<213> Humicola insolens

35 <400> 1

Gln Leu Gly Ala Ile Glu Asn Gly Leu Glu Ser Gly Ser Ala Asn Ala
1 5 10 15

40 Cys Pro Asp Ala Ile Leu Ile Phe Ala Arg Gly Ser Thr Glu Pro Gly
20 25 30

45 Asn Met Gly Ile Thr Val Gly Pro Ala Leu Ala Asn Gly Leu Glu Ser
35 40 45

50 His Ile Arg Asn Ile Trp Ile Gln Gly Val Gly Gly Pro Tyr Asp Ala
50 55 60

55 Ala Leu Ala Thr Asn Phe Leu Pro Arg Gly Thr Ser Gln Ala Asn Ile
65 70 75 80

Asp Glu Gly Lys Arg Leu Phe Ala Leu Ala Asn Gln Lys Cys Pro Asn
85 90 95

60 Thr Pro Val Val Ala Gly Gly Tyr Ser Gln Gly Ala Ala Leu Ile Ala

ES 2 650 406 T3

100 105 110

5 Ala Ala Val Ser Glu Leu Ser Gly Ala Val Lys Glu Gln Val Lys Gly
115 120 125

10 Val Ala Leu Phe Gly Tyr Thr Gln Asn Leu Gln Asn Arg Gly Gly Ile
130 135 140

15 Pro Asn Tyr Pro Arg Glu Arg Thr Lys Val Phe Cys Asn Val Gly Asp
145 150 155 160

20 Ala Val Cys Thr Gly Thr Leu Ile Ile Thr Pro Ala His Leu Ser Tyr
165 170 175

25 Thr Ile Glu Ala Arg Gly Glu Ala Ala Arg Phe Leu Arg Asp Arg Ile
180 185 190

30 Arg Ala
<210> 2
<211> 199
<212> PRT
<213> Fusarium solani pisi

35 <400> 2

40 Gly Arg Thr Thr Arg Asp Asp Leu Ile Asn Gly Asn Ser Ala Ser Cys
1 5 10 15

45 Ala Asp Val Ile Phe Ile Tyr Ala Arg Gly Ser Thr Glu Thr Gly Asn
20 25 30

50 Leu Gly Thr Leu Gly Pro Ser Ile Ala Ser Asn Leu Glu Ser Ala Phe
35 40 45

55 Gly Lys Asp Gly Val Trp Ile Gln Gly Val Gly Gly Ala Tyr Arg Ala
50 55 60

65 Thr Leu Gly Asp Asn Ala Leu Pro Arg Gly Thr Ser Ser Ala Ala Ile
65 70 75 80

Arg Glu Met Leu Gly Leu Phe Gln Gln Ala Asn Thr Lys Cys Pro Asp
85 90 95

ES 2 650 406 T3

5 Ala Thr Leu Ile Ala Gly Gly Tyr Ser Gln Gly Ala Ala Leu Ala Ala
 100 105 110
 Ala Ser Ile Glu Asp Leu Asp Ser Ala Ile Arg Asp Lys Ile Ala Gly
 115 120 125
 10 Thr Val Leu Phe Gly Tyr Thr Lys Asn Leu Gln Asn Arg Gly Arg Ile
 130 135 140
 15 Pro Asn Tyr Pro Ala Asp Arg Thr Lys Val Phe Cys Asn Thr Gly Asp
 145 150 155 160
 20 Leu Val Cys Thr Gly Ser Leu Ile Val Ala Ala Pro His Leu Ala Tyr
 165 170 175
 25 Gly Pro Asp Ala Arg Gly Pro Ala Pro Glu Phe Leu Ile Glu Lys Val
 180 185 190
 30 Arg Ala Val Arg Gly Ser Ala
 195
 <210> 3
 <211> 317
 35 <212> PRT
 <213> Candida antarctica
 40 <400> 3
 45 Leu Pro Ser Gly Ser Asp Pro Ala Phe Ser Gln Pro Lys Ser Val Leu
 1 5 10 15
 Asp Ala Gly Leu Thr Cys Gln Gly Ala Ser Pro Ser Ser Val Ser Lys
 20 25 30
 50 Pro Ile Leu Leu Val Pro Gly Thr Gly Thr Thr Gly Pro Gln Ser Phe
 35 40 45
 55 Asp Ser Asn Trp Ile Pro Leu Ser Thr Gln Leu Gly Tyr Thr Pro Cys
 50 55 60
 Trp Ile Ser Pro Pro Pro Phe Met Leu Asn Asp Thr Gln Val Asn Thr

ES 2 650 406 T3

	65				70					75					80	
5	Glu	Tyr	Met	Val	Asn	Ala	Ile	Thr	Ala	Leu	Tyr	Ala	Gly	Ser	Gly	Asn
					85					90					95	
10	Asn	Lys	Leu	Pro	Val	Leu	Thr	Trp	Ser	Gln	Gly	Gly	Leu	Val	Ala	Gln
				100					105					110		
15	Trp	Gly	Leu	Thr	Phe	Phe	Pro	Ser	Ile	Arg	Ser	Lys	Val	Asp	Arg	Leu
			115					120					125			
20	Met	Ala	Phe	Ala	Pro	Asp	Tyr	Lys	Gly	Thr	Val	Leu	Ala	Gly	Pro	Leu
		130					135					140				
25	Asp	Ala	Leu	Ala	Val	Ser	Ala	Pro	Ser	Val	Trp	Gln	Gln	Thr	Thr	Gly
	145					150					155					160
30	Ser	Ala	Leu	Thr	Thr	Ala	Leu	Arg	Asn	Ala	Gly	Gly	Leu	Thr	Gln	Ile
					165					170					175	
35	Val	Pro	Thr	Thr	Asn	Leu	Tyr	Ser	Ala	Thr	Asp	Glu	Ile	Val	Gln	Pro
				180					185					190		
40	Gln	Val	Ser	Asn	Ser	Pro	Leu	Asp	Ser	Ser	Tyr	Leu	Phe	Asn	Gly	Lys
			195					200					205			
45	Asn	Val	Gln	Ala	Gln	Ala	Val	Cys	Gly	Pro	Leu	Phe	Val	Ile	Asp	His
		210					215					220				
50	Ala	Gly	Ser	Leu	Thr	Ser	Gln	Phe	Ser	Tyr	Val	Val	Gly	Arg	Ser	Ala
	225					230					235					240
55	Leu	Arg	Ser	Thr	Thr	Gly	Gln	Ala	Arg	Ser	Ala	Asp	Tyr	Gly	Ile	Thr
				245					250						255	
60	Asp	Cys	Asn	Pro	Leu	Pro	Ala	Asn	Asp	Leu	Thr	Pro	Glu	Gln	Lys	Val
				260					265					270		
65	Ala	Ala	Ala	Ala	Leu	Leu	Ala	Pro	Ala	Ala	Ala	Ala	Ile	Val	Ala	Gly
			275					280					285			

ES 2 650 406 T3

Pro Lys Gln Asn Cys Glu Pro Asp Leu Met Pro Tyr Ala Arg Pro Phe
290 295 300

5 Ala Val Gly Lys Arg Thr Cys Ser Gly Ile Val Thr Pro
305 310 315

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para fabricar papel que comprende: preparación de una pasta a partir de un material que comprende papel reciclado; tratamiento de la pasta con una enzima lipolítica, que es capaz de hidrolizar un polímero que comprende monómero de acetato de vinilo; y fabricación de papel a partir de la pasta tratada; donde la enzima se selecciona del grupo que consiste en lipasas y cutinasas y tiene una actividad hidrolítica mayor de 0,2 unidades/ml a 35°C durante 4 min con un 5 % (p/v) de preparación de polímero que comprende acetato de vinilo como sustrato en una emulsión consistente en 50 mM de NaCl, 0,5 mM de KH₂PO₄, 9 % (v/v) de glicerol y 0,1 % (p/v) de goma arábiga; donde una unidad de actividad hidrolítica se define como la liberación de 1 micromol de acetato medida con un pH-stat; donde 200 µl de la solución enzimática de A₂₈₀=0,15 se añaden a 15 ml de la emulsión de sustrato; y donde el polímero es una preparación de homopolímero de PVAc y el pH de reacción es 8, y la enzima está desalada.
- 10
- 15 2. Método según la reivindicación 1, donde la cutinasa se deriva de una cepa de *Humicola insolens*.
3. Método de cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde las condiciones son adecuadas para el control de impurezas adhesivas y/o para el destintado.
- 20 4. Método de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde la dosificación enzimática por tonelada de pasta de papel es de aproximadamente 100 a aproximadamente 100.000 unidades según la reivindicación 1.
5. Método de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde la dosificación enzimática por tonelada de pasta de papel es de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 100.000 mg de proteína enzimática.
- 25 6. Método de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde la enzima está activa y es estable en presencia de LAS y/o peróxido de hidrógeno.
- 30 7. Método de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que comprende además el uso de al menos una enzima adicional seleccionada del grupo siguiente de enzimas: proteasas, amilasas, pululanastas, lipasas, hemicelulasas, endoglucanasas, pectinasas y cutinasas.
- 35 8. Método de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, que comprende además el uso de al menos un surfactante o dispersante aniónico, no iónico, catiónico y/o zwitteriónico.

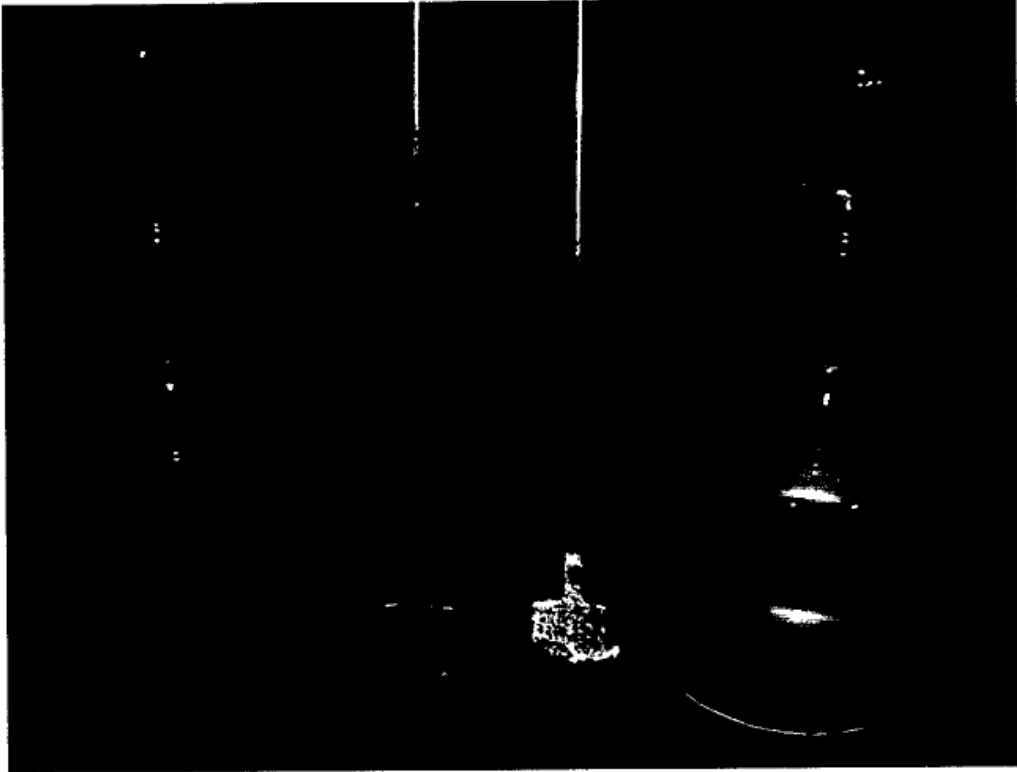


Fig. 1