



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 265 960**

51 Int. Cl.:

**C12N 9/42** (2006.01)

**C12N 9/42** (2006.01)

**C12R 1/645** (2006.01)

**C11D 3/386** (2006.01)

**D06M 16/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **00952955 .3**

86 Fecha de presentación : **11.08.2000**

87 Número de publicación de la solicitud: **1210414**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **05.06.2002**

54 Título: **Xiloglucanasa alcalina proveniente de *Malbranchea*.**

30 Prioridad: **13.08.1999 DK 1999 01121**  
**17.08.1999 US 149397 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.03.2007**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.03.2007**

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

72 Inventor/es: **Wu, Wenping;**  
**Schülein, Martin;**  
**Kauppinen, Markus, Sakari y**  
**Stringer, Mary, Ann**

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

ES 2 265 960 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

Xiloglucanasa alcalina proveniente de *Malbranchea*.

5 La presente invención se refiere a enzimas de xiloglucanasa que son endógenas a una cepa de *Malbranchea*, especialmente a enzimas que muestran actividad xiloglucanasa en la gama de pH 4-11; a un método para producir tales enzimas; y al uso de tales enzimas en la industria textil, de detergentes y del tratamiento de fibras celulósicas.

**Antecedentes de la invención**

10 El xiloglucano es un polisacárido estructural importante en la pared celular primaria (en crecimiento) de las plantas. Estructuralmente, los xiloglucanos consisten en una estructura de glucosa con enlaces beta-1,4 tipo celulosa que es frecuentemente sustituida con varias cadenas secundarias. Los xiloglucanos de la mayoría de las plantas dicotiledóneas, algunos monocotiledones y gimnospermas son polisacáridos altamente ramificados en los que aprox. el 75%  
15 de los residuos de glucosa en la estructura soportan una cadena lateral de glicosilo en O-6. El residuo de glicosilo que es directamente fijado al residuo de glucosa ramificado es invariablemente alfa-D-xilosa. Hasta el 50% de las cadenas secundarias en los xiloglucanos contienen más de un residuo debido a la presencia de fracciones de beta-D-galactosa o alfa-L-fucosa-(1-2)-beta-D-galactosa en O-2 de los residuos de xilosa (C. Ohsumi y T. Hayashi (1994) *Plant and Cell Physiology* 35:963-967; G. J. McDougall y S. C. Fry (1994) *Journal of Plant Physiology* 143:591-595; J. L. Acebes  
20 *et al.* (1993) *Phytochemistry* 33:1343-1345). En la hidrólisis ácida, el xiloglucano extraído de las fibras de algodón produjo glucosa, xilosa, galactosa y fucosa en la proporción de 50:29:12:7 (Hayashi *et al.*, 1988).

25 Los xiloglucanos producidos por plantas solanáceas son inusuales por el hecho de que típicamente sólo el 40% de los residuos de glucosa con enlaces beta-1,4 soportan una cadena lateral de glicosilo en O-6. Además, hasta el 60% de los residuos de xilosa están sustituidos en O-2 con residuos de alfa-L-arabinosa y algunas plantas solanáceas, tales como la patata, también tienen xiloglucanos con sustituyentes de beta-D-galactosa en O-2 de algunos de los residuos de xilosa (York *et al.* (1996)).

30 Se cree que el xiloglucano funciona en la pared primaria de las plantas entrecruzando microfibrillas de celulosa, formando una red de celulosa- xiloglucano. Esta red está considerada necesaria para la integridad estructural de las paredes celulares primarias (Carpita *et al.*, 1993). Otra función importante del xiloglucano es actuar como repositorio para los oligosacáridos de la subunidad de xiloglucano que son reguladores fisiológicamente activos del crecimiento celular vegetal. Las subunidades del xiloglucano pueden también modular la acción de una xiloglucano endotransglucosilasa (XET), una enzima asociada a la pared celular que se ha supuesto que juega un papel en el alargamiento de  
35 las paredes celulares vegetales. En consecuencia el xiloglucano puede jugar un papel importante en el ablandamiento de la pared y consecuentemente en la expansión celular (Fry *et al.*, 1992).

40 Las semillas de muchas especies de dicotiledóneas contienen xiloglucano como la reserva de almacenamiento de polisacáridos más importante. Este tipo de xiloglucano, que está localizado en espesamientos masivos en el interior de la pared celular del cotiledón de las semillas, está compuesto principalmente por glucosa, xilosa y galactosa (Rose *et al.*, 1996).

45 Las semillas del árbol tamarindo *Tamarindus indica* se volvieron una fuente comercial de goma en 1943 cuando la goma fue encontrada útil para el encolado del papel y textil. El encolado del yute y el algodón con el xiloglucano del tamarindo ha sido muy practicado en Asia debido al bajo coste de la goma y por sus excelentes propiedades. Las aplicaciones en alimentos del xiloglucano del tamarindo incluyen el uso en dulces, mermeladas y gelatinas y como estabilizador en los helados y la mayonesa (Whistler *et al.*, 1993).

50 La actividad xiloglucanasa no está incluida en la clasificación de enzimas proporcionadas por la Nomenclatura Enzimática (1992). Hasta ahora, esta actividad enzimática ha sido simplemente clasificada como actividad glucanasa y a menudo se ha creído que es idéntica a la actividad celulolítica (EC 3.2.1.4), es decir la actividad contra enlaces  $\beta$ -1,4-glicosídicos en la celulosa o sustratos derivados de la celulosa, o al menos que es una actividad secundaria en enzimas que tienen actividad celulolítica. No obstante, una xiloglucanasa pura es una enzima pura específica del xiloglucano capaz de catalizar la solubilización del xiloglucano en los oligosacáridos del xiloglucano aunque sin  
55 mostrar actividad celulolítica sustancial, p. ej. actividad contra los sustratos de CMC (carboximetilcelulosa) del tipo celulosa usados de forma convencional, celulosa HE y Avicel (celulosa microcristalina). Una xiloglucanasa secciona los enlaces beta-1,4-glicosídicos en la estructura del xiloglucano.

60 La actividad de la xiloglucanasa está descrita por Vincken *et al.* (1997) quien caracteriza tres endoglucanasas diferentes de *Trichoderma viride* (similar al *T. reesei*) teniendo todas gran actividad contra la celulosa o la CMC y mostrando que el Endol (que de hecho pertenece a la familia 5 de las glicosil hidrolasas, véase Henrissat, B. *et al.* (1993)) no tiene esencialmente ninguna (es decir poca) actividad contra el xiloglucano, y que el EndoV (de la familia 7 de las glicosil hidrolasas) y EndoIV (de la familia 12 de las glicosil hidrolasas) tienen ambos actividad contra el xiloglucano y la CMC, respectivamente, del mismo orden de magnitud.

65 La publicación de patente internacional WO 94/14953 expone una xiloglucanasa (EG II) donada del hongo *Aspergillus aculeatus*.

La publicación de patente internacional WO 98/38288 expone secuencias de aminoácidos de xiloglucanasas de *Tiarosporella phaseolina* y *Dichotomocladium hesseltinei*, respectivamente.

La publicación de patente internacional WO 98/50513 expone composiciones para lavandería y limpieza que contienen enzimas de xiloglucanasa.

La publicación de patente internacional WO 99/02663 expone xiloglucanasas donadas de *Bacillus Licheniformis* y *Bacillus agaradhaerens*.

Puesto que muchos procesos importantes, tanto los procesos industriales como los procesos domésticos que usan agentes producidos industrialmente, están funcionando a un pH alto en la gama alcalina. En consecuencia, hay una necesidad de una enzima xiloglucanasa pura con alta actividad xiloglucanasa a un pH alcalino.

### Resumen de la invención

Los inventores han encontrado ahora que las enzimas que tienen actividad xiloglucanasa sustancial con un pH alto en la gama alcalina son obtenidas a partir de o son endógenas a una cepa perteneciente al género fúngico *Malbranchea*.

En consecuencia, la presente invención se refiere a una enzima aislada o a una enzima xiloglucanasa purificada obtenida a partir de una cepa del género *Malbranchea*, preferiblemente a una cepa de unas especies seleccionadas del grupo que se compone de *Malbranchea cinnamomea* (y los tres sinónimos *Malbranchea sulfurea*, *Malbranchea pulchella* var. *sulfurea* y *Thermoidium sulfureum*), *Malbranchea graminicola*, *Malbranchea pulchella*, *Malbranchea filamentosa*, *Malbranchea gipsea*, *Malbranchea albolutea*, *Malbranchea arcuata*, *Malbranchea aurantiaca*, *Malbranchea bolognesiichurcoi*, *Malbranchea chrisosporioidea*, *Malbranchea circinata*, *Malbranchea flava*, *Malbranchea flavorosea*, *Malbranchea flocciformis*, *Malbranchea fuva*, *Malbranchea kambaiashii*, *Malbranchea multicolor*, *Malbranchea sclerotica*, *Malbranchea setosa* y *Malbranchea dendritica*, enzima que muestra actividad xiloglucanasa y ninguna actividad en la celulosa o en los sustratos derivados de la celulosa. En una forma de realización preferida de la invención, la xiloglucanasa tiene un peso molecular aparente de  $25 \pm 10$  kDa, un pl entre 3 y 5 y muestra actividad xiloglucanasa en la gama de pH 4-11, medido a 50°C.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una xiloglucanasa donada de una cepa de *Malbranchea*, es decir una xiloglucanasa seleccionada de uno entre (a) un polipéptido que comprende un fragmento codificado por la secuencia de ADN de las posiciones 141-806 de SEC ID NO:1; (b) un polipéptido producido cultivando una célula que comprende la secuencia de SEC ID NO:1 bajo unas condiciones en las que la secuencia de ADN está expresada; y (c) una enzima xiloglucanasa que tiene una secuencia con al menos el 80% de identidad a las posiciones 1-222 de SEC ID NO:1 cuando la identidad está determinada por GAP proporcionado en el paquete del programa GCG versión 10.0 que usa una penalización de creación de huecos de 8 y una penalización de extensión de huecos de 2.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un polipéptido aislado o purificado que tiene actividad xiloglucanasa que es obtenida a partir de una cepa del género *Malbranchea* y tiene

- i) actividad xiloglucanasa en la gama de pH 4-11, medida a 50°C;
- ii) una masa molecular de  $25 \pm 10$  kDa, según está determinado por SDS-PAGE;
- iii) un punto isoeléctrico (pl) en la gama 3-5; y/o
- iv) la secuencia N-terminal Ala-Asp-Phe-Cys-Gly-Gln-Trp-Asp-Ser-Glu-Gln-Ser- Gly-pro-Tyr-Ile-Val-Tyr-Asn-Asn-Leu.

La invención además proporciona una enzima xiloglucanasa aislada que está (i) libre de impurezas homólogas, y (ii) producida cultivando una célula que comprende la secuencia de ADN de las posiciones 141-806 de la SEC ID NO:1.

La enzima nueva de la presente invención es útil para el tratamiento de material celulósico, especialmente de fibras conteniendo celulosa, hilo, tejido tejido o no tejido. El tratamiento puede llevarse a cabo durante el tratamiento de material celulósico en un material preparado para la producción de prendas o para la producción de tejidos, p. ej. en la fase de descolado o de decapado; o durante la lavandería industrial o doméstica de tales tejidos o prendas.

En consecuencia, en otros aspectos la presente invención se refiere a una composición de detergente que comprende una xiloglucanasa que es endógena a una cepa del género fúngico *Malbranchea*, en particular perteneciente a las especies fúngicas *Malbranchea cinnomomea*, y muestra actividad sustancial en la gama de pH alcalino; y para el uso de la enzima de la invención para el tratamiento de fibras conteniendo celulosa, hilo, tejido tejido o no tejido.

La presente invención ha hecho posible ahora usar un proceso de decapado enzimático puro en la preparación de material celulósico p. ej. para una respuesta apropiada en operaciones de coloración posteriores. Además, está contemplado que las composiciones de detergentes que comprenden la enzima nueva son capaces de eliminar o blanquear ciertas manchas o tachones presentes en lavandería, especialmente manchas y salpicaduras que resultan de alimentos,

plantas, y similares, conteniendo xiloglucano. Se contempla igualmente que el tratamiento con composiciones de detergentes que comprenden la enzima nueva pueden evitar la unión de ciertas manchas al xiloglucano que ha quedado en el material celulósico.

## 5 Los dibujos

En los dibujos anexos,

Figura 1 muestra la construcción de pCaHj 527;

Figura 2 muestra la actividad xiloglucanasa y CMC-asa relativa a 595 nm de las fracciones de la cepa UAMH2485;

Figura 3 muestra la actividad xiloglucanasa y CMC-asa relativa a 595 nm de las fracciones de la cepa CBS 343.55;

Figura 4 muestra la actividad xiloglucanasa y CMC-asa relativa a 595 nm de las fracciones de la cepa CBS 960.72.

## Descripción detallada de la invención

Las celulasas se encuentran en más de 10 familias diferentes de glicosil hidrolasas. Algunas celulasas también muestran actividad xiloglucanasa. Hoy, tales celulasas han sido encontradas entre las clasificadas en las familias 5, 7 y 12. La especificidad del sustrato, no obstante, no está directamente correlacionada con la familia: dentro de una familia la actividad enzimática principal puede ser celulasa o mananasa (familia 5), o liquenasa,  $\beta$ -1,3-glucanasa o actividad xiloglucantransferasa (familia 16). Sólo muy pocas enzimas están hasta ahora descritas como teniendo actividad contra el xiloglucano como la actividad enzimática más importante o principal. Como se ha mencionado anteriormente, esta actividad todavía no tiene una introducción en la Nomenclatura Enzimática oficial.

En este contexto, el término “preparación enzimática” pretende significar bien un producto de fermentación enzimática convencional, posiblemente aislado y purificado, de unas especies únicas de un microorganismo, tal preparación normalmente comprendiendo varias actividades enzimáticas diferentes; o una mezcla de enzimas monocomponentes, preferiblemente enzimas derivadas de especies bacterianas o fúngicas usando técnicas recombinantes convencionales, enzimas que han sido fermentadas y posiblemente aisladas y purificadas separadamente y que pueden originarse a partir de distintas especies, preferiblemente especies fúngicas o bacterianas; o el producto de fermentación de un microorganismo que actúa como una célula huésped para la expresión de una xiloglucanasa recombinante, pero este microorganismo simultáneamente produce otras enzimas, p. ej. xiloglucanasas, proteasas, o celulasas, siendo productos de fermentación de origen natural del microorganismo, es decir el complejo enzimático producido de forma convencional por el microorganismo de origen natural correspondiente.

En una forma de realización preferida, la xiloglucanasa de la invención tiene una actividad relativa a pH 9.5 de al menos el 50%, preferiblemente al menos el 55%, más preferiblemente al menos el 60%, especialmente al menos el 65%, en particular al menos el 70%, en comparación con la actividad al pH óptimo.

En otra forma de realización preferida, la xiloglucanasa de la invención tiene una actividad relativa a pH 10 de al menos el 40%, preferiblemente al menos el 50%, más preferiblemente al menos el 55%, especialmente al menos el 60%, en comparación con la actividad en el pH óptimo.

En otra forma de realización preferida la xiloglucanasa de la invención está activa a una temperatura entre 20°C y 70°C. Preferiblemente, la xiloglucanasa tiene una actividad relativa en la gama de temperatura de 40-60°C de al menos el 40%, más preferiblemente de al menos el 50%, especialmente al menos el 55%, en particular al menos el 60%, en comparación con la actividad a la temperatura óptima.

La xiloglucanasa de la presente invención no muestra ninguna actividad en la celulosa o en los sustratos derivados de celulosa. Un sustrato convencional para determinar la actividad celulasa (actividad endo- $\beta$ -1,4-glucanasa, jf. EC 3.2.1.4) es la carboximetilcelulosa (CMC). Otro sustrato convencional para determinar la actividad celulasa o celobiohidrolasa (EC 3.2.1.91) es Avicel que es una celulosa microcristalina bien conocida por el experto en la materia.

La presente invención también se refiere a una preparación enzimática que comprende la xiloglucanasa descrita en la presente, opcionalmente además comprende una o más enzimas seleccionadas del grupo que se compone de proteasas, celulasas (endo- $\beta$ -1,4-glucanasas),  $\beta$ -glucanasas (endo- $\beta$ -1,3(4)glucanasas), lipasas, cutinasas, peroxidadas, lacasas, amilasas, glucoamilasas, pectinasas, reductasas, oxidasas, fenoloxidasas, ligninasas, pululanasas, arabinanasas, hemicelulasas, mananasas, galactanasas, xilanasas, pectina acetil esterasas, ramnogalacturonano acetil esterasas, poligalacturonasas, ramnogalacturonasas, pectina liasas, pectato liasas, pectina metil-esterasas, celobiohidrolasas, transglutaminasas; o mezclas derivadas. En una forma de realización preferida, una o más o todas las enzimas de la preparación es/son producida(s) usando técnicas recombinantes, es decir la(s) enzima(s) es/son enzima(s) monocomponente(s) que es/son mezcladas con la(s) otra(s) enzima(s) para formar una preparación enzimática con la mezcla enzimática deseada.

En otro aspecto, la presente invención también se refiere a un método para producir la xiloglucanasa o para preparar la xiloglucanasa de la invención, el método comprendiendo el cultivo de un microorganismo, por ejemplo una cepa del género fúngico *Malbranchea*, preferiblemente una cepa de las especies *Malbranchea cinnamomea* (y los tres sinónimos *Malbranchea sulfurea*, *Malbranchea pulchella* var. *sulfurea* y *Thermoidium sulfureum*), *Malbranchea graminicola*, *Malbranchea pulchella*, *Malbranchea filamentosa*, *Malbranchea gypsea*, *Malbranchea albolutea*, *Malbranchea arcuata*, *Malbranchea aurantiaca*, *Malbranchea bolognesii-chiurcoi*, *Malbranchea chrysosporioidea*, *Malbranchea circinata*, *Malbranchea flava*, *Malbranchea flavorosea*, *Malbranchea flocciformis*, *Malbranchea fuva*, *Malbranchea kambayashii*, *Malbranchea multicolor*, *Malbranchea sclerotica*, *Malbranchea setosa* y *Malbranchea dendritica*, por ejemplo una cepa seleccionada del grupo que se compone de *Malbranchea cinnamomea*, CBS 115.68, MUCL 11291, CBS 343.55, MUCL 9500, UAMH 3827, CBS 423.54, CBS 960.72 y UAMH 2485, microorganismo que es capaz de producir la xiloglucanasa bajo condiciones que permiten la producción de la enzima, y la recuperación de la enzima del cultivo. El cultivo puede ser realizado usando técnicas de fermentación convencionales p. ej. el cultivo en frascos de agitación o en fermentadores con agitación para asegurar una aireación suficiente en un medio de crecimiento que induce la producción de la enzima xiloglucanasa. El medio de crecimiento puede contener una N-fuente convencional tal como peptona, extracto de levadura o ácidos de casamino, una cantidad reducida de una C-fuente convencional tal como la dextrosa o la sacarosa, y un inductor tal como el xiloglucano o sustratos vegetales del compuesto tales como salvados de cereales (p. ej. salvado de trigo o cáscara de arroz). La recuperación puede ser realizada usando técnicas convencionales, p. ej. separación de la biomasa y el sobrenadante por centrifugado o filtración, recuperación del sobrenadante o interrupción de células si la enzima de interés es intracelular, posiblemente seguido de posterior purificación como se describe en EP 0 406 314 o por cristalización como se describe en WO 97/15660.

En el presente contexto el término “vector de expresión” se refiere a una molécula de ADN, lineal o circular, que comprende un segmento que codifica un polipéptido de interés operativamente enlazado a segmentos adicionales que proporcionan su transcripción. Tales segmentos adicionales pueden incluir secuencias del promotor y terminador, y pueden opcionalmente incluir uno o más orígenes de replicación, uno o más marcadores seleccionables, un intensificador, una señal de poliadenilación, y similares. Los vectores de expresión son generalmente derivados de ADN plásmido o vírico, o pueden contener elementos de ambos. El vector de expresión de la invención puede ser cualquier vector de expresión que esté convenientemente sometido a procedimientos de ADN recombinante, y la elección del vector a menudo dependerá de la célula huésped en que el vector deba ser introducido. Así, el vector puede ser un vector de replicación autónoma, es decir un vector que existe como una entidad extracromosómica, cuya replicación es independiente de la replicación cromosómica, p. ej. un plásmido. De forma alternativa, el vector puede ser uno que, cuando se introduce en una célula huésped, se integra en el genoma de la célula huésped y se replica con el(los) cromosoma(s) en el que se haya integrado.

Los términos “recombinante expresado” o “recombinantemente expresado” usados en la presente en relación con la expresión de un polipéptido o proteína se define según la definición estándar en la técnica. La expresión recombinantemente de una proteína es generalmente realizada usando un vector de expresión como se describe justo arriba.

El término “aislado”, cuando se aplica a una molécula de polinucleótido, se refiere a que el polinucleótido ha sido extraído de su entorno genético natural y por lo tanto está libre de otras secuencias de codificación extrañas o indeseadas, y está en una forma adecuada para el uso dentro de sistemas de producción de proteínas creados genéticamente. Tales moléculas aisladas son las que están separadas de su medio ambiente natural e incluyen ADNc y clones genómicos. Las moléculas de ADN aisladas de la presente invención están libres de otros genes con los cuales éstas son comúnmente asociadas, pero pueden incluir regiones no traducidas 5' y 3' de origen natural como promotores y terminadores. La identificación de regiones asociadas será evidente para un experto en la técnica (véase por ejemplo, Dynan y Tijan, Nature 316:774-78; 1985). El término “un polinucleótido aislado” puede de forma alternativa ser denominado “un polinucleótido clonado”.

Cuando se aplica a una proteína/polipéptido, el término “aislado” indica que la proteína se encuentra en una condición distinta de su entorno natural. En una forma preferida, la proteína aislada está sustancialmente libre de otras proteínas, particularmente otras proteínas homólogas (es decir “impurezas homólogas” (ver abajo)). Se prefiere proporcionar la proteína en una forma superior al 40% de pureza, más preferiblemente en una forma superior al 60% de pureza.

Incluso más preferiblemente se prefiere proporcionar la proteína en una forma altamente purificada, es decir, superior al 80% de pureza, más preferiblemente superior al 95% de pureza, e incluso más preferiblemente superior al 99% de pureza, según está determinado por SDS-PAGE.

Los términos “proteína/polipéptido aislado” pueden de forma alternativa ser denominados “proteína/polipéptido purificado”.

Los términos “impurezas homólogas” significan cualquier impureza (p. ej. otro polipéptido distinto al polipéptido de la invención) que se origine de la célula homóloga a partir de la cual se obtiene originalmente el polipéptido de la invención.

Los términos “obtenido a partir de” según se utilizan en este caso en relación con una fuente microbiana específica, significan el polinucleótido y/o polipéptido producido por la fuente específica, o por una célula en la que un gen de la fuente ha sido insertado.

## ES 2 265 960 T3

Los términos “operativamente enlazado”, cuando se refiere a segmentos de ADN, significan que los segmentos están dispuestos de modo que funcionen en concierto para sus objetivos previstos, p. ej. la transcripción se inicia en el promotor y transcurre a través del segmento de codificación hasta el terminador.

5 El término “polinucleótido” significa un polímero mono o bicatenario de bases desoxirribonucleótidas o ribonucleótidas leídas desde el extremo 5' al 3'. Los polinucleótidos incluyen ARN y ADN, y pueden ser aislados de fuentes naturales, sintetizadas *in vitro*, u obtenidas a partir de una combinación de moléculas naturales y sintéticas.

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

15 Los términos “secuencia de nucleótidos degenerada” se refieren a una secuencia de nucleótidos que incluye uno o más codones degenerados (en comparación con una molécula de polinucleótidos de referencia que codifica un polipéptido). Los codones degenerados contienen tripletes diferentes de nucleótidos, pero codifican el mismo residuo aminoácido (es decir, los tripletes GAU y GAC cada uno de ellos codifica Asp).

20 El término “promotor” se refiere a una parte de un gen que contiene secuencias de ADN que proveen la unión de la ARN-polimerasa y la iniciación de la transcripción. Las secuencias del promotor se encuentran de forma común, pero no siempre, en las regiones no codificantes 5' de los genes.

25 El término “secuencia señal secretora” se refiere a una secuencia de ADN que codifica un polipéptido (un “péptido secretor”) que, como componente de un polipéptido más grande, dirige el polipéptido más grande a través de un vehículo secretor de una célula donde es sintetizado. El péptido más grande es seccionado de forma común para eliminar el péptido secretor durante el tránsito a través del vehículo secretor.

### *Polinucleótidos*

30 Dentro de las formas de realización preferidas de la invención, un polinucleótido aislado de la invención hibridará a regiones con dimensiones similares a la SEC ID NO:1 o una secuencia complementaria a ésta, bajo al menos condiciones de astringencia media.

35 En particular los polinucleótidos de la invención hibridarán una sonda de ADN bicatenario desnaturalizada que comprende sea la secuencia completa mostrada en la SEC ID NO:1 o la secuencia mostrada en las posiciones 141-806 de la SEC ID NO:1 o cualquier sonda que comprende una subsecuencia de la SEC ID NO:1 que tiene una longitud de al menos aproximadamente 100 pares de bases bajo al menos condiciones de astringencia media, pero preferiblemente en condiciones de astringencia altas como se describe con detalle más abajo. Las condiciones experimentales adecuadas para determinar la hibridación a astringencia media o alta entre una sonda de nucleótidos y una secuencia homóloga de ADN o ARN implica el prerremojado del filtro que contiene los fragmentos de ADN o ARN para hibridizar en 5 X SSC (Sodium chloride/Sodium citrate, Sambrook *et al.* 1989) durante 10 min, y la prehibridación del filtro en una solución de 5 X SSC, 5 X Solución de Denhardt (Sambrook *et al.* 1989), 0.5% de SDS y 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado y sometido a un baño de ultrasonidos (Sambrook *et al.* 1989), seguido de la hibridación en la misma solución que contiene una concentración de 10 ng/ml de una sonda cebada aleatoriamente (Feinberg, A. P. y Vogelstein, B. (1983) Anal. Chem. 132:6-13), marcada en 32P-DCTP- (actividad específica superior a 1 X 10<sup>9</sup> cpm/µg) durante 12 horas a aprox. 45°C. El filtro es luego lavado dos veces durante 30 minutos en 2 X SSC, 0.5% de SDS al menos 60°C (astringencia media), además más preferiblemente al menos 65°C (astringencia media/alta), incluso más preferiblemente al menos 70°C (astringencia alta), e incluso más preferiblemente al menos 75°C (astringencia muy alta).

50 Las moléculas que la sonda de oligonucleótidos hibrida bajo estas condiciones son detectadas usando una película radiográfica.

55 Como se ha destacado previamente, tales polinucleótidos aislados incluyen ADN y ARN. Los métodos para aislar ADN y ARN son bien conocidos en la técnica. Los genes que codifican ADN y ARN de interés pueden ser clonados en bancos genéticos o genotecas de ADN mediante unos métodos conocidos en la técnica.

Los polipéptidos que codifican polinucleótidos que tienen actividad xiloglucanasa son luego identificados y aislados, por ejemplo, por hibridación o por PCR.

60 Además, se contempla que se pueden proporcionar polipéptidos de la contrapartida y polinucleótidos de distintas cepas fúngicas (ortólogas o parálogas).

65 Especies homólogas de un polipéptido con actividad xiloglucanasa pueden ser clonadas usando información y composiciones proporcionadas de la clonación de la xiloglucanasa de *Malbranchea* de la presente invención en combinación con técnicas de clonación convencionales. Por ejemplo, una secuencia de ADN puede ser clonada usando ADN cromosómico obtenido de un tipo de célula que expresa la proteína. Las fuentes adecuadas de ADN pueden ser identificadas por el análisis de Northern con sondas diseñadas a partir de ADN de xiloglucanasa de *Malbranchea* y secuencias polipeptídicas cuando están disponibles. Una genoteca se obtiene a partir de ADN cromosómico de una

## ES 2 265 960 T3

línea celular positiva. Una secuencia de ADN que codifica un polipéptido que tiene actividad xiloglucanasa puede después ser aislado por una variedad de métodos, tales como la evaluación con sondas diseñadas a partir de las secuencias anteriormente mencionadas o con uno o más conjuntos de sondas degeneradas basadas en estas secuencias. Una secuencia de ADN puede también ser donada usando la reacción en cadena de la polimerasa, o PCR (Mullis, Patente U.S. 4.683.202), usando cebadores diseñados a partir de las secuencias anteriormente mencionadas. Dentro de un método adicional, la genoteca de ADN puede utilizarse para transformar o transfectar células huéspedes, y la expresión del ADN de interés puede ser detectada con un anticuerpo (monoclonal o policlonal) aumentado contra una xiloglucanasa donada de *Malbranchea cinnamomea*, CBS 115.68, MUCL 11291, CBS 343.55, MUCL 9500, UAMH 3827, CBS 423.54, CBS 960.72 o UAMH 2485, expresada y purificada, o por una prueba de actividad con respecto a un polipéptido que tiene actividad xiloglucanasa.

### *Polipéptidos*

La secuencia de aminoácidos nos. 29-250 de la SEC ID NO: 2 está considerada como una xiloglucanasa madura, la secuencia N-terminal comienza en la posición 29 de la SEC ID NO:2.

La presente invención también proporciona polipéptidos de xiloglucanasa que son sustancialmente homólogos al polipéptido de los aminoácidos nos. 1-250 o 29-250 de la SEC ID NO:2 y los homólogos (parálogos o ortólogos) de especies derivadas. El término "sustancialmente homólogo" se utiliza en este caso para indicar polipéptidos que tienen un 70%, preferiblemente al menos un 75%, más preferiblemente al menos un 80%, más preferiblemente al menos un 85%, e incluso más preferiblemente al menos un 90%, de identidad de la secuencia con la secuencia mostrada en los aminoácidos nos. 1-250 o 29-250 de la SEC ID NO:2 o sus ortólogos o parálogos. Tales polipéptidos más preferiblemente serán al menos un 95% idénticos, y más preferiblemente un 98% o más idénticos a la secuencia mostrada en los aminoácidos nos. 1-250 o 29-250 de la SEC ID NO:2 o sus ortólogos o parálogos.

El porcentaje de identidad de la secuencia está determinado por métodos convencionales, mediante programas informáticos conocidos en la técnica tales como GAP proporcionado en el paquete de programa GCG (Program Manual for the Wisconsin Package, Version 10.0, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711). GAP se usa con los ajustes siguientes para la comparación de la secuencia polipeptídica: penalización de creación de huecos de 8 y penalización de extensión de huecos de 2.

La secuencia de aminoácidos deducida del precursor de xiloglucanasa de la familia 12 codificada por XYG1011 de *Malbranchea cinnamomea* (SEC ID NO:2) muestra una similitud de la secuencia del 49.1-66.2%, y un 43.9-61.2% de identidad de la secuencia a una selección de 7 enzimas de la familia fúngica 12. Las secuencias fueron alineadas usando el programa GAP del paquete de software GCG Wisconsin, versión 10.0 Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wisconsin; con una penalización de creación de huecos de 8, y una penalización de extensión de huecos de 2:

	<i>Malbranchea cinnamomea</i>
40	<i>Tiasporella phaseolina</i> , w68593
	66.2% similitud 61.2% identidad
45	<i>Aspergillus aculeatus</i> , 094218
	65.4% similitud 58.7% identidad
50	<i>Emericella desertoru</i> , y06366
	57.3% similitud 52.4% identidad
55	<i>Gliocladium roseum</i> , y06362
	58.9% similitud 54.5% identidad
60	<i>Fusarium javanicum</i> , y06359
	61.7% similitud 55.0% identidad
65	<i>Myceliophthora thermophila</i> , w23540
	50.0% similitud 46.7% identidad
	<i>Trichoderma reesei</i> , y06330
	49.1% similitud 43.9% identidad

Las proteínas sustancialmente homólogas y los polipéptidos están caracterizados por tener una o más sustituciones, eliminaciones o adiciones de aminoácidos. Estos cambios son preferiblemente de una naturaleza menor, es decir sustituciones de aminoácidos conservadoras (véase Tabla 2) y otras sustituciones que no afectan significativamente al

## ES 2 265 960 T3

pliegue o actividad de la proteína o polipéptido; pequeñas eliminaciones, normalmente de uno a aproximadamente 30 aminoácidos; y pequeñas extensiones amino o carboxilo-terminales, así como un residuo de metionina aminoterminal, un péptido de enlace pequeño de hasta aproximadamente 20-25 residuos, o una extensión pequeña que facilita la purificación (una marca de afinidad), tal como un tracto de polihistidina, proteína A (Nilsson *et al.*, *EMBO J.* 4:1075;1985; Nilsson *et al.*, *Methods Enzymol.* 198:3, 1991. Véase en general Ford *et al.*, *Protein Expression and Purification* 2: 95-107, 1991, que se incorpora en la presente por referencia. Los ADNs que codifican las etiquetas de afinidad están disponibles por proveedores comerciales (p. ej., Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ; New England Biolabs, Beverly, MA).

No obstante, aunque los cambios anteriormente descritos preferiblemente son de una naturaleza menor, tales cambios pueden también ser de una naturaleza mayor tal como la fusión de polipéptidos más grandes de hasta 300 aminoácidos o más tanto con extensiones amino- como carboxilo- terminales a un polipéptido de la invención con actividad xiloglucanasa.

TABLA 1

*Sustituciones de aminoácidos conservadoras*

20	Básico:	Arginina lisina histidina
25	Acídico:	Ácido glutámico ácido aspártico
	Polar:	Glutamina asparraguina
30	Hidrofóbico:	Leucina isoleucina valina
	Aromático:	Fenilalanina triptófano tirosina
35	Pequeño:	Glicina alanina serina treonina metionina
40		

Además de los 20 aminoácidos estándares, los aminoácidos estándares (tales como 4-hidroxiprolina, 6-N-metil lisina, ácido 2-aminoisobutírico, isovalina y uan-metil serina) pueden ser sustituidos por residuos de aminoácidos de un polipéptido según la invención. Un número limitado de aminoácidos no conservadores, aminoácidos que no están codificados por el código genético, y aminoácidos no naturales puede ser sustituido por residuos de aminoácidos. Los "aminoácidos no naturales" han sido modificados después de la síntesis proteínica, y/o tienen una estructura química en su(s) cadena(s) lateral(es) diferente de los aminoácidos estándares. Los aminoácidos no naturales pueden ser químicamente sintetizados, o preferiblemente, están comercialmente disponibles, e incluyen ácido pipercolico, tiazolidina ácido carboxílico, deshidroprolina, 3- y 4-metilprolina, y 3,3-dimetilprolina.

Los aminoácidos esenciales en los polipéptidos de xiloglucanasa de la presente invención pueden ser identificados según procedimientos conocidos en la técnica, tales como mutagénesis sitio dirigida o mutagénesis de barrido de alanina (Cunningham and Wells, *Science* 244: 1081-1085, 1989). En esta técnica, las únicas mutaciones de alanina son introducidas en cada residuo en la molécula, y las moléculas mutantes resultantes son evaluadas por su 0 actividad biológica (es decir actividad xiloglucanasa) para identificar residuos de aminoácidos que son fundamentales para la actividad de la molécula. Véase también, Hilton *et al.*, *J. Biol. Chem.* 271:4699-4708, 1996. El centro activo de la enzima u otra interacción biológica puede también ser determinado por análisis físico de la estructura, según está determinado por técnicas tales como resonancia magnética nuclear, cristalografía, difracción electrónica o marcado por fotoafinidad, junto con la mutación de aminoácidos con sitio de contacto putativo. Véase, por ejemplo, de Vos *et al.*, *Science* 255:306-312, 1992; Smith *et al.*, *J. Mol. Biol.* 224:899-904, 1992; Wlodaver *et al.*, *FEBS Lett.* 309:59-64, 1992. Las identidades de los aminoácidos esenciales pueden también ser deducidas por análisis de homologías con polipéptidos que están relacionados con un polipéptido según la invención.

Las sustituciones de aminoácidos múltiples pueden hacerse y evaluarse usando métodos conocidos de mutagénesis, recombinación y/o redistribución seguido de un procedimiento de selección pertinente, tal como los descritos por Reidhaar-Olson y Sauer (*Science* 241:53-57, 1988), Bowie y Sauer (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:2152-2156, 1989), WO95/17413, o WO 95/22625. Brevemente, estos autores revelan métodos para aleatorizar simultáneamente dos o

## ES 2 265 960 T3

más posiciones en un polipéptido, o para la recombinación/redistribución de mutaciones diferentes (WO95/17413, WO95/22625), seguido de la selección de un polipéptido funcional, y luego la secuenciación de los polipéptidos mutagenizados para determinar el espectro de las sustituciones admisibles en cada posición. Otros métodos que pueden ser usados incluyen la exposición en el fago (p. ej., Lowman *et al.*, *Biochem.* 30:10832-10837, 1991; Ladner *et al.*, Patente U.S. Nº. 5.223.409; Huse, Publicación de WIPO WO 92/06204) y mutagénesis región-dirigida (Derbyshire *et al.*, *Gene* 46:145, 1986; Ner *et al.*, *DNA* 7:127, 1988).

Los métodos de mutagénesis/redistribución según se ha descrito más arriba pueden ser combinados con métodos de selección automatizados de alto rendimiento para detectar la actividad de los polipéptidos mutagenizados y donados en las células huéspedes. Las moléculas mutagenizadas de ADN que codifican polipéptidos activos pueden ser recuperadas de las células huéspedes y rápidamente dispuestas en secuencias usando un equipamiento moderno. Estos métodos permiten la determinación rápida de la importancia de los residuos de aminoácidos individuales en un polipéptido de interés, y pueden ser aplicados a polipéptidos de estructura desconocida.

Usando los métodos mencionados anteriormente, un experto en la materia puede identificar y/o preparar una variedad de polipéptidos que son sustancialmente homólogos a la secuencia de aminoácidos de la xiloglucanasa de *Malbranchea* de la presente invención y retener la actividad xiloglucanasa de la proteína de tipo salvaje.

La enzima xiloglucanasa de la invención puede, además del núcleo enzimático que comprende el dominio catalítico, también comprende un dominio de unión a celulosa (CBD), el dominio de unión a celulosa y el núcleo enzimático (el dominio catalíticamente activo) de la enzima estando operativamente enlazados. El dominio de unión a celulosa (CBD) puede existir como una parte íntegra de la enzima codificada, o un CBD de otro origen puede ser introducido en la xiloglucanasa creando así un híbrido enzimático. En este contexto, el término "dominio de unión a la celulosa" se destina a ser entendido tal y como está definido por Peter Tomme *et al.* "Cellulose-Binding Domains: Classification and Properties" in "Enzymatic Degradation of Insoluble Carbohydrates", John N. Saddler and Michael H. Penner (Eds.), ACS Symposium Series, No. 618, 1996. Esta definición clasifica más de 120 dominios de unión a celulosa en 10 familias (I-X), y demuestra que los CBDs se encuentran en varias enzimas tales como celulasas, xilanasas, mananasas, arabinofuranosidasas, acetil esterases y quitinasas. Los CBDs también han sido encontrados en algas, p. ej. el alga rojo *Porphyra purpurea* como una proteína de unión a polisacáridos no hidrolítica, véase Tomme *et al.*, op.cit. No obstante, la mayor parte de los CBDs son de celulasas y xilanasas, los CBDs se encuentran N y C términos de las proteínas o son internos. Los híbridos enzimáticos son conocidos en la técnica, véase p. ej. WO 90/00609 y WO 95/16782, y pueden ser preparados transformando un constructo de ADN en una célula huésped que comprende al menos un fragmento de ADN que codifica el dominio de unión a celulosa ligado, con o sin un ligador, a una secuencia de ADN que codifica la xiloglucanasa y haciendo crecer la célula huésped para expresar el gen fusionado. Los híbridos enzimáticos pueden ser descritos por la fórmula siguiente:

### CBD - MR - X

donde CBD es la región N-terminal o C-terminal de una secuencia de aminoácidos correspondiente al menos al dominio de unión a celulosa; MR es la región media (el ligador), y puede ser un enlace, o un grupo de enlace corto preferiblemente de aproximadamente 2 a aproximadamente 100 átomos de carbono, más preferiblemente de 2 a 40 átomos de carbono; o es preferiblemente de aproximadamente 2 a aproximadamente 100 aminoácidos, más preferiblemente de 2 a 40 aminoácidos; y X es una región N-terminal o C-terminal de un polipéptido codificado por la molécula de polinucleótidos de la invención.

### *El sustrato de xiloglucano*

Además de lo anteriormente mencionado sobre el xiloglucano mencionado debe ser observado que el xiloglucano de semillas tamarindas suministradas por Megazyme, Irlanda, tiene una estructura ramificada compleja con glucosa, xilosa, galactosa y arabinosa en la proporción de 45:36:16:3. En consecuencia, se cree con aseveración que una enzima que muestra actividad catalítica en este xiloglucano también tiene actividad catalítica en otras estructuras de xiloglucano de distintas fuentes (angioespermas o gimnoespermas).

### *Uso en la industria de detergentes*

Durante el lavado y el desgaste, la materia colorante de los tejidos o prendas teñidas de forma convencional desatiñen del tejido que luego tiene un aspecto descolorido y gastado. La eliminación de fibras de la superficie del tejido parcialmente restaurará los colores originales y el aspecto del tejido.

Mediante los términos "aclaramiento del color", según se utiliza en este caso, se entiende la restauración parcial de los colores iniciales de tejidos o prendas en todos los ciclos de lavado múltiples.

El término "desfrisado" se refiere a la eliminación de frisas de la superficie del tejido.

Los términos "solución de remojo" se refieren a una solución acuosa donde la lavandería puede ser sumergida antes de ser sometida a un proceso de lavado convencional. La solución de remojo puede contener uno o más ingredientes usados de forma convencional en un proceso de lavado o de blanqueamiento.

## ES 2 265 960 T3

El término “solución de lavado” se refiere a una solución acuosa donde la colada es sometida a un proceso de lavado, es decir normalmente una acción química combinada y mecánica bien manualmente o en una lavadora. De forma convencional, la solución de lavado es una solución acuosa de una composición de detergente en polvo o líquida.

El término “solución de aclarado” se refiere a una solución acuosa donde la colada es sumergida y, tratada de forma convencional inmediatamente después de ser sometida a un proceso de lavado, para aclarar la colada, es decir esencialmente eliminando la solución de detergente de la colada. La solución de aclarado puede contener una composición acondicionadora del tejido o suavizante.

La colada sometida al método de la presente invención puede ser una colada lavable convencional. Preferiblemente, la mayor parte de la colada son tejidos cosidos o sin coser, incluyendo prendas tricotadas, tejidas, vaqueras, de hilo, y toallas, hechas de algodón, mezclas de algodón o de celulosa natural o artificial (p. ej. originadas a partir de fibras de celulosa que contienen xilano tales como de la pulpa de madera) o mezclas de las mismas. Ejemplos de mezclas son las mezclas de algodón o rayón/viscosa con uno o más materiales parecidos tales como lana, fibras sintéticas (p. ej. fibras de poliamida, fibras acrílicas, fibras de poliéster, fibras de alcohol polivinílico, fibras de cloruro de polivinililo, fibras de cloruro de polivinilideno, fibras de poliuretano, fibras de poliurea, fibras de aramida), y fibras conteniendo celulosa (p. ej. rayón/viscosa, ramio, lino en bruto/lino, yute, fibras de acetato de celulosa, liocel).

### Descripción y ejemplos de detergentes

#### *Sistema surfactante*

Las composiciones de detergentes según la presente invención comprenden un sistema surfactante, donde el surfactante puede ser seleccionado de surfactantes no iónicos y/o aniónicos y/o catiónicos y/o anfóteros y/o zwitteriónicos y/o semipolares.

El surfactante está normalmente presente a un nivel de un 0.1% a un 60% en peso.

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

Los sistemas preferidos para ser usados según la presente invención comprenden como surfactante uno o más de los surfactantes no iónicos y/o aniónicos descritos en la presente.

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

Los productos de condensación de alcoholes alifáticos primarios y secundarios con entre 1 y 25 moles de óxido de etileno son adecuados para el uso como surfactante no iónico de los sistemas surfactantes no iónicos de la presente invención. La cadena alquilo del alcohol alifático puede bien ser recta o, ramificada, primaria o secundaria, y generalmente contiene de unos 8 a unos 22 átomos de carbono. Preferidos son los productos de condensación de alcoholes que tienen un grupo alquilo que contiene de unos 8 a unos 20 átomos de carbono, más preferiblemente de unos 10 a unos 18 átomos de carbono, con de unos 2 a unos 10 moles de óxido de etileno por mol de alcohol. Aproximadamente de 2 a 7 moles de óxido de etileno y más preferiblemente de 2 a 5 moles de óxido de etileno por mol de alcohol están presentes en dichos productos de condensación. Ejemplos de agentes tensioactivos no iónicos comercialmente disponibles de este tipo incluyen Tergitol™ 15-S-9 (el producto de condensación de alcohol lineal C<sub>11</sub>-C<sub>15</sub> con 9 moles de óxido de etileno), Tergitol™ 24-L-6 NMW (el producto de condensación de alcohol primario C<sub>12</sub>-C<sub>14</sub> con 6 moles de óxido de etileno con una distribución de peso molecular estrecha), ambos comercializados por Union Carbide Corporation; Neodol™ 45-9 (el producto de condensación de alcohol lineal C<sub>14</sub>-C<sub>15</sub> con 9 moles de óxido de etileno), Neodol™ 23-3 (el producto de condensación de alcohol lineal C<sub>12</sub>-C<sub>13</sub> con 3.0 moles de óxido de etileno), Neodol™ 45-7 (el producto de condensación de alcohol lineal C<sub>14</sub>-C<sub>15</sub> con 7 moles de óxido de etileno), Neodol™ 45-5 (el producto de condensación de alcohol lineal C<sub>14</sub>-C<sub>15</sub> con 5 moles de óxido de etileno) comercializado por Shell Chemical Company, Kyro™ EOB (el producto de condensación de alcohol C<sub>13</sub>-C<sub>15</sub> con 9 moles de óxido de etileno), comercializado por The Procter & Gamble Company, y Genapol LA 050 (el producto de condensación de alcohol C<sub>12</sub>-C<sub>14</sub> con 5 moles de óxido de etileno) comercializado por Hoechst. La gama preferida de HLB en estos productos es de 8-11 y más preferida de 8-10.

## ES 2 265 960 T3

También útiles como surfactantes no iónicos de los sistemas de surfactante de la presente invención son los alquilpolisacáridos descritos en US 4.565.647, que tienen un grupo hidrofóbico que contiene de unos 6 a unos 30 átomos de carbono, preferiblemente de unos 10 a unos 16 átomos de carbono y un polisacárido, p. ej. un poliglicósido, grupo hidrofílico que contiene de unas 1.3 a unas 10, preferiblemente de unas 1.3 a unas 3, más preferiblemente de unas 1.3 a unas 2.7 unidades de sacáridos. Cualquier sacárido reductor que contenga 5 o 6 átomos de carbono puede ser usado, p. ej., las fracciones de glucosa, galactosa y galactosilo pueden ser sustituidas por las fracciones de glucosilo (opcionalmente el grupo hidrofóbico está unido en las posiciones 2-, 3-, 4-, etc. dando así una glucosa o galactosa como oposición a un glucósido o galactósido). Los enlaces intersacáridos pueden estar, p. ej., entre la posición de las unidades de sacáridos adicionales y las posiciones 2-, 3-, 4-, y/o 6- en las unidades de sacáridos precedentes.

Los alquilpoliglicósidos preferidos tienen la fórmula



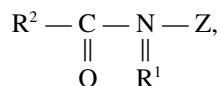
donde  $R^2$  está seleccionado del grupo que se compone de alquilo, alquilfenilo, hidroxialquilo, hidroxialquilfenilo, y sus mezclas derivadas donde los grupos alquilo contienen de unos 10 a unos 18, preferiblemente de unos 12 a unos 14, átomos de carbono;  $n$  es 2 o 3, preferiblemente 2;  $t$  es de 0 a 10, preferiblemente 0; y  $x$  es de aproximadamente 1.3 a aproximadamente 10, preferiblemente de aproximadamente 1.3 a aproximadamente 3, más preferiblemente de aproximadamente 1.3 a aproximadamente 2.7. El glicosilo es preferiblemente derivado de glucosa. Para preparar estos compuestos, el alcohol o alcohol de alquilpolietoxi está formado en primer lugar y luego reaccionado con glucosa, o una fuente de glucosa, para formar el glucósido (fijación en la posición 1). Las unidades de glicosilo adicionales pueden después unirse entre su posición 1 y las unidades de glicosilo precedentes en la posición 2, 3, 4, y/o 6, preferiblemente predominantemente la posición 2.

Los productos de condensación de óxido de etileno con una base hidrofóbica formada por la condensación de óxido de propileno con propilenglicol son también adecuados para el uso como los sistemas surfactantes no iónicos adicionales de la presente invención. La parte hidrofóbica de estos compuestos preferiblemente tienen un peso molecular de aproximadamente 1500 a aproximadamente 1800 y muestran insolubilidad en el agua. La adición de fracciones de polioxietileno para esta parte hidrofóbica tiende a aumentar la solubilidad del agua de la molécula como conjunto, y el carácter líquido del producto está retenido hasta el punto en que el contenido de polioxietileno es de aproximadamente el 50% del peso total del producto de condensación, que corresponde a la condensación con hasta aproximadamente 40 moles de óxido de etileno. Ejemplos de compuestos de este tipo incluyen algunos de los surfactantes Pluronic™ comercialmente disponibles, comercializados por BASF.

También adecuados para el uso como surfactantes no iónicos del sistema surfactante no iónico de la presente invención, son los productos de condensación de óxido de etileno con el producto que resulta de la reacción de óxido de propileno y etilendiamina. La fracción hidrofóbica de estos productos consiste en el producto de reacción de etilendiamina y exceso de óxido de propileno, y generalmente tiene un peso molecular de aproximadamente 2500 hasta aproximadamente 3000. Esta fracción hidrofóbica está condensada con óxido de etileno hasta el punto en que el producto de condensación contiene de aproximadamente el 40% a aproximadamente el 80% en peso de polioxietileno y tiene un peso molecular de aproximadamente 5.000 hasta aproximadamente 11.000. Ejemplos de este tipo de surfactante no iónico incluyen algunos de los compuestos Tetronic™ comercialmente disponibles, comercializados por BASF.

Preferido para el uso como surfactantes no iónicos de los sistemas surfactantes de la presente invención son condensados de óxido de polietileno de alquilfenoles, productos de condensación de alcoholes alifáticos primarios y secundarios con de aproximadamente 1 a aproximadamente 25 moles de etilenoóxido, alquilpolisacáridos, y mezclas derivadas. Los más preferidos son los alquil fenol etoxilatos  $C_8-C_{14}$  que tienen de 3 a 15 grupos etoxi y etoxilatos de alcohol  $C_8-C_{18}$  (preferiblemente  $C_{10}$  aprox.) que tienen de 2 a 10 grupos etoxi, y sus mezclas derivadas.

Los surfactantes no iónicos muy preferidos son los surfactantes de polihidroxidiamida de ácidos grasos de la fórmula



donde  $R^1$  es H, o  $R^1$  es  $C_{1-4}$  hidrocarbilo, 2-hidroxietilo, 2-hidroxipropilo o una mezcla derivada,  $R^2$  es  $C_{5-31}$  hidrocarbilo, y  $Z$  es un polihidroxihidrocarbilo con una cadena hidrocarbilo lineal con al menos 3 hidroxilos directamente conectados a la cadena, o un derivado alcoxilado. Preferiblemente,  $R^1$  es metilo,  $R^2$  es la cadena recta de  $C_{11-15}$  alquilo o  $C_{16-18}$  alquilo o alquenilo tal como alquilo de coco o mezclas derivadas, y  $Z$  está derivado de un azúcar de reducción tal como glucosa, fructosa, maltosa o lactosa, en una reacción de aminación reductiva.

Los surfactantes aniónicos más preferidos incluyen surfactantes de sulfato alquil alcoxilados. Ejemplos de esto son sales hidrosolubles o ácidos de la fórmula  $RO(A)_mSO_3M$  donde  $R$  es un grupo  $C_{10}-C_{24}$  alquilo o hidroxialquilo insustituido con un componente  $C_{10}-C_{24}$  alquilo, preferiblemente un  $C_{12}-C_{20}$  alquilo o hidroxialquilo, más preferiblemente  $C_{12}-C_{18}$  alquilo o hidroxialquilo,  $A$  es una unidad etoxi o propoxi,  $m$  es mayor que cero, normalmente entre aproxima-

## ES 2 265 960 T3

damente 0.5 y aproximadamente 6, más preferiblemente entre aproximadamente 0.5 y aproximadamente 3, y M es H o un catión que puede ser, por ejemplo, un catión metálico (p. ej., sodio, potasio, litio, calcio, magnesio, etc.), catión amonio-sustituido. Los alquil etoxilado sulfatos al igual que los alquil propoxilado sulfatos están contemplados en la presente. Ejemplos específicos de cationes de amonio sustituido incluyen cationes metil-, dimetil, trimetil-amonio y cationes de amonio cuaternario tales como tetrametil- amonio y cationes de dimetil piperdinio y aquellos derivados de alquilaminas tales como etilamina, dietilamina, trietilamina, mezclas derivadas, y similares. Unos surfactantes ejemplares son C<sub>12</sub>-C<sub>18</sub> alquil polietoxilato (1.0) sulfato (C<sub>12</sub>-C<sub>18</sub>E(1.0)M), C<sub>12</sub>-C<sub>18</sub> alquil polietoxilato (2.25) sulfato (C<sub>12</sub>-C<sub>18</sub>(2.25)M), y C<sub>12</sub>-C<sub>18</sub> alquil polietoxilato (3.0) sulfato (C<sub>12</sub>-C<sub>18</sub>E(3.0)M), y C<sub>12</sub>-C<sub>18</sub> alquil polietoxilato (4.0) sulfato (C<sub>12</sub>-C<sub>18</sub>E(4.0)M), donde M está convenientemente seleccionado entre sodio y potasio. Los surfactantes aniónicos adecuados para ser usados son surfactantes de alquil éster sulfonato que incluyen ésteres lineales de ácidos C<sub>8</sub>-C<sub>20</sub> carboxílicos (es decir, ácidos grasos) que son sulfonatados con SO<sub>3</sub> gaseoso según "The Journal of the American Oil Chemists Society", 52 (1975), págs. 323-329. Los precursores adecuados incluirán sustancias grasas naturales como derivados de sebo, aceite de palma, etc.

El surfactante de alquil éster sulfonato preferido, especialmente para aplicaciones en lavandería, comprende surfactantes de alquil éster sulfonato de la fórmula estructural:



donde R<sup>3</sup> es un C<sub>8</sub>-C<sub>20</sub> hidrocarbilo, preferiblemente un alquilo, o combinación suya, R<sup>4</sup> es un C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> hidrocarbilo, preferiblemente un alquilo, o combinación de éstos, y M es un catión que forma una sal hidrosoluble con alquil éster sulfonato. Los cationes formadores de sales adecuados incluyen metales tales como sodio, potasio, y litio, y cationes de amonio sustituido o insustituido, tales como monoetanolamina, dietanolamina, y trietanolamina. Preferiblemente, R<sup>3</sup> es C<sub>10</sub>-C<sub>16</sub> alquilo, y R<sup>4</sup> es metilo, etilo o isopropilo. Especialmente preferidos son los metil éster sulfonatos donde R<sup>3</sup> es C<sub>10</sub>-C<sub>16</sub> alquilo.

Otros surfactantes aniónicos adecuados incluyen los surfactantes de alquil sulfato que son sales hidrosolubles o ácidos de la fórmula ROSO<sub>3</sub>M donde R preferiblemente es un C<sub>10</sub>-C<sub>24</sub> hidrocarbilo, preferiblemente un alquilo o hidroxialquilo con un componente C<sub>10</sub>-C<sub>20</sub> alquilo, más preferiblemente un C<sub>12</sub>-C<sub>18</sub> alquilo o hidroxialquilo, y M es H o un catión, p. ej., un catión de metal alcalino (p. ej. sodio, potasio, litio), o amonio o amonio sustituido (p. ej. cationes de metil-, dimetil-, y trimetil amonio y cationes de amonio cuaternario tales como cationes de tetrametil-amonio y de dimetil piperdinio y cationes de amonio cuaternario derivados de alquilaminas tales como etilamina, dietilamina, trietilamina, y sus mezclas derivadas, y similares). Normalmente, las cadenas de C<sub>12</sub>-C<sub>16</sub> alquilo son preferidas para temperaturas de lavado inferiores (p. ej. inferiores a aproximadamente 50°C) y cadenas de C<sub>16</sub>-C<sub>18</sub> alquilo son preferidas para temperaturas de lavado más altas (p. ej. aproximadamente por encima de 50°C).

Otros surfactantes aniónicos útiles para fines deterivos pueden también estar incluidos en las composiciones de detergentes para lavandería de la presente invención. Estos pueden incluir sales (que incluyen, por ejemplo, sodio, potasio, amonio, y sales amónicas sustituidas tales como sales mono- di- y trietanolamina) de jabón, C<sub>8</sub>-C<sub>22</sub> alcanosulfonatos primarios o secundarios, C<sub>8</sub>-C<sub>24</sub> olefinsulfonatos, ácidos policarboxílicos sulfonatados preparados por sulfonación del producto pirolizado de citratos de metal alcalinotérreo, p. ej., como se describe en la descripción de la patente Británica N<sup>o</sup>. 1.082.179, C<sub>8</sub>-C<sub>24</sub> alquilpoliglicoletersulfatos (conteniendo hasta 10 moles de óxido de etileno); alquil glicerol sulfonatos, acil glicerol sulfonatos grasos, oleil glicerol sulfatos grasos, éter sulfatos de óxido de alquil fenol etileno, sulfonatos de parafina, alquil fosfatos, isetonatos tales como los acil isetonatos, N-acil tauratos, alquil succinamatos y sulfosuccinatos, monoésteres de sulfosuccinatos (especialmente C<sub>12</sub>-C<sub>18</sub> monoésteres saturados e insaturados) y diésteres de sulfosuccinatos (especialmente C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub> diésteres saturados e insaturados), acil sarcosinatos, sulfatos de alquilpolisacáridos tales como los sulfatos de alquilpoliglucósidos (los compuestos sin sulfatar no iónicos que están descritos más abajo), alquil sulfatos primarios ramificados, y alquil polietoxi carboxilatos tales como los de la fórmula RO(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>K</sub>-CH<sub>2</sub>COO-M+ donde R es un C<sub>8</sub>-C<sub>22</sub> alquilo, K es un número entero de 1 a 10, y M es una sal soluble que forma un catión. Los ácidos resínicos y ácidos resínicos hidrogenados son también adecuados, tales como ácidos de colofonia, colofonia hidrogenada, y ácidos resínicos y ácidos resínicos hidrogenados presentes en o derivados de aceite de Bogol.

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

Ejemplos adicionales están descritos en "Surface Active Agents and Detergents" (Vol. I y II por Schwartz, Perry y Berch). Una variedad de tales surfactantes están también descritos en general en US 3.929.678, (columna 23, línea 58 hasta Columna 29, línea 23, incorporada en la presente por referencia).

Cuando se incluyen, las composiciones de detergente para lavandería de la presente invención normalmente comprenden de aproximadamente 1% a aproximadamente 40%, preferiblemente de aproximadamente 3% a aproximadamente 20% en peso de tales surfactantes aniónicos.



## ES 2 265 960 T3

Cuando se incluyen, las composiciones de detergentes para lavandería de la presente invención normalmente comprenden del 0.2% a aproximadamente el 25%, preferiblemente de aproximadamente el 1% a aproximadamente el 8% en peso de tales surfactantes catiónicos.

5 Los surfactantes anfólicos son también adecuados para el uso en las composiciones de detergentes para lavandería de la presente invención. Estos surfactantes pueden ser descritos en general como derivados alifáticos de aminas secundarias o terciarias, o derivados alifáticos de aminas secundarias y terciarias heterocíclicas donde el radical alifático puede ser de cadena recta o ramificada. Uno de los sustituyentes alifáticos contiene al menos aproximadamente 8 átomos de carbono, normalmente de aproximadamente 8 a aproximadamente 18 átomos de carbono, y al menos uno  
10 contiene un grupo de hidrosolubilización aniónico, p. ej. carboxi, sulfonato, sulfato. Véase US 3.929.678 (columna 19, líneas 18-35) para ejemplos de surfactantes anfólicos.

Cuando se incluyen, las composiciones de detergentes para lavandería de la presente invención normalmente comprenden del 0.2% a aproximadamente el 15%, preferiblemente de aproximadamente el 1% a aproximadamente el 10%  
15 en peso de tales surfactantes anfólicos.

Los surfactantes zwitteriónicos son también adecuados para el uso en composiciones de detergentes para lavandería. Estos surfactantes pueden ser descritos en general como derivados de aminas secundarias y terciarias, derivados de aminas secundarias y terciarias heterocíclicas, o derivados de compuestos de amonio cuaternario, de fosfonio cuaternario o de sulfonio terciario. Véase US 3.929.678 (columna 19, línea 38 hasta columna 22, línea 48) para ejemplos de surfactantes zwitteriónicos.

Cuando se incluyen, las composiciones de detergentes para lavandería de la presente invención normalmente comprenden del 0.2% a aproximadamente el 15%, preferiblemente de aproximadamente el 1% a aproximadamente el 10%  
25 en peso de tales surfactantes zwitteriónicos.

Los surfactantes no iónicos semipolares son una categoría especial de surfactantes no iónicos que incluyen óxidos de amina hidrosolubles que contienen una fracción de alquilo de aproximadamente 10 a aproximadamente 18 átomos de carbono y 2 fracciones seleccionadas del grupo que se compone de grupos alquilo y grupos hidroxialquilo que  
30 contienen de aproximadamente 1 a aproximadamente 3 átomos de carbono; óxidos de fosfina solubles en agua que contienen una fracción de alquilo de aproximadamente 10 a aproximadamente 18 átomos de carbono y 2 fracciones seleccionadas del grupo que se compone de grupos alquilo y grupos hidroxialquilo que contienen de aproximadamente 1 a aproximadamente 3 átomos de carbono; y sulfóxidos hidrosolubles que contienen una fracción de alquilo de aproximadamente 10 a aproximadamente 18 átomos de carbono y una fracción seleccionada del grupo que se compone  
35 de alquilo y fracciones de hidroxialquilo de aproximadamente 1 a aproximadamente 3 átomos de carbono.

Los surfactantes de detergentes no iónicos semipolares incluyen los surfactantes de óxido de amina que tienen la fórmula:



45 donde  $\text{R}^3$  es un alquilo, hidroxialquilo, o grupo fenil alquilo o mezclas derivadas que contienen de aproximadamente 8 a aproximadamente 22 átomos de carbono;  $\text{R}^4$  es un grupo alquilenilo o hidroxialquilenilo que contiene de aproximadamente 2 a aproximadamente 3 átomos de carbono o mezclas derivadas;  $x$  es de 0 a aproximadamente 3; y cada  $\text{R}^5$  es un grupo alquilo o hidroxialquilo que contiene de aproximadamente 1 a aproximadamente 3 átomos de carbono o un grupo de óxido de polietileno que contiene de aproximadamente 1 a aproximadamente 3 grupos de óxido de etileno.  
50 Los grupos  $\text{R}^5$  pueden ser fijados entre sí, p. ej., a través de un átomo de oxígeno o de nitrógeno, para formar una estructura anular.

Estos surfactantes de óxido de amina en particular incluyen óxidos de  $\text{C}_{10}$ - $\text{C}_{18}$  alquil dimetil amina y óxidos de  $\text{C}_8$ - $\text{C}_{12}$  alcoxi etil dihidroxi etil amina.  
55

Cuando se incluyen, las composiciones de detergentes para lavandería de la presente invención normalmente comprenden del 0.2% a aproximadamente el 15%, preferiblemente de aproximadamente el 1% a aproximadamente el 10% en peso de tales surfactantes no iónicos semipolares.

### 60 *Sistema constructor*

Las composiciones según la presente invención pueden además comprender un sistema constructor. Cualquier sistema constructor convencional es conveniente para el uso en la presente incluyendo materiales de aluminosilicato, silicatos, policarboxilatos y ácidos grasos, materiales tales como el tetraacetato de etilendiamina, secuestrantes de  
65 iones metálicos tales como los aminopolifosfonatos, particularmente el ácido tetrametileno fosfónico de etilendiamina y el ácido pentametileno fosfónico de dietilendiamina. También se pueden usar aquí constructores de fosfato, aunque son menos preferidos por cuestiones medioambientales obvias.

## ES 2 265 960 T3

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

5 Otro material constructor inorgánico adecuado es el silicato estratificado, p. ej. SKS-6 (Hoechst). SKS-6 es un silicato cristalino estratificado consistente en silicato sódico en ( $\text{Na}_2\text{Si}_2\text{O}_5$ ).

Los policarboxilatos adecuados que contienen un grupo carboxi incluyen ácido láctico, ácido glicólico y derivados etéricos de los mismos como está descrito en las Patentes Belgas Nos. 831.368;821.369 y 821.370. Los policarboxilatos que contienen dos grupos carboxi incluyen las sales hidrosolubles de ácido succínico, ácido malónico, ácido (etilenodioxi) diacético, ácido maleico, ácido diglicólico, ácido tartárico, ácido tartrónico y ácido fumárico, al igual que los carboxilatos de éter descritos en el Offenle-enschrift alemán 2.446.686, y 2.446.487, US 3.935.257 y los sulfonil carboxilatos descritos en la Patente Belga N°. 840.623. Los policarboxilatos que contienen tres grupos carboxi incluyen, en particular, los citratos hidrosolubles, aconitratos y citraconatos así como los derivados del succinato tales como los carboximetiloxisuccinatos descritos en la Patente Británica N°. 1.379.241, los lactoxisuccinatos descritos en la solicitud holandesa 7205873, y los materiales de oxipolicarboxilato tales como los tricarboxilatos de 2-oxa-1,1,3-propano descritos en la Patente Británica N°. 1.387.447.

Los policarboxilatos que contienen cuatro grupos carboxi incluyen los oxidisuccinatos descritos en la Patente Británica N°. 1.261.829. 1,2,2,-etano tetracarboxilatos, 1,1,3,3-propano tetracarboxilatos conteniendo sustituyentes de sulfuro incluyen los derivados de sulfosuccinato descritos en las Patentes Británicas Nos. 1.398.421 y 1.398.422 y en US 3.936.448, y los citratos sulfonatados pirolizados descritos en la Patente Británica N°. 1.082.179, mientras que los policarboxilatos que contienen sustituyentes de fosfona están descritos en la Patente Británica N°. 1.439.000.

Los policarboxilatos alicíclicos y heterocíclicos incluyen ciclopentano-cis,cis-cis-tetracarboxilatos, pentacarboxilatos de ciclopentadienida, 2,3,4,5-tetrahidro-furano-cis, cis, cis-tetracarboxilatos, 2,5-tetrahidro-furano-cis, discarboxilatos, 2,2,5,5-tetrahidrofurano-tetracarboxilatos, 1,2,3,4,5,6-hexano-hexacarboxilatos y derivados de carboximetilo de alcoholes polihídricos tales como el sorbitol, manitol y xilitol. Los policarboxilatos aromáticos incluyen el ácido melítico, ácido piromelítico y los derivados de ácido ftálico descritos en la Patente Británica N°. 1.425.343.

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

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

Un quelante adecuado para su inclusión en las composiciones de detergentes conforme a la invención es el ácido etilendiamina-N,N'-disuccínico (EDDS) o las sales de metal alcalino, metal alcalinotérreo, amonio, o de amonio sustituido de las mismas, o sus mezclas derivadas. Los compuestos de EDDS preferidos son la forma ácida libre y la sal sódica o magnésica suya. Ejemplos de tales sales sódicas preferidas de EDDS incluyen  $\text{Na}_2\text{EDDS}$  y  $\text{Na}_4\text{EDDS}$ . Ejemplos de tales sales magnésicas preferidas de EDDS incluyen  $\text{MgEDDS}$  y  $\text{Mg}_2\text{EDDS}$ . Las sales magnésicas son las más preferidas para su inclusión en composiciones de acuerdo con la invención.

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

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

Otras sales orgánicas hidrosolubles adecuadas son los ácidos homo- o co-poliméricos o sus sales, donde el ácido policarboxílico comprende al menos dos radicales de carboxilo separados entre sí por no más de dos átomos de carbono.

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

Las sales adyuvantes para detergencia están normalmente incluidas en cantidades del 5% al 80% en peso de la composición. Los niveles preferidos de adyuvante para detergentes líquidos son del 5% al 30%.

### *Enzimas*

Las composiciones de detergentes preferidas, además de la preparación enzimática de la invención, comprenden otra(s) enzima(s) que proporciona(n) rendimiento de limpieza y/o beneficios en el cuidado de los tejidos.

Tales enzimas incluyen proteasas, lipasas, cutinasas, amilasas, celulasas, peroxidases, oxidasas (p. ej. lacasas).

## ES 2 265 960 T3

5 *Proteasas*: Cualquier proteasa adecuada para el uso en soluciones alcalinas puede ser usada. Las proteasas adecuadas incluyen las de origen animal, vegetal o microbiano. Se prefiere el origen microbiano. Los mutantes modificados química o genéticamente están incluidos. La proteasa puede ser una serina proteasa, preferiblemente una proteasa microbiana alcalina o una proteasa de tipo tripsina. Ejemplos de proteasas alcalinas son subtilisinas, especialmente las derivadas de *Bacillus*, p. ej., subtilisina Novo, subtilisina Carlsberg, subtilisina 309, subtilisina 147 y subtilisina 168 (descritas en WO 89/06279). Ejemplos de proteasas de tipo tripsina son la tripsina (p. ej. de origen porcino o bovino) y la proteasa de *Fusarium* descrita en WO 89/06270.

10 Las enzimas proteasas preferidas comercialmente disponibles incluyen aquellas vendidas bajo los nombres comerciales Alcalase, Savinase, Primase, Durazym, y Esperase por Novo Nordisk A/S (Dinamarca), aquellas vendidas bajo el nombre comercial Maxatase, Maxacal, Maxapem, Properase, Purafect y Purafect OXP por Genencor Internacional, y las vendidas bajo el nombre comercial Opticlean y Optimase por Solvay Enzymes. Las enzimas proteasas pueden ser incorporadas en las composiciones conforme a la invención a un nivel del 0.00001% al 2% en peso de proteína enzimática de la composición, preferiblemente a un nivel del 0.0001% al 1% en peso de proteína enzimática de la composición, más preferiblemente a un nivel del 0.001% al 0.5% en peso de proteína enzimática de la composición, incluso más preferiblemente a un nivel del 0.01% al 0.2% en peso de la proteína enzimática de la composición.

20 *Lipasas*: Cualquier lipasa adecuada para el uso en soluciones alcalinas puede ser usada. Las lipasas adecuadas incluyen aquellas de origen bacteriano o fúngico. Los mutantes modificados química o genéticamente están incluidos.

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

30 Además, varias lipasas donadas pueden ser útiles, incluyendo la lipasa de *Penicillium camembertii* descrita por Yamaguchi *et al.*, (1991), Gene 103:61- 67), la lipasa de *Geotricum candidum* (Schimada, Y. *et al.*, (1989), J. Biochem., 106:383-388), y varias lipasas de *Rhizopus* tales como una lipasa de *R. delemar* (Hass, M.J *et al.*, (1991), Gene 109:117-113), una lipasa de *R. niveus* (Kugimiyi *et al.*, (1992), Biosci. Biotech. Biochem. 56, 716-719) y una lipasa de *R. oryzae*.

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

Las lipasas especialmente adecuadas son lipasas tales como MI Lipase<sup>TM</sup>, Luma fast<sup>TM</sup> y Lipomax<sup>TM</sup> (Genencor), Lipolase<sup>TM</sup> y Lipolasa Ultra<sup>TM</sup> (Novo Nordisk A/S), y Lipasa P "Amano" (Amano Pharmaceutical Co. Ltd.).

45 Las lipasas están normalmente incorporadas en la composición de detergente a un nivel del 0.00001% al 2% en peso de proteína enzimática de la composición, preferiblemente a un nivel del 0.0001% al 1% en peso de proteína enzimática de la composición, más preferiblemente a un nivel del 0.001% al 0.5% en peso de proteína enzimática de la composición, incluso más preferiblemente a un nivel del 0.01% al 0.2% en peso de proteína enzimática de la composición.

50 *Amilasas*: Cualquier amilasa (a y/o b) adecuada para el uso en soluciones alcalinas puede ser usada. Las amilasas adecuadas incluyen aquellas de origen bacteriano o fúngico. Los mutantes modificados química o genéticamente están incluidos. Las amilasas incluyen, por ejemplo, a-amilasas obtenidas de una cepa especial de *B. licheniformis*, descrita con más detalle en GB 1.296.839. Las amilasas comercialmente disponibles son DuramyI<sup>TM</sup> TermamyI<sup>TM</sup>, FungamyI<sup>TM</sup> y BAN<sup>TM</sup> (disponible por Novo Nordisk A/S) y Rapidase<sup>TM</sup> y Maxamyl P<sup>TM</sup> (disponible por Genencor).

55 Las amilasas están normalmente incorporadas en la composición de detergentes a un nivel del 0.00001% al 2% en peso de proteína enzimática de la composición, preferiblemente a un nivel del 0.0001% al 1% en peso de la proteína enzimática de la composición, más preferiblemente a un nivel del 0.001% al 0.5% en peso de proteína enzimática de la composición, incluso más preferiblemente a un nivel del 0.01% al 0.2% en peso de proteína enzimática de la composición.

65 *Celulasas*: Cualquier celulasa adecuada para el uso en soluciones alcalinas puede ser usada. Las celulasas adecuadas incluyen aquellas de origen bacteriano o fúngico. Los mutantes modificados química o genéticamente están incluidos. Las celulasas adecuadas están descritas en US 4.435.307 que expone celulasas fúngicas producidas a partir de *Humicola insolens*, en WO 96/34108 y WO 96/34092 que exponen las celulasas alcalofílicas bacterianas (BCE 103) de *Bacillus*, y en WO 94/21801, US 0 5.475.101 y US 5.419.778 que exponen las celulasas EG III de *Trichoderma*. Las celulasas especialmente adecuadas son las celulasas que tienen beneficios en el cuidado del color. Ejemplos de tales celulasas son las celulasas descritas en la solicitud de patente europea N°. 0 495 257. Las celulasas comercialmente

## ES 2 265 960 T3

disponibles incluyen Celluzyme™ y Carezyme™ producidas por una cepa de *Humicola insolens* (Novo Nordisk A/S), KAC-500(B)™ (Kao Corporation), y Puradax™ (Genencor International).

5 Las celulasas están normalmente incorporadas en la composición de detergentes a un nivel del 0.00001% al 2% en peso de proteína enzimática de la composición, preferiblemente a un nivel del 0.0001% al 1% en peso de proteína enzimática de la composición, más preferiblemente a un nivel del 0.001% al 0.5% en peso de proteína enzimática de la composición, incluso más preferiblemente a un nivel del 0.01% al 0.2% en peso de proteína enzimática de la composición.

10 *Peroxidasas/oxidasas*: Las enzimas peroxidasas son usadas en combinación con peróxido de hidrógeno o una fuente de éste (p. ej. un percarbonato, perborato o persulfato). Las enzimas oxidasas son usadas en combinación con oxígeno. Ambos tipos de enzimas son usados para el “blanqueamiento de la solución”, es decir para evitar la transferencia de un tinte i textil de un tejido teñido a otro tejido cuando dichos tejidos son lavados juntos en una solución de lavado, preferiblemente junto con un intensificador como se describe en p. ej. WO 94/12621 y WO 95/01426. Las peroxidasas/oxidasas adecuadas incluyen aquellas de origen vegetal, bacteriano o fúngico. Los mutantes modificados  
15 química o genéticamente están incluidos.

Las enzimas peroxidasas y/u oxidasas son normalmente incorporadas en la composición de detergente a un nivel del 0.00001% al 2% en peso de proteína enzimática de la composición, preferiblemente a un nivel del 0.0001% al 1% en peso de proteína enzimática de la composición, más preferiblemente a un nivel del 0.001% al 0.5% en peso de la proteína enzimática de la composición, incluso más preferiblemente a un nivel del 0.01% al 0.2% en peso de proteína enzimática de la composición.

Las mezclas de las enzimas anteriormente mencionadas están incluidas en la presente, en particular una mezcla de  
25 una proteasa, una amilasa, una lipasa y/o una celulasa.

La enzima de la invención, o cualquier otra enzima incorporada en la composición de detergente, es normalmente incorporada en la composición de detergente a un nivel del 0.00001% al 2% en peso de proteína enzimática de la composición, preferiblemente a un nivel del 0.0001% al 1% en peso de proteína enzimática de la composición,  
30 más preferiblemente a un nivel del 0.001% al 0.5% en peso de proteína enzimática de la composición, incluso más preferiblemente a un nivel del 0.01% al 0.2% en peso de proteína enzimática de la composición.

### *Blanqueadores*

35 Unos ingredientes de detergentes opcionales adicionales que pueden ser incluidos en las composiciones de detergentes de la presente invención incluyen blanqueadores tales como PB1, PB4 y percarbonato con un tamaño de partícula de 400-800 micras. Estos componentes de blanqueadores pueden incluir uno o más blanqueadores de oxígeno y, dependiendo del blanqueador elegido, uno o más activadores del blanqueamiento. Cuando estén presentes los compuestos blanqueantes con oxígeno normalmente estarán en unos niveles de aproximadamente el 1% a aproximadamente el 25%. En general, los compuestos blanqueantes son componentes añadidos opcionales en formulaciones no líquidas, p. ej. en detergentes granulados. El componente de blanqueador para el uso en la presente puede ser cualquiera de los blanqueadores útiles para composiciones de detergentes incluyendo los blanqueadores de oxígeno al igual que otros conocidos en la técnica.

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

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

Otra categoría de blanqueadores que pueden ser usados incluyen los blanqueadores halogenados. Ejemplos de  
55 blanqueadores de hipohalita, por ejemplo, incluyen ácido tricloro isocianúrico y los dicloroisocianuratos de sodio y de potasio y N-cloro y N-bromo alcano sulfonamidas. Estos materiales son normalmente añadidos con un 0.5-10% en peso del producto acabado, preferiblemente con un 1-5% en peso.

Los agentes de liberación de peróxido de hidrógeno pueden ser usados en combinación con activadores del  
60 blanqueamiento tales como tetra-acetiletlenodiamina (TAED), nonanoiloxibencenosulfonato (NOBS, descrito en US 4.412.934), 3,5-trimetil-hexanoloxibencenosulfonato (ISONOBS, descrito en EP 120 591) o pentaacetilglucosa (PAG), que son perhidrolizadas para formar un perácido como las especies de blanqueamiento activo, conduciendo a un efecto blanqueador mejorado. Además, muy adecuados son los activadores del blanqueamiento C8(6-octanamido-caproil) oxibenceno-sulfonato, C9(6-nonanamido-caproil) oxibencenosulfonato y C10(6-decanamido-caproil) oxibencenosulfonato o sus mezclas derivadas. Otros activadores adecuados son ésteres de citrato acilado tales como  
65 los descritos en la solicitud de patente europea N°. 91870207.7.

## ES 2 265 960 T3

Los blanqueadores útiles, incluyendo los peroxiácidos y sistemas blanqueadores que comprenden activadores del blanqueamiento y compuestos blanqueadores de peróxido para el uso en composiciones de limpieza según la invención están descritos en la solicitud USSN 08/136.626.

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

10 Los blanqueadores distintos de los blanqueadores de oxígeno son también conocidos en la técnica y pueden ser utilizados en la presente. Un tipo de blanqueador sin oxígeno de interés particular incluye los blanqueadores fotoactivados tales como las ftalocianinas sulfonatadas de zinc y/o de aluminio. Estos materiales pueden ser depositados sobre el sustrato durante el proceso de lavado. Tras la irradiación con luz, en presencia de oxígeno, así como colgando la ropa fuera para que se seque a la luz diurna, la ftalocianina sulfonatada de zinc es activada y, consecuentemente, el sustrato es blanqueado. Ftalocianina de zinc preferida y un proceso de blanqueamiento fotoactivado están descritos en US 4.033.718. Normalmente, la composición de detergente contendrá aproximadamente el 0.025% a aproximadamente el 1.25%, en peso, de ftalocianina sulfonatada de zinc.

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

### *Supresores de espuma*

25 Otro ingrediente opcional es un supresor de espuma, ejemplificado por siliconas, y mezclas de sílice-silicona. Las siliconas pueden generalmente estar representadas por materiales de polisiloxano alquilado, mientras que el sílice es normalmente usado en formas finamente divididas ejemplificadas por aerogeles de sílice y xerogeles y sílices hidrofóbicos de varios tipos. Estos materiales pueden ser incorporados como partículas, donde el supresor de espuma es ventajosamente libremente incorporado en un portador impermeable de detergente sustancialmente no tensioactivo hidrosoluble o hidrodispersable. De forma alternativa el supresor de espuma puede ser disuelto o disperso en un portador líquido y aplicado por pulverización en uno o más de los demás componentes.

30 Un agente de control de espuma de silicona preferido está descrito en US 3.933.672. Otros supresores de espuma particularmente útiles son los supresores de espuma de silicona autoemulsificantes, descritos en la solicitud de patente alemana DTOS 2.646.126. Un ejemplo de este compuesto es DC-544, comercialmente disponible por Dow Corning, que es un copolímero de siloxano-glicol. El agente de control de espuma especialmente preferido es el sistema supresor de espuma que comprende una mezcla de aceites de silicona y 2-alkil-alcaneoles. 2-alkil-alcaneoles adecuados son 2-butil-octanol que está comercialmente disponible bajo el nombre comercial Isofol 12 R.

40 Este sistema supresor de espuma está descrito en la solicitud de patente europea EP 0 593 841.

Los agentes controladores de espuma de silicona especialmente preferidos están descritos en la solicitud de patente europea N°. 92201649.8. Dichas composiciones pueden comprender una mezcla de sílice/silicona en combinación con sílice no poroso tal como Aerosil<sup>R</sup>.

45 Los supresores de espuma anteriormente descritos son normalmente empleados a niveles entre el 0.001% y el 2% en peso de la composición, preferiblemente entre el 0.01% y el 1% en peso.

### *Otros componentes*

50 Otros componentes usados en composiciones de detergentes pueden ser empleados tales como agentes de suspensión de suciedad, agentes de liberación de la suciedad, blanqueadores ópticos, abrasivos, bactericidas, inhibidores de la decoloración, agentes colorantes, y/o perfumes encapsulados o no encapsulados.

55 Los materiales de encapsulación especialmente adecuados son cápsulas solubles en agua que consisten en una matriz de compuestos polisacáridos y de polihidroxi tal como se describe en GB 1.464.616.

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

65 Agentes de antirredeposición y de suspensión de suciedad adecuados aquí incluyen derivados de celulosa tales como metilcelulosa, carboximetilcelulosa e hidroxietilcelulosa, y ácidos homo o policarboxílicos copoliméricos o sus sales. Polímeros de este tipo incluyen los poliácridatos y copolímeros de anhídrido maléico-ácido acrílico previamente mencionados como constructores, al igual que los copolímeros de anhídrido maléico con etileno, metilvinil éter o ácido metacrílico, el anhídrido maléico constituyendo al menos 20 mol por ciento del copolímero. Estos materiales

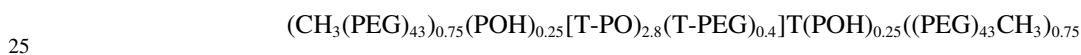
## ES 2 265 960 T3

son normalmente usados a niveles entre el 0.5% y el 10% en peso, más preferiblemente entre el 0.75% y el 8%, más preferiblemente entre el 1% y el 6% en peso de la composición.

Los blanqueadores ópticos preferidos son de carácter aniónico, siendo ejemplos de éstos disodio 4,4'-bis-(2-dietanolamino-4-anilino-s-triazin-6-ilamino)estilbeno-2:2'-disulfonato, disodio 4,-4'-bis-(2-morfolino-4-anilino-s-triazin-6-ilamino-estilbeno-2:2'-disulfonato, disodio 4,4'-bis-(2,4-dianilino-s-triazin-6-ilamino)estilbeno-2:2'-disulfonato, monosodio 4',4''-bis-(2,4-dianilino-s-triazin-6-ilamino)estilbeno-2-sulfonato, disodio 4,4'-bis-(2-anilino-4-(N-metil-N-2-hidroxietilamino)-s-triazin-6-ilamino)estilbeno-2,2'-disulfonato, disodio 4,4'-bis-(4-fenil-2,1,3-triazol-2-il)-estilbeno-2,2'-disulfonato, disodio 4,4'-bis(2-anilino-4-(1-metil-2-hidroxietilamino)-s-triazin-6-ilamino)estilbeno-2,2'-disulfonato, sodio 2(estilbil-4''-(nafto-1',2':4,5)-1,2,3,-triazolo-2''-sulfonato y 4,4'-bis(2-sulfoestiril)bifenilo.

Otros materiales poliméricos útiles son los polietileno glicoles, particularmente aquellos de peso molecular 1000-10000, más particularmente 2000 a 8000 y más preferiblemente aproximadamente 4000. Estos son usados a niveles entre el 0.20% y el 5% más preferiblemente entre el 0.25% y el 2.5% en peso. Estos polímeros y las sales de poliacarboxilato u copoliméricas previamente mencionadas son provechosos para mejorar el mantenimiento de la blancura, la deposición de ceniza en los tejidos, y el rendimiento de la limpieza en arcilla, manchas proteináceas y oxidables en presencia de impurezas de metales de transición.

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



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

También muy útiles son los poliésteres modificados como copolímeros aleatorios de dimetil tereftalato, dimetil sulfoisoftalato, etilenglicol y 1,2-propanodiol, los grupos terminales consistiendo principalmente en sulfobenzoato y secundariamente en monoésteres de etilenglicol y/o 1,2-propanodiol. El objetivo es el de obtener un polímero cubierto en ambos extremos por grupos de sulfobenzoato, "primariamente", en el contexto presente la mayor parte de dichos copolímeros estarán terminados en la presente por grupos sulfobenzoato. No obstante, algunos copolímeros no estarán completamente cubiertos, y en consecuencia sus grupos terminales pueden consistir en monoéster de etilenglicol y/o 1,2-propanodiol, éstos consisten "secundariamente" en tales especies.

Los poliésteres seleccionados aquí contienen aproximadamente el 46% en peso de ácido dimetil tereftálico, aproximadamente el 16% en peso de 1,2-propanodiol, aproximadamente el 10% en peso de etilenglicol, aproximadamente el 13% en peso de ácido dimetil sulfobenzoico y aproximadamente 15% en peso de ácido sulfoisoftálico, y tienen un peso molecular de aproximadamente 3.000. Los poliésteres y sus métodos de preparación están descritos con detalle en EP 311 342.

### *Agentes suavizantes*

Agentes suavizantes de los tejidos pueden también ser incorporados en composiciones de detergentes para lavandería de acuerdo con la presente invención. Estos agentes pueden ser de tipo inorgánico u orgánico. Agentes suavizantes inorgánicos están ejemplificados por las arcillas de esmectita descritas en GB-A-1 400898 y en US 5.019.292. Los agentes suavizantes de tejido orgánico incluyen las aminas terciarias insolubles en agua como se describe en GB-A1 514 276 y EP 0 011 340 y su combinación con sales amónicas mono  $\text{C}_{12}$ - $\text{C}_{14}$  cuaternarias están descritas en EP-B-0 026 528 y amidas de cadena larga como se describe en EP 0 242 919. Otros ingredientes orgánicos útiles de sistemas de reblandecimiento del tejido incluyen materiales de óxido de polietileno de alto peso molecular como se describe en EP 0 299 575 y 0313146.

Los niveles de arcilla de esmectita están normalmente en la gama del 5% al 15%, más preferiblemente del 8% al 12% en peso, con el material siendo añadido como un componente mezclado seco para el resto de la formulación. Agentes suavizantes de tejido orgánico tales como las aminas terciarias insolubles en agua o materiales de amidas de cadena larga están incorporados a niveles del 0.5% al 5% en peso, normalmente del 1% al 3% en peso mientras que los materiales de óxido de polietileno de alto peso molecular y los materiales catiónicos hidrosolubles son agregados a niveles del 0.1% al 2%, normalmente del 0.15% al 1.5% en peso. Estos materiales son normalmente añadidos a la parte secada por pulverización de la composición, aunque en algunos ejemplos sería más conveniente añadirlos como una partícula mezclada en seco, o pulverizarlos como un líquido fundido sobre otros componentes sólidos de la composición.

### *Inhibidores poliméricos de transferencia del color*

Las composiciones de detergentes según la presente invención pueden también comprender del 0.001% al 10%, preferiblemente del 0.01% al 2%, más preferiblemente del 0.05% al 1% en peso de inhibidores poliméricos de transferencia del color. Dichos inhibidores poliméricos de transferencia del color son normalmente incorporados en compo-

## ES 2 265 960 T3

siciones de detergentes para inhibir la transferencia de tintes de tejidos de color sobre tejidos lavados con éstos. Estos polímeros tienen la capacidad de formar complejos o adsorber los tintes fugitivos lavados de tejidos de color antes de que los tintes tengan la oportunidad de unirse a otros artículos en el lavado.

5 Los inhibidores poliméricos de transferencia de color especialmente adecuados son los polímeros de N-óxido poliamina, los copolímeros de N-vinilpirrolidona y N-vinilimidazola, los polímeros de polivinilpirrolidona, poliviniloxazolidonas y polivinilimidazolas o mezclas derivadas.

La adición de tales polímeros también realza el rendimiento de las enzimas según la invención.

10 La composición de detergentes según la invención puede estar en forma líquida, pasta, gel, barra o granulosa.

Los granulados no pulverulentos pueden ser producidos, p. ej., como se describe en US 4.106.991 y 4.661.452 (ambos para Novo Industri A/S) y pueden opcionalmente ser revestidos por métodos conocidos en la técnica. Ejemplos de materiales de revestimiento encerado son productos de óxido de poli(etileno), (polietilenglicol, PEG) con pesos moleculares medios de 1000 a 20000; nonilfenoles etoxilados que tienen de 16 a 50 unidades de óxido de etileno; alcoholes grasos etoxilados donde el alcohol contiene de 12 a 20 átomos de carbono y en el cual hay de 15 a 80 unidades de óxido de etileno; alcoholes grasos; ácidos grasos; y mono- y di- y triglicéridos de ácidos grasos. Ejemplos de materiales de revestimiento que forman una película adecuada para la aplicación por técnicas de lecho fluidificado están proporcionados en GB 1483591.

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

Las composiciones de la invención pueden ser formuladas por ejemplo, como composición de detergente para lavar a mano y a máquina incluyendo las composiciones aditivas para el lavado de ropa y las composiciones adecuadas para el uso en el pretratamiento de tejidos de color, composiciones suavizantes del tejido añadidas al aclarado, y para el uso en general en operaciones de limpieza de superficies duras domésticas y operaciones de lavado de la vajilla.

Los ejemplos siguientes pretenden ejemplificar las composiciones de la presente invención, pero no pretenden necesariamente limitar o por lo contrario definir el objetivo de la invención.

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

LAS:  $C_{12}$  alquil benceno sulfonato de sodio lineal

TAS: alquil sulfato de sodio de sebo

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

50 SS: surfactante de jabón secundario de la fórmula ácido 2-butil octanoico

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

55 45EY: un alcohol  $C_{14} - C_{15}$  primario predominantemente lineal condensado con un promedio de Y moles de óxido de etileno

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

60 No iónico: alcohol  $C_{13} - C_{15}$  mezclado etoxilado/proxilado graso con un grado de promedio de etoxilación de 3.8 y un grado de promedio de proxilación de 4.5 vendido bajo el nombre comercial Plurafax LF404 por BASF GmbH

CFAA:  $C_{12} - C_{14}$  alquil N-metil glucamida

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

Silicato: Silicato sódico amorfo (proporción  $SiO_2:N_2O = 2.0$ )

## ES 2 265 960 T3

NaSKS-6: Silicato cristalino estratificado de fórmula  $d\text{-Na}_2\text{Si}_2\text{O}_5$

Carbonato: carbonato sódico anhidro

5 Fosfato: Tripolifosfato de sodio

MA/AA: Copolímero de ácido 1:4 maléico/acrílico, peso molecular de promedio aproximadamente 80.000

10 Poliacrilato: Homopolímero de poliacrilato con un peso molecular de promedio de 8.000 vendido bajo el nombre comercial PA30 por BASF GmbH

Zeolita A: Aluminosilicato de sodio hidratado de fórmula  $\text{Na}_{12}(\text{AlO}_2\text{SiO}_2)_{12}\cdot 27\text{H}_2\text{O}$  que tiene un tamaño de partícula primario en la gama de 1 a 10 micrómetros

15 Citrato: Trisodio citrato dihidrato

Cítrico: Ácido cítrico

20 Perborato: Decolorante de perborato de sodio monohidrato anhidro, de fórmula empírica  $\text{NaBO}_2\cdot\text{H}_2\text{O}_2$

PB4: Perborato de sodio tetrahidrato anhidro

Percarbonato: decolorante de percarbonato de sodio anhidro de fórmula empírica  $2\text{Na}_2\text{CO}_3\cdot 3\text{H}_2\text{O}_2$

25 TAED: Tetraacetil etilen diamina

CMC: Carboximetilcelulosa de sodio

30 DETPMP: Dietilentriammina penta (metileno ácido fosfónico), comercializado por Monsanto bajo el Nombre comercial Dequest 2060

PVP: Polímero de polivinilpirrolidona

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

Supresor de espuma: 25% de cera de parafina Mpt 50°C, 17% de sílice hidrofóbico, 58% de aceite de parafina

Supresor de espuma granuloso: 12% Silicona/sílice, 18% de estearil alcohol, 70% almidón en forma granulosa

40 Sulfato: sulfato de sodio anhidro

HMWPEO: Óxido de polietileno de alto peso molecular

45 TAE 25: Alcohol etoxilato de sebo (25).

### *Ejemplo I de detergente*

50 Una composición de limpieza de tejido granuloso conforme a la invención puede ser preparado como sigue:

	Sodio lineal $\text{C}_{12}$ alquilo sulfonato de benceno	6.5
	Sulfato de sodio	15.0
55	Zeolita A	26.0
	Nitilotriacetato de sodio	5.0
	Enzima de la invención	0.1
	PVP	0.5
60	TAED	3.0
	Ácido bórico	4.0
	Perborato	18.0
	Fenol sulfonato	0.1
65	Auxiliares	Hasta 100

## ES 2 265 960 T3

### *Ejemplo II de detergente*

Una composición compacta de limpieza de tejido granulosa (densidad 800 g/l) acorde con la invención puede ser preparada como sigue:

5			
	45AS	8.0	
	25E3S	2.0	
	25E5	3.0	
10	25E3	3.0	
	TFAA	2.5	
	Zeolita A	17.0	
	NaSKS-6	12.0	
15	Ácido cítrico	3.0	
	Carbonato	7.0	
	MA/AA	5.0	
	CMC	0.4	
20	Enzima de la invención	0.1	
	TAED	6.0	
	Percarbonato	22.0	
	EDDS	0.3	
25	Supresor de espuma granuloso	3.5	
	agua/auxiliares	Hasta 100%	

### *Ejemplo III de detergente*

Las composiciones de limpieza de tejido granulosa conforme a la invención que son especialmente útiles en el lavado de tejidos de color fueron preparadas como sigue:

30			
	LAS	10.7	-
35	TAS	2.4	-
	TFAA	-	4.0
	45AS	3.1	10.0
	45E7	4.0	-
40	25E3S	-	3.0
	68E11	1.8	-
	25E5	-	8.0
	Citrato	15.0	7.0
45	Carbonato	-	10
	Ácido cítrico	2.5	3.0
	Zeolita A	32.1	25.0
	Na-SKS-6	-	9.0
50	MA/AA	5.0	5.0
	DETPMP	0.2	0.8
	Enzima de la invención	0.10	0.05
	Silicato	2.5	-
55	Sulfato	5.2	3.0
	PVP	0.5	-
	Poli(4-vinilpiridina)N-óxido/copolímero de vinil-imidazola y vinil-pirrolidona	-	0.2
	Perborato	1.0	-
60	Fenol sulfonato	0.2	-
	Agua/auxiliares	Hasta 100%	

65

## ES 2 265 960 T3

### Ejemplo IV de detergente

Las composiciones de limpieza de tejidos granulosas conforme a la invención que proporcionan capacidad “suavizante en el lavado” pueden ser preparadas como sigue:

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

### 35 Ejemplo V de detergente

Composiciones de limpieza de tejidos líquidas de acción fuerte conforme a la invención pueden ser preparadas como sigue:

40		I	II
	forma de ácido LAS	-	25.0
	Ácido cítrico	5.0	2.0
	forma de ácido 25AS	8.0	-
45	forma de ácido 25AE2S	3.0	-
	25AE7	8.0	-
	CFAA	5	-
	DETPMP	1.0	1.0
50	Ácido graso	8	-
	Ácido oleico	-	1.0
	Etanol	4.0	6.0
	Propanodiol	2.0	6.0
55	Enzima de la invención	0.10	0.05
	Cloruro de coco-alkil dimetil hidroxi etil amonio	-	3.0
	Arcilla de esmectita	-	5.0
60	PVP	2.0	-
	Agua/auxiliares	Hasta 100%	

### 65 Uso en las industrias de tratamiento de fibras textiles y celulósicas

En el contexto presente, el término “material celulósico” pretende significar fibras, tejidos cosidos y sin coser, incluyendo tricotados, tejidos, telas vaqueras, hilos, y toallas, hechas de algodón, mezclas de algodón o derivados celulósicos naturales o artificiales (p. ej. originados de fibras celulósicas que contienen xilano tales como de pulpa de

## ES 2 265 960 T3

madera) o mezclas derivadas. Ejemplos de mezclas son mezclas de algodón o rayón/viscosa con uno o más materiales parecidos tales como la lana, fibras sintéticas (p. ej. fibras de poliamida, fibras acrílicas, fibras de poliéster, fibras de alcohol polivinílico, fibras de cloruro de polivinililo, fibras de cloruro de polivinilideno, fibras de poliuretano, fibras de poliurea, fibras de aramida), y fibras conteniendo celulosa (p. ej. rayón/viscosa, ramio, cáñamo, lino/ropa, yute, fibras de acetato de celulosa, liocel).

La preparación de la presente invención es útil en la industria del tratamiento de fibras celulósicas para el pretratamiento o enriado de fibras de cáñamo, lino en bruto o lino.

El tratamiento de material celulósico para la industria textil, como por ejemplo fibra de algodón, en un material preparado para la producción de prendas conlleva diferentes fases: hilado de las fibras en un hilo; construcción de tejidos tejidos o hechos a partir del hilo y posterior preparación, coloración y operaciones de acabado. Los productos tejidos están contruidos tejiendo un hilo de relleno entre una serie de hilos de urdimbre; los hilos podrían ser de dos tipos diferentes. Los productos cosidos son contruidos formando una red de bucles entrelazados de una longitud continua del hilo. Las fibras celulósicas pueden también ser usadas para tejido no tejido.

El proceso de preparación prepara el producto textil para la respuesta apropiada en operaciones de coloración. Las subfases implicadas en la preparación son el desencolado (para productos tejidos), descrudado y blanqueamiento. Un proceso combinado de descrudado/decoloración de una fase es también usado por la industria. Aunque los procesos de preparación son más frecuentemente empleados en el estado tejido; las operaciones de descrudado, blanqueamiento y coloración pueden también hacerse en el estado de fibra o de hilo.

El régimen de tratamiento puede ser bien discontinuo o continuo donde el tejido es contactado por la corriente de tratamiento líquida a lo ancho o en forma de cordón. Las operaciones continuas generalmente usan un saturador por el cual un peso aproximadamente igual de baño químico por peso de tejido es aplicado al tejido, seguido de una cámara calentada a intervalos dónde la reacción química se desarrolla. Una estación de lavado luego prepara el tejido para la siguiente fase del tratamiento. El tratamiento discontinuo generalmente se desarrolla en un baño de tratamiento en el cual el tejido es puesto en contacto aproximadamente 8 -15 veces su peso en un baño químico. Después de un periodo de reacción, los productos químicos son drenados, el tejido es aclarado y el siguiente producto químico es aplicado. El tratamiento "pad-batch" implica un saturador por el cual un peso aproximadamente igual de baño químico por peso de tejido es aplicado al tejido, seguido de un periodo a intervalos que en el caso del "pad-batch" en frío puede ser de uno o más días.

Los productos tejidos son la forma predominante de construcción de los tejidos textiles. El proceso de tejido requiere un "encolado" del hilo retorcido para protegerlo de la abrasión. Almidón, alcohol polivinílico (alcohol polivinílico), carboximetilcelulosa, ceras y aglutinantes acrílicos son ejemplos de productos químicos típicos de encolamiento usados por su disponibilidad y coste. El encolado debe ser eliminado después del proceso de tejido como la primera fase de preparación de los productos tejidos. El tejido encolado sea en forma de cordón o a lo ancho es puesto en contacto con el líquido de tratamiento que contiene los agentes de desencolado. El agente de desencolado empleado depende del tipo de encolado que se deba eliminar. Para los encolados de PVA, se usan con a menudo agua caliente o procesos oxidantes. El agente de encolado más común para el tejido de algodón es a base de almidón. En consecuencia muy a menudo, los tejidos de algodón tejidos son desencolados por una combinación de agua caliente, la enzima  $\alpha$ -amilasa para hidrolizar el almidón y un agente humectante o surfactante. El material celulósico puede mantenerse con los productos químicos de desencolado durante un "periodo de tenencia" lo suficientemente largo para realizar el desencolado. El periodo de tenencia es dependiente del tipo de régimen de tratamiento y la temperatura y puede variar entre 15 minutos y 2 horas, o en algunos casos, varios días. Normalmente, los productos químicos de desencolado son aplicados en un baño saturador que generalmente varía entre aproximadamente 15°C y aproximadamente 55°C. El tejido es luego mantenido en un equipamiento tal como una "caja en J" que proporciona el calor suficiente, normalmente entre aproximadamente 55°C y aproximadamente 100°C, para realzar la actividad de los agentes de desencolado. Los productos químicos, incluyendo los agentes de encolado eliminados, son lavados aparte del tejido después de la finalización del periodo de tenencia.

Para asegurar una alta blancura o una buena humectabilidad y resultante teñibilidad, los productos químicos de encolado y otros productos químicos aplicados deben ser íntegramente eliminados. Generalmente se cree que un desencolado eficaz es de importancia crucial para los procesos de preparación siguientes: descrudado y blanqueamiento.

El proceso de descrudado elimina muchos de los compuestos no celulósicos naturalmente encontrados en el algodón. Además de las impurezas no celulósicas naturales, el descrudado puede eliminar suciedad, manchas y materiales de producción residual introducidos tales como los lubricantes del hilado, encanillado o desbroce. El proceso de descrudado emplea hidróxido sódico o agentes de caustización relacionados tales como carbonato sódico, hidróxido potásico o mezclas derivadas. Generalmente, un surfactante alcali estable es añadido al proceso para realzar la solubilización de compuestos hidrofóbicos y/o evitar su reposición en el tejido. El tratamiento se hace generalmente a una temperatura alta, 80°C - 100°C, utilizando soluciones fuertemente alcalinas, pH 13-14, del agente de descrudado. Debido a la naturaleza no específica de los procesos químicos no sólo son atacadas las impurezas sino la propia celulosa, conduciendo a daños en la resistencia u otras propiedades del tejido deseables. La suavidad del tejido celulósico es una función de las ceras de algodón naturales residuales. La naturaleza no específica del proceso de descrudado fuertemente alcalino a alta temperatura no puede discriminar entre los lubricantes de algodón natural deseables y la producción de los lubricantes introducidos. Además, el proceso de descrudado convencional puede causar problemas

## ES 2 265 960 T3

medioambientales debido al efluente altamente alcalino de estos procesos. El estadio de descrudado prepara al tejido para la respuesta óptima del blanqueamiento. Un tejido descrudado de forma inadecuada necesitará un nivel más alto de decolorante químico en los estadios de blanqueamiento posteriores.

- 5 La fase de blanqueamiento decolora los pigmentos de algodón natural y retira cualquier componente natural lignificado residual de algodón no extraído completamente durante el desmontado, cardado o descrudado. El proceso principal de uso actual es un decolorante de peróxido de hidrógeno alcalino. En muchos casos, especialmente cuando no se requiere una gran blancura, el blanqueamiento puede ser combinado con el descrudado.
- 10 Está considerado que la fase de descrudado puede llevarse a cabo usando la xiloglucanasa o la preparación de xiloglucanasa de la presente invención en combinación con algunas otras actividades enzimáticas a una temperatura de aproximadamente 50°C - 80°C y un pH de aproximadamente 7-11, substituyendo o complementando así los agentes de alta caustización.

### 15 **Materiales y métodos**

#### *Cepas fúngicas*

20 *Malbranchea cinnamomea*, CBS960.72

*Malbranchea cinnamomea*, CBS343.55

*Malbranchea cinnamomea*, UAMH2485.

- 25 Estas cepas están todas públicamente disponibles a partir de colecciones de cultivos reconocidas:

CBS -

Centraalbureau voor Schimmelcultures

- 30 Oosterstraat 1 Postbus 273

N L-3740 AG Baarn

- 35 Netherlands

UAMH -

- 40 University of Alberta Microfungus Collection & Herbarium

Devonian Botanic Garden

Edmonton, AB, Canada T6G 2E1

- 45 *Medios*

*YG: Agar de levadura-glucosa*

- 50 5.0 g de extracto de levadura en polvo Difco; 10.0 g de glucosa; 20.0 g de agar; 1000 ml de agua corriente. Autoclave a 121°C durante 15-20 min.

*Medios A por matraz*

- 55 30 g salvado de trigo; 45 ml de la solución siguiente: 4 g de extracto de levadura, 1 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0.5 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 15 g de glucosa; 1000 ml de agua corriente. Autoclave a 121°C durante 30 min.

*Medios B (50 ml/matraz)*

- 60 30 g de harina de soja; 15 g de maltosa; 5 g de peptona; 1000 ml  $\text{H}_2\text{O}$ ; 1 g de aceite de oliva (2 gotas/matraz). 50 ml en 500 ml de matraz de Erlenmeyer con 2 deflectores. Autoclave a 121°C durante 30 min.

#### *Procedimiento de fermentación*

- 65 Las cepas fúngicas fueron hechas crecer en una placa de agar YG (4.5 cm de diámetro) durante 3 días a 45°C en la oscuridad y usadas para inocular un frasco de agitación. Las placas con cultivos completamente crecidos fueron almacenadas a 4°C antes del uso.

## ES 2 265 960 T3

Para la producción enzimática, 4-6 tapones de agar con cultivos fúngicos completamente desarrollados en las placas anteriores fueron usados para inocular un frasco de agitación con los medios B y crecidos a 45°C, 160 rpm durante 12-24 horas y usados para inocular el frasco de agitación con los medios A para obtener un caldo de cultivo suficiente.

Aproximadamente 1 ml del caldo de cultivo cultivado anterior fue usado para inocular cada matraz con los medios A. Los frascos inoculados fueron hechos crecer durante 4 días a 45°C y condiciones fijas.

### *Preparación de la muestra para la prueba de actividad enzimática y purificación*

A cada matraz con salvado de trigo y un cultivo completamente crecido en medios A se añadieron 150 ml de agua corriente y se homogenizó mediante una varilla de vidrio esterilizada. La extracción enzimática fue extraída dejando el matraz a 4°C durante 2 horas. El caldo de cultivo fue luego centrifugado a 8000 rpm y 4°C durante 30 minutos y el sobrenadante fue recogido y evaluado por su actividad celulasa, ( $\beta$ -glucanasa y xiloglucanasa.

### *Pruebas de actividad enzimática*

#### *Ensayo en placas de agarosa*

Placas de agarosa que contienen el 1% agarosa en tampón fosfato-citrato pH 3, pH 7 y pH 10; 0.1% AZCL-xiloglucano, 0.1% AZCL-HE-celulosa y 0.1% AZCL-( $\beta$ -glucano (Megazyme, Australia), respectivamente; 20  $\mu$ l de la muestra fueron aplicados en agujeros d = 4 mm en las placas de agarosa, incubación a 45°C durante 12-16 horas. La actividad enzimática fue identificada por halos azules.

#### *Ensayo de placas de microtitulación*

Una solución de 0.2% de sustrato azul del AZCL-sustrato (AZCL-xiloglucano, AZCL-HE-celulosa, AZCL-( $\beta$ -glucano) es suspendida en un tampón 0.1 M de fosfato-citrato (pH 3-6) o tampón Borax/ $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (pH 7-9) o tampón glicina (pH 9-11) bajo agitación. La solución es distribuida bajo agitación en una placa de microtitulación (80  $\mu$ l para cada pocillo), se añaden 20  $\mu$ m de muestra enzimática y se incuban en un Termomezclador Eppendorf durante 1 hora a 50°C y 800 rpm. La muestra enzimática desnaturalizada (100°C hirviendo durante 20 min) fue usada como blanco. Tras la incubación la solución coloreada es separada del sólido por centrifugado a 3000 rpm durante 5 minutos a 4°C. 60  $\mu$ l de sobrenadante fueron transferidos a una placa de microtitulación y la absorbancia fue medida por un lector BioRad Microplate Reader a 595 nm.

#### *Ensayo en tubos Eppendorf*

Una solución al 0.2% de sustrato azul de AZCL-sustrato (AZCL-xiloglucano, AZCL-HE-celulosa, AZCL-( $\beta$ -glucano) es suspendida en un tampón fosfato-citrato 0.1 M (pH 3-6) o tampón Borax/ $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  pH 7-9) o tampón glicina (pH 9-11) bajo agitación. La solución es distribuida bajo agitación a tubos Eppendorf de 1.5 ml (900  $\mu$ l a cada uno), se añaden 100  $\mu$ m de la muestra enzimática y se incuban al baño maría durante 10-60 min. a 50°C. La muestra enzimática desnaturalizada (100°C hirviendo durante 20 min) fue usada como blanco. Tras la incubación la solución coloreada es separada del sólido por centrifugado a 5000 rpm durante 10 minutos a 4°C. 200  $\mu$ l de sobrenadante fueron transferidos a una placa de microtitulación y la absorbancia fue medida por un lector BioRad Microplate Reader a 595 nm.

#### *Isoelectroenfoque*

El isoelectroenfoque se efectuó en placas profundidas de Ampholine PAG pH 3.5-9.5 (Pharmacia, Suecia) según las instrucciones del fabricante. Las muestras fueron aplicadas por triplicado y tras la electroforesis el gel fue dividido en tres. Una sobreposición conteniendo 1% de agarosa y 0.4% de AZCL-xiloglucano, o 0.4% de AZCL-HE-celulosa, o 0.4% de AZCL-( $\beta$ -1.4-glucano en un tampón de pH 9 fue vertida sobre cada parte de gel. Se incubó a 45°C durante 12-16 horas. La actividad enzimática y el  $\mu$ l de la proteína enzimática fue identificada por las zonas azules.

### *Métodos de biología molecular generales*

A menos que se indique lo contrario todas las manipulaciones y transformaciones del ADN fueron realizadas usando métodos estándar de biología molecular (Sambrook *et al.* (1989) Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor lab., Cold Spring Harbor, NY; Ausubel, F. M. *et al.* (eds.) "Current protocols in Molecular Biology". John Wiley and Sons, 1995. Las enzimas para manipulaciones del ADN fueron usadas según las instrucciones del fabricante (p. ej. endonucleasas de restricción, ligasas etc. que se pueden obtener en New England Biolabs, Inc.).

### *Plásmidos*

pYES 2.0 (Invitrogen, EEUU)

pMT2188

## ES 2 265 960 T3

### Construcción del plásmido de expresión pMT 2188

El plásmido de expresión de *Aspergillus oryzae* pCaHj 483 (WO 98/00529) consiste en un cassette de expresión basado en el promotor de amilasa II neutro de *Aspergillus Niger* fusionado a la secuencia líder no traducida de triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus nidulans* (Pna2/tpi) y al terminador de amiloglicosidasa de *Aspergillus Niger* (Tamg). También presente en el plásmido está el marcador selectivo de *Aspergillus amdS* de *Aspergillus nidulans* que permite el crecimiento en acetamida como única fuente de nitrógeno. Estos elementos son clonados en el vector pUC19 de *E. coli*. El marcador de resistencia a la ampicilina que permite la selección en *E. coli* de este plásmido fue sustituido con el marcador URA3 de *Saccharomyces cerevisiae* que puede complementar una mutación de pyrF en *E. coli* de la siguiente manera:

El origen de replicación de pUC19 fue amplificado por PCR a partir de pCaHj483 con los cebadores:

142779: TTG AAT TGA AAA TAG ATT GAT TTA AAA CTT C  
142780: TTG CAT GCG TAA TCA TGG TCA TAG C

El cebador 142780 introduce un sitio Bbu I en el fragmento de la PCR.

El sistema de PCR Expand (Roche Molecular Biochemicals, Basel, Suiza) fue usado para la amplificación según las instrucciones de los fabricantes para ésta y las posteriores amplificaciones por PCR.

El gen URA3 fue amplificado a partir del vector de clonación general pYES2 de *S. cerevisiae* (Invitrogen corporation, Carlsbad, Ca, USA) usando los cebadores:

140288: TTG AAT TCA TGG GTA ATA ACT GAT AT  
142778: AAA TCA ATC TAT TTT CAA TTC AAT TCA TCA TT

El cebador 140288 introduce un sitio EcoR I en el fragmento de la PCR.

Los dos fragmentos de la PCR fueron fusionados mediante su mezcla y amplificados usando los cebadores 142780 y 140288 usando el empalme por el método de sobreposición (Horton *et al* (1989) Gene, 77;61-68).

El fragmento resultante fue digerido con EcoR I y Bbu I y ligado al fragmento más grande de pCaHj 483 digerido con las mismas enzimas. La mezcla de ligadura fue usada para transformar el cepa DB6507 de *E. coli* pyrF-(ATCC 35673) hecha competente por el método de Mandel y Higa (Mandel, M. and A. Higa (1970) J. Mol. Biol. 45;154). Los transformantes fueron seleccionados en un medio M9 sólido (Sambrook *et. al* (1989) Molecular cloning, a laboratory manual, 2. edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press) suplementado con 1 g/l de casaminoácidos, 500 (g/l de tiamina y 10 mg/l de canamicina).

Un plásmido de un transformante de este tipo fue denominado pCaHj 527. La construcción del plásmido se perfila en la figura xxx. El promotor pna2/tpi presente en pCaHj527 fue sometido a mutagénesis sitio dirigida por un enfoque de PCR simple. El nucleótido 134 - 144 varió de GTACTAAAACC a CCGTTAAATTT usando el cebador mutagénico 141223:

141223: GGA TGC TGT TGA CTC CGG AAA TTT AAC GGT TTG GTC TTG CAT CCC.

El nucleótido 423 - 436 varió de ATGCAATTTAAACT a CGGCAATTTAACGG usando el cebador mutagénico 141222:

141222: GGT ATT GTC CTG CAG ACG GCA ATT TAA CGG CTT CTG CGA ATC GC.

El plásmido resultante fue denominado pMT 2188.

### Condiciones de crecimiento

Una cepa de *Malbranchea cinnamomea* fue cultivada en frascos de agitación de 500 ml en un medio que contenía 30 g de salvado de trigo y 45 ml de la solución siguiente: 4 g de extracto de levadura, 1 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.5 g de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 15 g de glucosa, 1000 ml de agua corriente (Autoclave a 121°C durante 30 min), y el micelio fúngico fue cosechado después de 3 días de crecimiento. El micelio cosechado fue inmediatamente congelado en N<sub>2</sub> líquido y almacenado a -80°C.

### Construcción de una genoteca de ADNc EcoRI/NotI-direccional de *Malbranchea cinnamomea*

El ARN total fue preparado por extracción con tiocianato de guanidino seguido de ultracentrifugado a través de una almohadilla de CsCl 5.7 M (Chirgwin *et al.*, 1979, Biochemistry 18: 5294-5299) usando las modificaciones siguientes. El micelio congelado fue metido en N<sub>2</sub> líquido hasta dar un polvo fino con un mortero y una mano de mortero, luego

## ES 2 265 960 T3

triturado en un molinillo de café preenfriado, e inmediatamente suspendido en 5 volúmenes de tampón de extracción de ARN (4 M de tiocianato de guanidina, 0.5% de laurilsarcosina de sodio, 25 mM de citrato sódico pH 7.0; 0.1 M de  $\beta$ -mercaptoetanol). La mezcla fue agitada durante 30 minutos a la temperatura ambiente y centrifugada (20 minutos a 10 000 rpm, Beckman) hasta granular el detrito celular. El sobrenadante fue recogido, cuidadosamente estratificado sobre una almohadilla de CsCl 5.7 M (5.7 M de CsCl, 10 mM de EDTA, pH 7.5; 0.1% DEPC; sometido a autoclave antes del uso) usando 26.5 ml de sobrenadante por 12.0 ml de almohadilla de CsCl, y centrifugado para obtener el ARN total (Beckman, rotor SW 28, 25 000 rpm, temperatura ambiente, 24 horas). Después del centrifugado, el sobrenadante fue cuidadosamente eliminado y el fondo del tubo conteniendo el ARN granulado fue cortado y aclarado con etanol al 70%. El ARN granulado total fue transferido a un tubo Eppendorf, suspendido en 500  $\mu$ l de TE, pH 7.6 (en caso de dificultad, se calienta ocasionalmente durante 5 minutos a 65°C), extraído con fenol, y precipitado con etanol durante 12 horas a -20°C (2.5 volúmenes de etanol, 0.1 volumen de 3M de acetato sódico pH 5.2). El ARN fue recogido por centrifugado, lavado en etanol al 70%, y resuspendido en un volumen mínimo de DEPC. La concentración de ARN fue determinada midiendo OD<sub>260/280</sub>.

El ARN poli(A)<sup>+</sup> fue aislado por cromatografía de afinidad de oligo(dT)celulosa (Aviv & Leder, 1972, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 69: 1408-1412). Un total de 0.2 g de oligo(dT) celulosa (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) fue preaumentado en 10 ml de de tampón de carga de columna (20 mM Tris-Cl, pH 7.6; 0.5 M NaCl, 1 mM EDTA, 0.1% SDS), cargado sobre una columna de plástico tratada con DEPC y tapada (Poly Prep Chromatography Column, BioRad, Hercules, CA), y equilibrado con 20 ml de 1x tampón de carga. El ARN total (1-2 mg) fue calentado a 65°C durante 8 minutos, enfriado en hielo durante 5 minutos, y después de añadir 1 volumen de 2x tampón de carga de columna a la muestra de ARN cargada en la columna. El eluato fue recogido y recargado 2-3 veces calentando la muestra como antes y enfriándose en hielo antes de cada carga. La columna de oligo(dT) fue lavada con 10 volúmenes de 1x tampón de carga, luego con 3 volúmenes de tampón de sal medio (20 mM de Tris-Cl, pH 7.6; 0.1 M de NaCl, 1 mM de EDTA, 0.1% de SDS), seguido de elución del ARN poli(A)<sup>+</sup> con 3 volúmenes de tampón de elución (10 mM de Tris-Cl, pH 7.6; 1 mM de EDTA, 0.05% de SDS) precalentado a 65°C, recogiendo fracciones de 500  $\mu$ l. La OD<sub>260</sub> fue leída para cada fracción recogida, y el ARNm conteniendo las fracciones fue agrupado y precipitado con etanol a -20°C durante 12 horas. El ARN poli(A)<sup>+</sup> fue recogido por centrifugado, resuspendido en DEPC-DIW y almacenado en partes alícuotas de 5-10  $\mu$ g a -80°C.

El ADNc bicatenario fue sintetizado a partir de 5  $\mu$ g de ARN poli(A)<sup>+</sup> de *Maibranchea cinnamomea* por el método RNasa H (Gubler and Hoffman 1983, *supra*; Sambrook *et al.*, 1989, *supra*) usando una modificación de horquilla. El ARN poli(A)<sup>+</sup> (5  $\mu$ g en 5  $\mu$ l de agua tratado con DEPC) fue calentado a 70°C durante 8 minutos en un tubo Eppendorf presiliconizado sin RNasa, enfriado en hielo, y combinado en un volumen final de 50  $\mu$ l con tampón de transcriptasa inversa (50 mM de Tris-Cl pH 8.3; 75 mM de KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>; 10 mM de DTT) conteniendo 1 mM de DATP, DGTP y dTTP, y 0.5 mM de 5-metil-DCTP, 40 unidades de inhibidor de ribonucleasa de placenta humana, 4.81  $\mu$ g de cebador oligo(dT)<sub>18</sub>-*NotI* (Amersham-Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia) y 1000 unidades de transcriptasa inversa SuperScript II (Gibco-BRL, EEUU).

El ADNc de la primera cadena fue sintetizado incubando la mezcla reactiva a 45°C durante 1 hora. Después de la síntesis, la mezcla híbrida ARNm:ADNc fue filtrada en gel a través de una columna de rotación Pharmacia MicroSpin S-400 HR según las instrucciones del fabricante.

Después de la filtración en gel, los híbridos fueron diluidos en 250  $\mu$ l del tampón de la segunda cadena (20 mM de Tris-Cl pH 7.4; 90 mM de KCl, 4.6 mM de MgCl<sub>2</sub>; 10 mM de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0.16 mM ( $\beta$ NAD<sup>+</sup>) conteniendo 200  $\mu$ M de cada dNTP, 60 unidades de ADN polimerasa I de *E. coli* (Pharmacia, Uppsala, Suecia), 5.25 unidades de RNasa H, y 15 unidades de ADN-ligasa de *E. coli*. La síntesis de ADNc de la segunda cadena fue realizada incubando el tubo de reacción a 16°C durante 2 horas, y 15 minutos adicionales a 25°C. La reacción fue detenida por adición de EDTA a una concentración final de 20 mM seguido de extracciones con fenol y cloroformo.

El ADNc bicatenario fue precipitado con etanol a -20°C durante 12 horas por adición de 2 volúmenes de etanol al 96% y 0.2 volúmenes de 10 M de acetato amónico, recuperado por centrifugado, lavado en etanol al 70%, secado (Speedvac), y resuspendido en 30  $\mu$ l de tampón de nucleasa de judía Mung (30 mM de acetato sódico pH 4.6; 300 mM de NaCl, 1 mM de ZnSO<sub>4</sub>; 0.35 mM de ditiotreititol, 2% glicerol) conteniendo 25 unidades de nucleasa de judía Mung. El ADN de la horquilla monocatenaria fue cortado incubando la reacción a 30°C durante 30 minutos, seguido de la adición de 70  $\mu$ l de 10 mM de Tris-Cl, pH 7.5; 1 mM de EDTA, extraído con fenol, y precipitado con etanol con 2 volúmenes de etanol al 96% y 0.1 volúmenes de acetato sódico 3 M pH 5.2 en hielo durante 30 minutos.

Los ADNcs bicatenarios fueron recuperados por centrifugado (20.000 rpm, 30 minutos), y terminados con extremos romos con T4 ADN polimerasa en 30  $\mu$ l de tampón de T4 ADN polimerasa (20 mM de Tris-acetato, pH 7.9; 10 mM de acetato magnésico, 50 mM de acetato de potasio, 1 mM de ditiotreititol) conteniendo 0.5 mM de cada dNTP, y 5 unidades de T4 ADN polimerasa incubando la mezcla reactiva a +16°C durante 1 hora. La reacción fue detenida mediante la adición de EDTA a una concentración final de 20 mM, seguido de extracciones con fenol y precipitación con cloroformo y con etanol durante 12 h a 20°C añadiendo 2 volúmenes de etanol al 96% y 0.1 volúmenes de 3M d acetato sódico pH 5.2.

Después de la reacción de relleno los ADNcs fueron recuperados por centrifugado como antes, lavados en etanol al 70%, y el ADN granulado fue secado en una Speedvac. El granulado de ADNc fue resuspendido en 25  $\mu$ l de tampón de unión (30 mM de Tris-Cl, pH 7.8; 10 mM de MgCl<sub>2</sub>; 10 mM de ditiotreititol, 0.5 mM de ATP) conteniendo 2  $\mu$ g

## ES 2 265 960 T3

de adaptadores *EcoRI* (0.2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , Pharmacia, Uppsala, Suecia) y 20 unidades de T4 ligasa incubando la mezcla de reacción a 16°C durante 12 horas. La reacción fue detenida calentándola a 65°C durante 20 minutos, y luego colocada en hielo durante 5 minutos. El ADNc adaptado fue digerido con *NotI* mediante la adición de 20  $\mu\text{l}$  de agua sometida a autoclave, 5  $\mu\text{l}$  de 10x tampón de enzima de restricción *NotI* y 50 unidades de *NotI*, seguido de incubación durante 3 horas a 37°C. La reacción fue detenida calentando la muestra a 65°C durante 15 minutos. Los ADNcs fueron divididos por tamaño por electroforesis en gel de agarosa en un 0.8% de gel de agarosa de temperatura de baja fusión SeaPlaque GTG (FMC, Rockland, ME) en 1x TBE (en agua sometida a autoclave) para separar los adaptadores no ligados y los ADNcs pequeños. El gel fue accionado durante 12 horas a 15 V, y el ADNc fue seleccionado por tamaño con un corte a 0.7 kb cortando la parte inferior del gel de agarosa. Luego un gel de agarosa al 1.5% fue vertido delante del gel conteniendo ADNc, y los ADNcs bicatenarios fueron concentrados accionando el gel hacia atrás hasta que apareció como una banda comprimida en el gel.

El trozo de gel conteniendo ADNc fue recortado del gel y el ADNc fue extraído del gel usando el kit de purificación en bandas de gel GFX (Amersham, Arlington Heights, IL) como sigue. La rebanada de gel recortada fue pesada en un tubo Eppendorf Biopure de 2 ml, luego 10 ml de Capture Buffer fueron añadidos a cada 10 mg de rebanada de gel, la rebanada de gel fue disuelta por incubación a 60°C durante 10 minutos, hasta que la agarosa fue completamente solubilizada, la muestra en el fondo del tubo por centrifugado breve. La muestra derretida fue transferida a la columna de rotación GFX colocada en un tubo de recogida, incubada a 25°C durante 1 minuto, y luego centrifugada a toda velocidad en un microcentrífugo durante 30 segundos. El flujo a través fue esparcido, y la columna fue lavada con 500  $\mu\text{l}$  de tampón de lavado, seguido de centrifugado a toda velocidad durante 30 segundos. El tubo de recogida fue esparcido, y la columna fue colocada en un tubo Eppendorf de 1.5 ml, seguido de elución del ADNc por adición de 50  $\mu\text{l}$  de TE pH 7.5 al centro de la columna, se incubó a 25°C durante 1 minuto, y finalmente por centrifugado durante 1 minuto a velocidad máxima. El ADNc eluido fue almacenado a -20°C hasta construir la genoteca.

Una preparación de ADN plásmido para un clon de ADNc pYES2.0 conteniendo un inserto *EcoRI-NotI*, fue purificada usando un Qiagen Tip-100 según las instrucciones del fabricante (Qiagen, Valencia, CA). Un total de 10  $\mu\text{g}$  de ADN del plásmido purificado fue digerido hasta completarse con *NotI* y *EcoRI* en un volumen total de 60  $\mu\text{l}$  por adición de 6  $\mu\text{l}$  de 10x tampón de NE para EcoRI (New England Biolabs, Beverly, MA), 40 unidades de *NotI*, y 20 unidades de *EcoRI* seguido de incubación durante 6 horas a 37°C. La reacción fue detenida calentando la muestra a 65°C durante 20 minutos. El ADN del plásmido digerido fue extraído una vez con fenol-cloroformo, luego con cloroformo, seguido de la precipitación con etanol durante 12 horas a -20°C añadiendo 2 volúmenes de etanol al 96% y 0.1 volúmenes de 3 M de acetato sódico pH 5.2. El ADN precipitado fue resuspendido en 25  $\mu\text{l}$  de 1x TE pH 7.5, cargado en un gel de agarosa SeaKem 0.8% en 1x TBE, y realizado en el gel durante 3 horas a 60 V. El vector digerido fue recortado del gel, y el ADN fue extraído del gel usando el kit de purificación GFX en bandas de gel GFX (Amersham-Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia) según las instrucciones del fabricante. Después de medir la concentración de ADN por OD<sub>260/280</sub>, el vector eluido fue almacenado a -20°C hasta construir la genoteca.

Para establecer las condiciones de ligadura óptimas para la genoteca de ADNc, cuatro ligaduras de prueba fueron realizadas en 10  $\mu\text{l}$  de tampón de unión (30 mM Tris-Cl pH 7.8; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 10 mM DTT, 0.5 mM ATP) conteniendo 7  $\mu\text{l}$  de ADNc bicatenario, (correspondiente a aproximadamente 1/10 del volumen total en la muestra de ADNc), 2 unidades de T4 ligasa, y 25 ng, 50 ng y 75 ng de vector pYES2.0 seccionado con *EcoRI-NotI*, respectivamente (Invitrogen). La reacción de ligadura de control de la procedencia del vector contenía 75 ng de vector pYES.0 seccionado con *EcoRI-NotI* sin ADNc. Las reacciones de ligadura fueron realizadas por incubación a 16°C durante 12 horas, calentadas a 65°C durante 20 minutos, y luego 10  $\mu\text{l}$  de agua sometida a autoclave fueron añadidos a cada tubo. Un  $\mu\text{l}$  de las mezclas de ligadura fue sometido a electroporación (200 W, 2.5 kV, 25 mF) hasta dar 40  $\mu\text{l}$  de células DH10B de *E. coli* electrocompetentes (Life Technologies, Gaithersburg, MD). Después de la adición de 1 ml de SOC a cada mezcla de transformación, las células fueron hechas crecer a 37°C durante 1 hora, 50  $\mu\text{l}$  y 5  $\mu\text{l}$  de cada electroporación fueron colocados en placas de LB suplementadas con ampicilina a 100  $\mu\text{g}$  por ml y hechas crecer a 37°C durante 12 horas. Usando las condiciones óptimas, una genoteca de ADNc de *Malbranchea cinnamomea* conteniendo 2x10<sup>7</sup> unidades de formación de colonias independientes fue establecida en *E. coli*, con unos antecedentes de vector de aprox. 1%. La genoteca de ADNc fue almacenada como (1) depósitos individuales (25.000 C.F.U./pool) en glicerol al 20% a -80°C; (2) granulados celulares de los mismos depósitos a -20°C; (3) ADN del plásmido purificado por Qiagen de depósitos individuales a -20°C (Qiagen Tip 100); y (4), ADNc direccional bicatenario a -20°C.

*Generación de una sonda de ADNc para la xiloglucanasa de la familia 12 usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)*

Unos veinte (20) nanogramos de ADNc direccional bicatenario de *Malbranchea cinnamomea* fueron amplificados por PCR usando 200 pmol de un cebador sentido oligonucleótido conteniendo desoxiinosina degenerada, correspondiente a un péptido dentro del término de NH<sub>2</sub>, de la xiloglucanasa purificada (5'-GA(C/T) TT(C/T) TG(C/T) GGI CA(A/G) TGG GA-3') combinada con 200 pmol del cebador antisentido, correspondiente a un péptido dentro de una secuencia de aminoácidos interna determinada a partir de la xiloglucanasa purificada (5'-TGI (C/G)(A/T)(C/T) TG (A/G) TCC ATI CC(C/T) TG(C/T) TC-3'), un variador térmico PTC-200 Peltier (MJ Research, USA) y 2.5 unidades de polimerasa AmpliTaq Gold (Perkin-Elmer, EEUU). La reacción en cadena de la polimerasa fue realizada iniciando la PCR por una fase de desnaturalización a 94°C durante 10 min, y luego por 40 ciclos de PCR usando un perfil de ciclo de desnaturalización a 94°C durante 30 seg, recocimiento a 55°C durante 30 seg, y extensión a 72°C durante 1 min. Los productos de la amplificación fueron analizados por electroforesis en un gel de agarosa al 2%, y posteriormente un fragmento de PCR de aprox. 0.6 kb fue extraído del gel usando el kit de purificación en bandas de gel

GFX (Amersham-Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia) según las instrucciones del fabricante. El fragmento de PCR purificado fue secuenciado directamente por el método de terminación de la cadena didesoxi (Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 74;5463-5467) usando 300 ng de molde purificado por GFX, el kit de secuenciación de ciclos desoxi-terminal Taq (Perkin-Elmer, EEUU), terminadores marcados fluorescentes y 5 pmol del cebador oligonucleótido conteniendo desoxiinosina degenerada (5'-ACI GA(C/T) ATI CA(A/G) AA(C/T) GA(A/G) GA(A/G) (C/T)TI TGG -3'). El análisis de los datos de la secuencia fue realizado según Devereux *et al.*, 1984 (Devereux, J., Haerberli, P., and Smithies, O. (1984) Nucleic Acids Res. 12, 387-395).

#### Selección de la genoteca de ADNc

30 000 unidades de formación de colonias de la genoteca de ADNc de *Malbranchea cinnamomea* construida en pYES 2.0 fueron seleccionadas por hibridación de colonias (Sambrook *et al.* (1989) Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor lab., Cold Spring Harbor, NY) en *E. coli* usando un producto de la PCR ( $>1 \times 10^9$   $\mu\text{g}$  cpm) marcado en  $^{32}\text{P}$  aleatoriamente (Feinberg, A. P., and Vogelstein, B. (1983) *Anal. Biochem.* 132, 6-13 para la xiloglucanasa como una sonda. Las hibridaciones fueron realizadas en 2 X SSC (Sambrook *et al.* (1989) Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor lab., Cold Spring Harbor, NY), 5 X Solución de Denhardt (Sambrook *et al.* (1989) Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor lab., Cold Spring Harbor, NY), 0.5% (plv) SDS, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de ADN de esperma de salmón desnaturalizado durante 20 h a 65°C seguido de lavados en 5 X SSC a 25°C (2 X 15 min), 2 X SSC, 0.5% SDS a 65°C (30 min), 0.2 X SSC, 0.5% SDS a 65°C (30 min) y finalmente en 5 X SSC (2 X 15 min) a 25°C. La selección de la genoteca de ADNc de *Malbranchea cinnamomea* liberó 4 clones de fuerte hibridación, que fueron además analizados por secuenciación de las extremidades de ADNc con cebadores poliligadores pYES directos e inversos (Invitrogen, EEUU), y determinando la secuencia de nucleótidos del ADNc de xiloglucanasa más largo (designada pC1XYG1011) de ambas cadenas.

#### 25 Análisis de la secuencia de nucleótidos

La secuencia de nucleótidos del clon de ADNc de xiloglucanasa de *Malbranchea cinnamomea* de longitud total pC1XYG1011 fue determinada a partir de ambas cadenas por el método de terminación de la cadena didesoxi (Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 74;5463-5467) usando 500 ng de molde purificado por Qiagen (Qiagen, EEUU), el kit de secuenciación de ciclos desoxi-terminal Taq (Perkin-Elmer, EEUU), terminadores marcados fluorescentes y 5 pmol sea de cebadores poliligadores pYES 2.0 (Invitrogen, EEUU) o sea de cebadores oligonucleótidos sintéticos, dando como resultado la SEC ID NO:1 de la secuencia anexa y la secuencia de aminoácidos deducida del precursor de xiloglucanasa de la familia 12 mostrada en la SEC ID NO:2 anexa. El análisis de los datos de la secuencia fue realizado según Devereux *et al.*, 1984 (Devereux, J., Haerberli, P., and Smithies, O. (1984) Nucleic Acids Res. 12, 387-395).

#### Expresión heteróloga en *Aspergillus oryzae*

##### Transformación de *Aspergillus oryzae*

La transformación de *Aspergillus oryzae* se efectuó como se describe por Christensen *et al.*, (1988), Biotechnology 6, 1419-1422.

##### Construcción del cassette de expresión de xiloglucanasa para expresión de *Aspergillus*

El ADN del plásmido fue aislado del clon de ADNc de *Malbranchea cinnamomea* pC1XYG1011 usando procedimientos estándar y analizados por análisis de restricción enzimáticas. El inserto de ADNc XYG1011 fue amplificado por PCR usando 50 ng de ADN del plásmido pC1XYG1011 como molde, 100 pmol del cebador sentido, (5'-CGGGATCCGATAGAGTTCGAG- ATGAAGG-3'), combinado con 100 pmol del cebador antisentido, (5'-CCGCTCGAGCCAA-AGAGCTAAAAAAGTTG -3'), un variador térmico PTC-200 Peltier (MJ Research, EEUU) y el Expand High Fidelity PCR System (Roche Molecular Biochemicals, Alemania) según las instrucciones del fabricante. Treinta ciclos de PCR fueron realizados usando un perfil de ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 seg, recocimiento a 60°C durante 30 seg, y extensión a 72°C durante 2 min. los productos de amplificación fueron analizados por electroforesis en un gel de agarosa al 1%, y posteriormente el fragmento de PCR XYG1011 de aprox. 1.0 kb fue extraído del gel usando el kit de purificación en bandas de gel GFX (Amersham-Pharmacia Tech, Uppsala, Suecia) según las instrucciones del fabricante. Tanto el fragmento de PCR purificado como el vector pMT2188 de expresión en *Aspergillus* fueron digeridos dos veces con BamHI y XhoI. El vector fue posteriormente desfosforilado con fosfatasa alcalina Shrimp (Roche, Mannheim, Alemania) siguiendo las instrucciones de los fabricantes. Las enzimas de restricción y la fosfatasa fueron eliminadas con fenol y extraídas con cloroformo, y el fragmento de la PCR fue ligado al vector usando los métodos estándares (Sambrook *et al.* 1989). La cepa DB6507 de *E. coli* (F<sup>-</sup>, pyrF74::Tn5, supE44, lacY1, ara14, galK2, xyl5, mtl1, leuB6, proA2, hsdS20, recA13, rpsL20, thi-1, ?<sup>-</sup>) fue transformada con la mezcla de ligadura, y los transformantes fueron seleccionados por la presencia del inserto de la PCR en pMT2188 mediante la PCR de la colonia. Las reacciones de la PCR de la colonia fueron realizadas usando el método estándar de la PCR (Saiki *et al.*, 1988, Science 239:487- 491) con un 10  $\mu\text{l}$  volumen de células de *E. coli* no lisadas proporcionando el molde, una temperatura de recocimiento de 55°C y cebadores con las secuencias siguientes:

## ES 2 265 960 T3

cebador 1: GTTTCCAACCTCAATTTACCTC

cebador 2: TTGCCCTCATCCCCATCCTTT

5 Un clon de expresión identificado de esta manera fue designado pMStr43, y la secuencia del fragmento de la PCR clonado fue determinada para asegurar que no se introdujeron errores durante la amplificación. Una única sustitución de C por T fue encontrada hacia abajo en el codón de detención en la posición 849.

### Transformación de *Aspergillus oryzae*

10

Procedimiento general: 100 ml de YPD (Sherman *et al.*, Methods in Yeast Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, 1981) son inoculados con esporas de *A. oryzae* e incubados con agitación a 37°C durante aproximadamente 2 días. El micelio es cosechado por filtración a través de un miracloth y lavado con 200 ml de MgSO<sub>4</sub> 0.6 M. El micelio es suspendido en 15 ml de MgSO<sub>4</sub> 1.2 M con 10 mM de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 5.8, y se añade 1 ml del mismo tampón  
15 conteniendo 120 mg de Novozym 234, y la mezcla es incubada con agitación suave durante 1.5-2.5 horas a 37°C hasta que un gran número de protoplastos son visibles en una muestra inspeccionada con un microscopio. La suspensión es filtrada a través de un miracloth, el filtrado transferido a un tubo estéril y cubierto con 5 ml de sorbitol 0.6 M, 100 mM de Tris-HCl, pH 7.0. Se realiza el centrifugado durante 15 minutos a 100 g y los protoplastos son recogidos desde la parte superior de la almohadilla de MgSO<sub>4</sub>. 2 volúmenes de STC (1.2 M sorbitol, 10 mM 10 mM tris-HCl, pH 7.5)  
20 son agregados a la suspensión de protoplastos y la mezcla es centrifugada durante 5 minutos a 1000 g. El granulado del protoplasto es resuspendido en 3 ml de STC y regranulado. Esto se repite. Finalmente los protoplastos son resuspendidos en 0.2-1 ml de STC. 100 µl de suspensión de protoplastos son mezclados con 5 µg del ADN transformante suspendido en 10 µl de STC. La mezcla se deja a la temperatura ambiente durante 25 minutos. 1 ml de PEG 4000 al 60% en 10 mM de CaCl<sub>2</sub> y 10 mM de Tris-HCl, pH 7.5 se añade y se mezcla suavemente. La mezcla es incubada a la  
25 temperatura ambiente durante 25 minutos, luego centrifugada a 2500 g durante 15 minutos. Los protoplastos comprimidos son resuspendidos en 1 ml de STC y esparcidos en un medio selectivo conteniendo 1.0 M de sacarosa para el soporte osmótico de los protoplastos. Para pMT2188, un medio mínimo con 10 mM de acetamida y 67 mM de CsCl proporciona la selección para el marcador amdS. Los transformantes son distinguibles tras la incubación durante 4-7 días a 37°C.

30

### Identificación y aislamiento de un transformante de *Aspergillus oryzae* productor de xiloglucanasa

Cada colonia que surge en un medio selectivo tras la transformación de *Aspergillus* fue evaluada por su producción de xiloglucanasa mediante la transferencia del conidio a un medio mínimo sólido ajustado a pH 7.5 y conteniendo  
35 glucosa al 1% y 10 mM de NaNO<sub>3</sub>, y con una fina sobreposición del mismo conteniendo 0.1% p/v del sustrato AZCL-xiloglucano (Megazyme, Bray, Irlanda). La hidrólisis del sustrato fue detectada por difusión visible de colorante de azurina azul después del crecimiento durante toda la noche del conidio a 37°C. Una xiloglucanasa producida por el transformante según se detecta en este ensayo.

Este transformante fue aislado por dilución distribuyendo en líneas el conidio en un medio selectivo conteniendo 0.01% Tritón X-100 para limitar el tamaño de la colonia. Cuatro colonias aisladas que parecen surgir de esporas individuales fueron reevaluadas por su actividad xiloglucanasa en el medio anteriormente descrito, y adicionalmente fueron hechas crecer en 10 ml de medio YP (Sherman *et al.*, Methods in Yeast Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, 1981) con el 2% de maltosa a 30°C y 200 revoluciones/minuto durante 2 días. Los sobrenadantes de estos cultivos  
45 fueron fraccionados por SDS/PAGE usando un gel de poli(acrilamida de tris-glicina al 12% (Novex, San Diego, CA, EEUU) y la proteína fue coloreada con azul Coomassie según las instrucciones de los fabricantes. El producto aislado de *Aspergillus* productor de la cantidad más grande de xiloglucanasa fue designado MStr125.

### Determinación de unidades de xiloglucanasa (XGU o XyloU)

50

La actividad xiloglucanasa es medida usando AZCL-xiloglucano de Megazyme, Irlanda, como sustrato.

Una solución del 0.2% del sustrato azul es suspendida en un tampón de fosfato 0.1 M pH 7.5 bajo agitación. La solución está distribuida bajo agitación a tubos Eppendorf de 1.5 ml (0.75 ml a cada uno), se añaden 50 µl de solución  
55 enzimática y se incuba en un termomezclador Eppendorf modelo 5436 durante 20 min. a 40°C con una mezcla de 1200 rpm. Tras la incubación la solución coloreada es separada del sólido durante 4 min. El centrifugado a 14.000 rpm y la absorbencia del sobrenadante se mide a 600 nm. El ensayo es hecho por duplicado y los antecedentes hechos por duplicado son sustraídos. La lectura a 600 nm tiene que estar entre 0.2 y 1.5 para el uso en el cálculo de la actividad catalítica.

60

Una unidad XyloU está definida como la cantidad de enzima que da como resultado una absorbencia de 0.24 en una cubeta de 1 cm a 600 nm.

Los ejemplos siguientes ilustran la invención.

65

## ES 2 265 960 T3

### Ejemplo 1

#### *Selección de microorganismos productores de xiloglucanasa alcalina*

5 Los microorganismos fúngicos de *Malbranchea cinnamomea*, CBS 960.72, *Malbranchea cinnamomea*, CBS343.55 y *Malbranchea cinnamomea*, UAMH 2485 fueron cultivados como se describe en la sección Materiales y Métodos. Los caldos de cultivo fueron evaluados por su actividad xiloglucanasa, beta-glucanasa y celulasa en el ensayo de la placa de agarosa a tres pH diferentes (pH 3, pH 7, pH 10).

10 Las actividades siguientes fueron encontradas:

Cepa No.	Xiloglucanasa			Celulasa			$\beta$ -glucanasa		
	pH3	pH7	pH10	pH3	pH7	pH10	pH3	pH7	pH10
CBS960.72	-	++	++	++	+++	++	++	+++	++
CBS343.55	-	++	++	++	+++	++	++	+++	++
UAMH2485	-	++	++	++	+++	++	++	+++	++

### Ejemplo 2

#### *Purificación de xiloglucanasa de Malbranchea cinnamomea*

##### *A. Purificación parcial*

30 Para separar los dos tipos de celulasas de xiloglucanasa en los caldos de cultivo respectivos obtenidos en el ejemplo 1, la xiloglucanasa y la celulasa fueron parcialmente purificadas del caldo de cultivo del medio A (ver lista de medios) mediante el método descrito en Materiales y Métodos.

35 Aproximadamente 500 ml de caldo de cultivo para cada cepa fúngica se obtuvo cultivando el hongo en el medio A y luego extrayéndolo añadiendo 100 ml de agua esterilizada. El caldo de cultivo fue filtrado y la proteína fue precipitado por el 80% de sulfato amónico. Los granulados proteínicos precipitados fueron disueltos en aproximadamente 60 ml de tampón  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$  25 mM a pH 6.0. Luego la muestra fue sometida a ultrafiltración (lavada con el mismo tampón) en una membrana resistente a la celulasa Millipore Biomax-5 con un corte de 5 kDa hasta que la conductividad de las proteínas fue inferior a 1 ms/cm. 10 ml de esta muestra fue aplicada a la columna de intercambio iónico (Q-Sepharose Fast Flow, 34 ml) y equilibrados con 0.025 M de tampón fosfato pH 6.0. Tanto la xiloglucanasa como la CMCasa enlazadas a la columna y fueron eluidas usando un gradiente de cloruro sódico 1N. Todas las fracciones fueron recogidas y analizadas por su actividad xiloglucanasa y celulasa usando el ensayo de placas de microtitulación con el 0.5% de AZCL-sustrato.

45 En las Figuras 1-3 se muestran la actividad xiloglucanasa y celulasa en fracciones diferentes de purificación parcial de cada una de las tres cepas de *Malbranchea cinnamomea*: La Figura 1 muestra las fracciones de la cepa UAMH2485, la Figura 2 muestra las fracciones de la cepa CBS 343.55, y la Figura 3 muestra las fracciones de la cepa CBS 960.72. A partir de las figuras se puede constatar que las dos enzimas aparecieron en fracciones diferentes y así fueron fácilmente separadas. 1-3 fracciones contenían más actividad xiloglucanasa y no tenían actividad celulasa sea en CMC de la placa de agarosa (1%), AZCL-HE-celulosa (0.1%) incluso después de la incubación durante toda la noche a 45°C o ensayo líquido (0.5% AZCL-HE-celulosa, pH7 y 45°C, 800 rpm durante 2 horas y media.

55 Las fracciones con actividad xiloglucanasa fueron agrupadas y concentradas usando una membrana con un corte de 10 kDa. Las muestras concentradas fueron usadas para el ensayo IEF para determinar el pI y SDS- PAGE para determinar el peso molecular. Se determinó que la xiloglucanasa de las tres cepas de *Malbranchea cinnamomea* tiene el mismo pI (alrededor de pH 3.5) y el mismo peso molecular (alrededor de 25 kDa). Además, el enlace proteínico fue electrotransferido y parte de la secuencia N-terminal fue determinada como FCGQXDSEQSGPYIVYNNL, donde X es probablemente W (triptófano).

60 La actividad xiloglucanasa para cada una de las tres xiloglucanasas fue determinada como se describe en Materiales y Métodos con el resultado siguiente:

Cepas	XGU/ml
CBS 960.72	27.5
CBS 343.55	9.1
UAMH 2485	12.3

## ES 2 265 960 T3

### B. Purificación

La xiloglucanasa del caldo de cultivo fue parcialmente purificada según el modo descrito anteriormente. Las fracciones recogidas con actividad de xiloglucanasa fueron desaladas por columna Híprep 26/10, dividida en tubos de plástico (15 ml por tubo) y liofilizadas. El polvo liofilizado fue solubilizado en 2 ml de agua desionizada; 1 ml fue usado para la caracterización y 1 ml para la posterior purificación. La solución fue diluida en 25 mM de tampón Tris pH 7.0 seguido de concentración en una célula Amicon con una membrana con un corte de 5 kDa para reducir la conductividad. Cuando la conductividad fue inferior a 3 mSi la solución fue aplicada a una columna MonoQ de 1 ml equilibrada con el mismo tampón. La xiloglucanasa unida a la columna y fue eluida usando un gradiente de cloruro sódico 0.5 M. Todas las fracciones fueron analizadas por su actividad xiloglucanasa y 2 fracciones contenían toda la actividad.

En un SDS-PAGE de la fracción agrupada una banda clara con un PM de 25 kDa pudo ser identificada. Este enlace proteínico fue electroanalizado y parte de la secuencia N-terminal fue determinada y los datos siguientes fueron obtenidos: FCGQXDSEQSGPYIVYNNL. Esta secuencia N-terminal parcial tiene homología (63%) a XET de *Tiasporella phaseolina* descrita en la publicación de patente internacional WO98/38288.

Las fracciones de xiloglucanasa activas no mostraron actividad en AZCL HE celulosa después de 2 horas de incubación bajo condiciones idénticas como el ensayo de xiloglucanasa descrito en Materiales y Métodos.

### Ejemplo 3

Caracterización de xiloglucanasa de *Malbranchea cinnamomea*, UAMH 2485, CBS 343.55 y CBS 960.72

### Perfiles de pH

Para la determinación del perfil de pH de las xiloglucanasas purificadas en el ejemplo 2, una solución al 0.2% de sustrato AZCL-xiloglucano azul es suspendida en un tampón fosfato-citrato 0.1 M (pH 3;4;5) o tampón Borax/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> a pH 6, MOPS a pH 7, HEPES a pH8, o tampón glicina a pH 9-11 bajo agitación y se usa para el ensayo en placas de microtitulación como se describe en Materiales y Métodos. 80 µl de solución de sustrato al 0.2% de AZCL-xiloglucano y 20 µl de muestra de xiloglucanasa parcialmente purificada fueron mezclados e incubados durante 1 hora a 50°C, 800 rpm en un termomezclador Eppendorf. El perfil de pH para cada una de las xiloglucanasas de *Malbranchea cinnamomea*, UAMH 2485, CBS 343.55 y CBS 960.72 está mostrado en la tabla siguiente (en cuanto a actividad de xiloglucanasa relativa):

pH	UAMH 2485	CBS 343.55	CBS 960.72
4	0.28	0.26	0.44
5	0.41	0.49	0.51
6	0.69	0.72	0.72
7	1	1	1
8	0.76	0.83	0.83
9	0.74	0.81	0.81
10	0.50	0.57	0.66
11	0.43	0.51	0.61

El resultado muestra que las xiloglucanasas de estas cepas tienen perfiles de pH casi idénticos. En comparación con las xiloglucanasas conocidas éstas tienen más actividad alcalina: hubo un 50-80% de actividad de xiloglucanasa relativa incluso a pH10.

### Perfiles de temperatura

Para la determinación de los perfiles de temperatura, 70 µl de 0.2% de la solución de AZCL-xiloglucano de sustrato azul suspendida en 0.1 M de tampón de glicina a pH 9 bajo agitación y 30 µl de muestra de xiloglucanasa parcialmente purificada fueron mezclados en un tubo Eppendorf y se incubó durante 40 minutos a varias temperaturas (20, 30, 40, 50, 60, y 70°C) al baño maría. La muestra enzimática desnaturalizada (100°C hirviendo durante 20 min) fue usada como blanco. Tras la incubación la solución coloreada es separada del sólido por centrifugado a 10000 rpm durante 5

## ES 2 265 960 T3

minutos a 4°C. 60  $\mu$ l de sobrenadante fueron transferidos a una placa de microtitulación y la absorbancia fue medida por un lector de microplacas BioRad a 595 nm.

Los perfiles de temperatura de la xiloglucanasa de las cepas de *Malbranchea cinnamomea*, UAMH 2485, CBS 343.55 y CBS 960.72 están mostrados más abajo (en cuanto a la actividad xiloglucanasa relativa):

Temperatura (°C)	UAMH 2485	CBS 343.55	CBS 960.72
20	0.12	0.20	0.15
30	0.22	0.30	0.26
40	0.54	0.62	0.56
50	1	1	1
60	0.30	0.38	0.30
70	0.16	0.16	0.16

Las xiloglucanasas de las tres cepas de *Malbranchea cinnamomea* tienen perfiles de temperatura muy similares, éstas son activas a partir de 20-70°C y tienen actividad óptima a una temperatura alrededor de 50°C.

### Termoestabilidad

Para evaluar la termoestabilidad, las muestras de las enzimas parcialmente purificadas del Ejemplo 2 fueron incubadas en un baño maría a 40°C y evaluadas después de un período de incubación diferente (0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 y 6 horas), luego la actividad xiloglucanasa de estas muestras fue determinada por un ensayo de placas de microtitulación mezclando 70  $\mu$ l de 0.2% de la solución de AZCL-xiloglucano de sustrato azul suspendida en un tampón de glicina 0.1 M pH 9 bajo agitación y 30  $\mu$ l de la muestra en una placa de microtitulación y se incubó durante 40 minutos a 50°C 800 rpm en un termomezclador Eppendorf. La muestra enzimática desnaturalizada (100°C hirviendo durante 20 min) fue usada como blanco. Tras la incubación la solución coloreada fue separada del sólido por centrifugado a 10000 rpm durante 5 minutos a 4°C. 60  $\mu$ l de sobrenadante fueron transferidos a una placa de microtitulación y la absorbancia fue medida por un lector de microplacas BioRad a 595 nm.

El resultado de la prueba de termostabilidad está mostrado más abajo (en cuanto a actividad de xiloglucanasa relativa):

Tiempo de incubación (hr)	UAMH 2485	CBS 343.55	CBA 960.72
0	1	1	1
0.5	0.95	1	0.95
1	0.88	0.98	1.08
2	1	1.3	0.98
3	0.95	0.99	0.95
4	0.86	0.96	0.96
5	0.89	1	0.98
6	n.a.	1	1.01

Se puede observar que las enzimas de las tres cepas de *Malbranchea cinnamomea* son muy estables en la condición evaluada. Prácticamente no se vio ninguna pérdida de actividad incluso después de 6 horas de incubación a 40°C.

### Especificidad de sustrato

La xiloglucanasa parcialmente purificada de las tres cepas de *Malbranchea cinnamomea* UAMH2485, CBS 343.55 y CBS 960.72 fue evaluada por su especificidad del sustrato usando sustratos diferentes, incluyendo AZCL-xiloglu-

## ES 2 265 960 T3

cano (Tamarindo) para xiloglucanasa, AZCL-xilano (cascarillas de avena) para xilanasa, arabinano desramificado por AZCL para arabinasa, AZCL-galactomanano (algarrobo) para mananasa, AZCL-HE-celulosa para celulasa, AZCL-dextrana para endo-1,6-a-glucanasa, AZCL- galactano (patata) para endo-1,4- $\beta$ -galactanasa.

- 5 Se descubrió que la xiloglucanasa parcialmente purificada de estas tres cepas de *Malbranchea cinnamomea* sólo mostraron actividad xiloglucanasa y ninguna otra actividad enzimática. Puede ser concluido que las xiloglucanasas de estas cepas de *Malbranchea cinnamomea* son enzimas específicas de xiloglucano.

### Compatibilidad de detergentes

10

La xiloglucanasa parcialmente purificada de las tres cepas de *Malbranchea cinnamomea* UAMH2485, CBS 343.55 y CBS 960.72 como se describe en el ejemplo 2 A fueron evaluadas en 5 composiciones de detergentes comerciales diferentes Europeas y Chinas a dos dosificaciones (2 g/l y 4 g/l): los detergentes Europeos marcados Ariel® y Omo® y los detergentes Chinos marcados Ariel®, Tide® y Whitecat® en comparación con la actividad xiloglucanasa en el tampón pH 7.

15

Las xiloglucanasas purificadas descritas en el ejemplo 2 B fueron también evaluadas en las composiciones de detergentes siguientes bajo condiciones de lavado normales (40°C, 20 minutos de incubación): Ariel®Future líquido, 6 g/l, 18 Grain Hardness; Ariel®Future polvo, 6 g/l, 18 Grain Hardness; US Tide® líquido, 2 g/l, 8 Grain Hardness; 20 US Tide® polvo, 2 g/l, 8 Grain Hardness; Bonus™ líquido Japonés, 0.65 g/l, 8 Grain Hardness; Ariel® polvo Japonés, 0.65 g/l, 8 Grain Hardness; todos relativos a la actividad en un tampón de fosfato 0.1 M pH 7.5.

Las xiloglucanasas de las tres cepas fueron encontradas completamente activas en todos los detergentes comerciales evaluados y en todas las dosificaciones evaluadas.

25

### Ejemplo 4

#### Purificación y caracterización de xiloglucanasa clonada a partir de *Malbranchea cinnamomea*

30

Se obtuvo el caldo de fermentación a partir del lote #9947 usando el transformante Mstr125 de *Aspergillus oryzae* (ver Materiales y Métodos). Basado en la SEC ID NO:2 los datos siguientes podrían ser calculados: PM 25 kDa, pl 3.9, coeficiente de extinción molar 65530.

35

El caldo de fermentación fue filtrado a través de un filtro de vidrio Whatmann GF/d. y se obtuvo un total de 4700 ml con 515 Xilounidades por ml.

La solución de fermentación clara fue concentrada y formulada con mono propilenoglicol para evaluar el rendimiento.

40

Una muestra pequeña fue purificada hasta dar una homogeneidad alta usando una cromatografía en columna superdex75 usando 0.1 M de tampón de acetato sódico pH 6.0. La enzima pura dio una única banda en SDS-PAGE con un peso molecular aparente de 25 kDa. Usando la calorimetría por análisis diferencial la temperatura de fusión resultó ser 74°C. La enzima pura tuvo una actividad específica de 160 Xilounidades por mg de proteína.

45

Suero de conejo fue aumentado contra la enzima pura usando el procedimiento normal en el laboratorio DAKO Danés.

La secuencia N-terminal de la enzima madura resultó ser ADFCGQXDSEQSGPYIVYNNLWN usando la degradación Edman, la X podría no ser identificada pero es una W en base a la secuencia del gen.

50

La enzima fue más del 50% activa entre pH 5.5 y 9.0 a 40°C y completamente activa en detergentes en polvo comerciales. Fue muy estable en detergente líquido con una vida media superior a 30 días a 35°C.

La enzima no tiene actividad en CMC por ello no es una celulasa.

55

### Bibliografía

Cooney, D. & Emerson, R. 1964. Thermophilic fungi. An account of their biology, activities and classification. W.H. Freeman and Co., San Francisco and London, 188 pp.

60

Hawksworth, H.D. et al. 1995. *Dictionary of the Fungi.*, IMI, CAB.

Pauly, M. et al. 1999 A xyloglucan-specific endo- $\beta$ -1,4-glucanase from *Aspergillus aculeatus*: expression cloning in yeast, purification and characterization of the recombinant enzyme. *Glycobiology* 9: 93-100.

65

Mouchacca, J. 1997. Thermophilic fungi: biodiversity and taxonomic status. *Cryptogamie, Mycol.* 18: 19-69.

Oorschot, C.A.N. van & Hoog, G.S. de 1984. Some hyphomycetes with thallic conidia. *Mycotaxon* 20: 129-132.

## ES 2 265 960 T3

- Sigler, L.** 1987. *Trichothecium cinnamomeum*, an earlier name for the thermophilic hyphomycete *Malbranchea sulphurea*. *Mycologia* 79: 142-143.
- 5 **Sigler, L. & Carmichael, J.W.** 1976. Taxonomy of *Malbranchea* and some other hyphomycetes with arthroconidia. *Mycotaxon* 4: 349-488.
- Ausubel, F. M. *et al.* (eds.) "Current protocols in Molecular Biology". John Wiley and Sons, 1995.
- 10 N. C. **Carpita** and D. M. **Gibeaut** (1993) *The Plant Journal* 3:1-30.
- T. **Christensen et al.** *Biotechnology* vol 6 page 1419-1422, 1988.
- Devereux et al.** (1984) *Nucleic Acids Res.* 12, 387-395.
- 15 **Diderichsen, B., Wedsted, U., Hedegaard, L., Jensen, B. R., Sjøholm, C.** (1990) Cloning of aldB, which encodes alpha-acetolactate decarboxylase, an exoenzyme from *Bacillus brevis*. *J. Bacteriol.* 172:4315-4321.
- Dretzen, G., Bellard, M., Sassone-Corsi, P., Chambon, P.** (1981) A reliable method for the recovery of DNA fragments from agarose and acrylamide gels. *Anal. Biochem.* 112, 295-298.
- 20 **Eriksson, O.E. & Hawksworth, D.L.:** *Systema Ascomycetum* vol 12 (1993).
- S. C. **Fry et al** (1992) *Biochemical Journal* 282:821-828
- 25 **Hawksworth, D.L., Kirk, P.M., Sutton, B.C. and Pegler, D.N.:** Dictionary of the fungi, *International Mycological Institute*, 616 pp (1995);
- T. **Hayashi** and D. P. **Delmer** (1988) *Carbohydrate Research* 181:273-277.
- 30 **Henrissat, B.** 1991. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.*, 280:309-316.
- Henrissat, B., and A. Bairoch.** 1993. New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.*, 293:781-788.
- 35 **Jülich, W.:** Higher Taxa of Basidiomycetes, *Bibliotheca Mycologia* 85, 485 pp (1981).
- Jørgensen, P.L. et al.,** 1990, *Gene*, 96, p. 37-41.
- 40 **McKenzie, T. et al.,** 1986, *Plasmid* 15:93-103.
- Leatherbarrow, R. J.** (1992) Grafit version 3.0 Erithacus Software Ltd. Staines, U.K.
- Lever, M.** (1972) A new reaction for colorimetric determination of carbohydrates. *Anal. Biochem.* 47, 273-279.
- 45 **O'Donnell, K.:**Zygomycetes in culture, *University of Georgia*, US, 257 pp (1979).
- Pitcher, D. G., Saunders, N.A., Owen, R. J.** (1989). Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Lett. Appl. Microbiol.*, 8, 151-156.
- 50 J. K. C. **Rose et al** (1996) *Plant Physiology* 110:493-499
- A.L. Sonenshein, J.A. Hoch and Richard Losick (Eds.) (1993) *Bacillus subtilis* and other Gram-Positive Bacteria, *American Society for microbiology*, p.618.
- 55 **Vincken, J.P., Beldman, G., and Voragen, A.G.J.** Substrate-specificity of endoglucanases - what determines xyloglucanase activity. *Carbohydrate Research* 298(4):299-310, 1997.
- Von **Arx, J. A.:** The genera of fungi sporulating in culture, 424 pp (1981).
- 60 R. L. **Whistler** and J. N. **BeMiller** (1993) Industrial gums: Polysaccharides and their derivatives, *Academic Press Inc.*
- Yasbin, R.E., Wilson, G.A. and Young, F.E.** (1975) Transformation and transfection in lysogenic strains of *Bacillus subtilis*: evidence for selective induction of prophage in competent cells. *J. Bacteriol.* 121:296-304.
- 65 W.S. **York et al** (1996) *Carbohydrate Research* 285:99-128.

REIVINDICACIONES

1. Xiloglucanasa de la familia 12 que está seleccionada de uno entre

- 5
- (a) un polipéptido que comprende un fragmento codificado por la secuencia de ADN de las posiciones 141-806 de SEC ID NO:1;
  - (b) un polipéptido producido cultivando una célula que comprende la secuencia de la SEC ID NO:1 bajo condiciones donde la secuencia de ADN está expresada;
  - (c) una enzima de xiloglucanasa que tiene una secuencia de al menos el 80% de identidad a las posiciones 1-222 de la SEC ID NO:2 cuando la identidad está determinada por GAP proporcionado en el paquete del programa GCG versión 10.0 usando una penalización de creación de huecos de 8 y penalización de extensión de huecos de 2.
- 10
- 15

2. Xiloglucanasa según la reivindicación 1 que se obtiene o que se puede obtener a partir de una cepa de *Malbranchea*.

3. Enzima de xiloglucanasa aislada que está (i) libre de impurezas homólogas, y (II) producida cultivando una célula que comprende la secuencia de ADN de las posiciones 141-806 de la SEC ID NO:1.

4. Preparación enzimática que comprende la xiloglucanasa aislada según cualquiera de las reivindicaciones 1-3.

5. Preparación según la reivindicación 4 que además comprende una o más enzimas seleccionadas del grupo que se compone de proteasas, celulasas (endoglucanasas), ( $\beta$ -glucanasas, hemicelulasas, lipasas, peroxidasas, lacasas,  $\alpha$ -amilasas, glucoamilasas, cutinasas, pectinasas, reductasas, oxidasas, fenoloxidasas, ligninasas, pululanasas, pectato liasas, xiloglucanasas, xilanasas, pectina acetyl esterases, poligalacturonasas, ramnogalacturonasas, pectina liasas, otras mananasas, pectina metilesterases, celobiohidrolasas, transglutaminasas; o mezclas derivadas.

6. Una composición de detergente que comprende la preparación enzimática según cualquiera de las reivindicaciones 4-5 o la xiloglucanasa aislada según cualquiera de las reivindicaciones 1-3.

7. Un proceso para el tratamiento a máquina de tejidos, proceso que comprende el tratamiento del tejido durante un ciclo de lavado de un proceso de lavado a máquina con una solución de lavado que contiene la preparación enzimática según cualquiera de las reivindicaciones 4-5 o la xiloglucanasa aislada según cualquiera de las reivindicaciones 1-3.

8. Uso de la preparación enzimática según cualquiera de las reivindicaciones 4-5 o la xiloglucanasa aislada o purificada según cualquiera de las reivindicaciones 1-3 en la industria textil para mejorar las propiedades de las fibras celulósicas, hilo, tejido entretejido o no entretejido.

9. El uso según la reivindicación 8, donde la preparación enzimática o la enzima se usa en una fase del proceso de descruado.

10. Uso de la preparación enzimática según cualquiera de las reivindicaciones 4-5 o la xiloglucanasa aislada o purificada según cualquiera de las reivindicaciones 1-3 en la industria del tratamiento de la fibra celulósica para cardar fibras seleccionadas del grupo que se compone de cáñamo, yute, lino en bruto y lino.

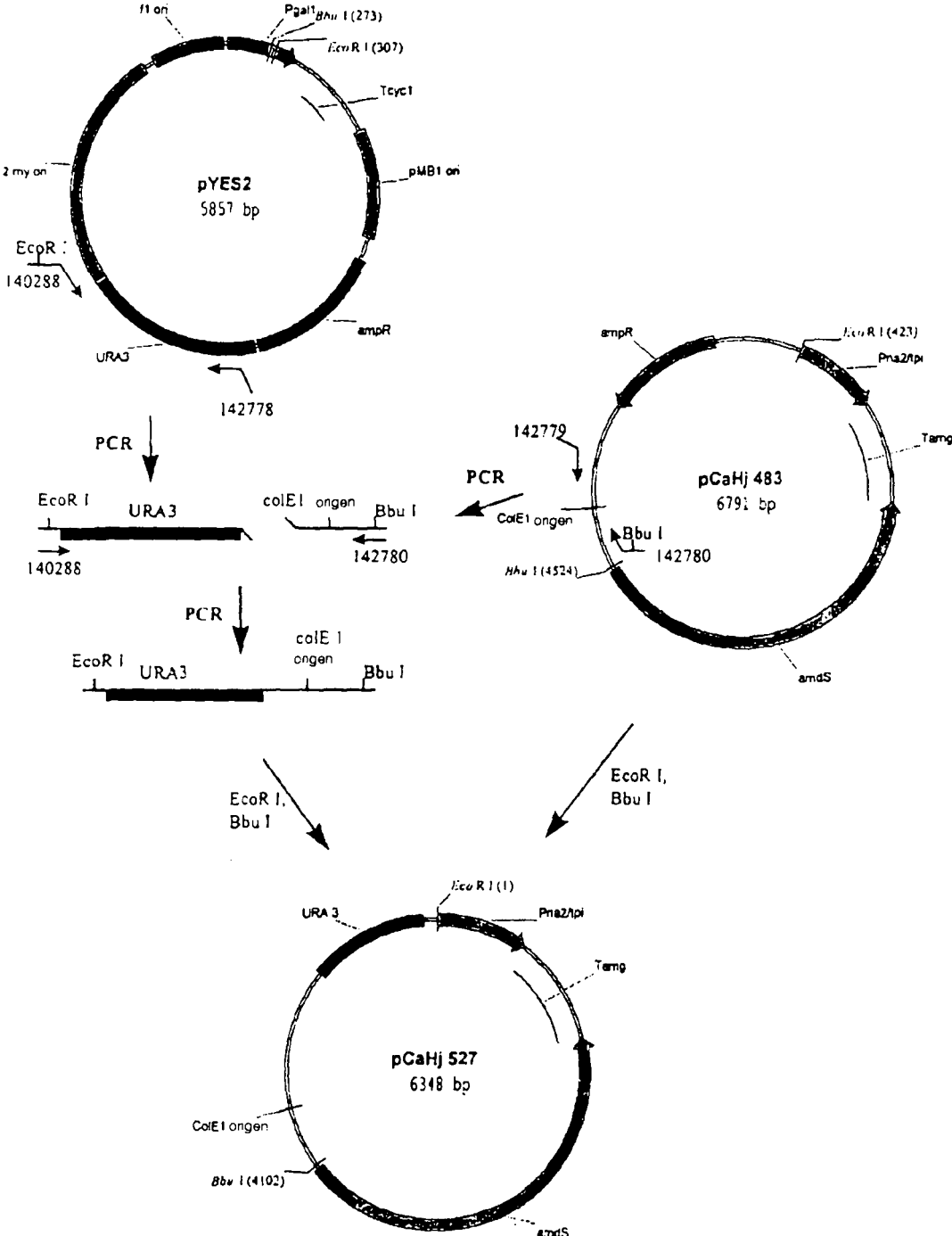


Fig. 1

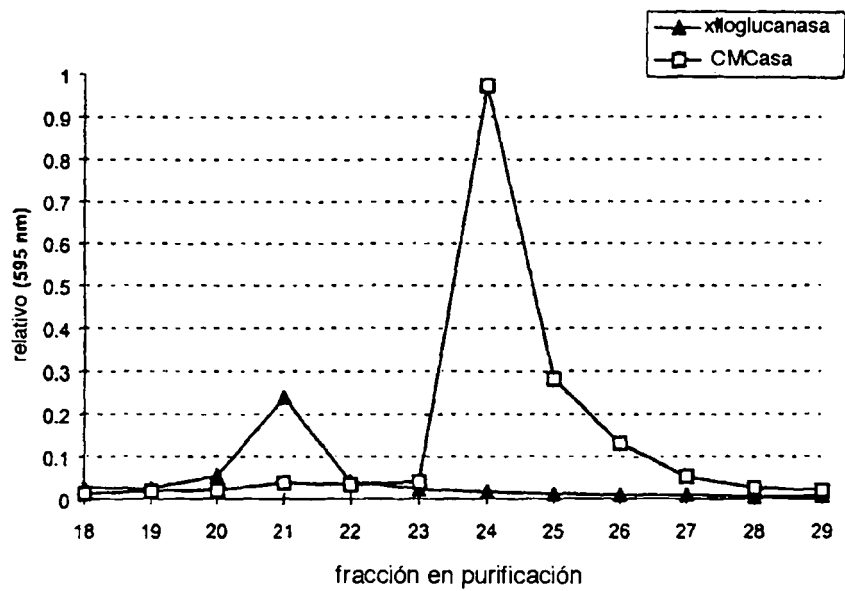


Fig. 2

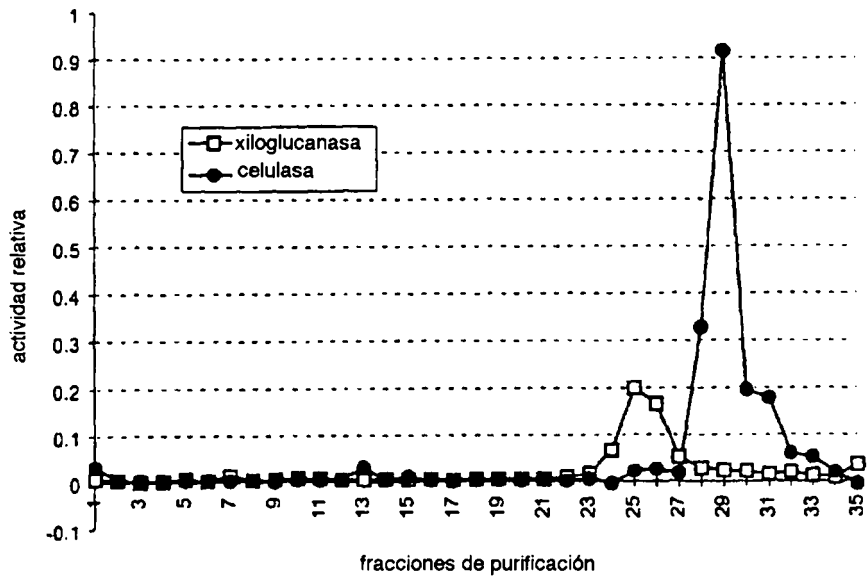


Fig. 3

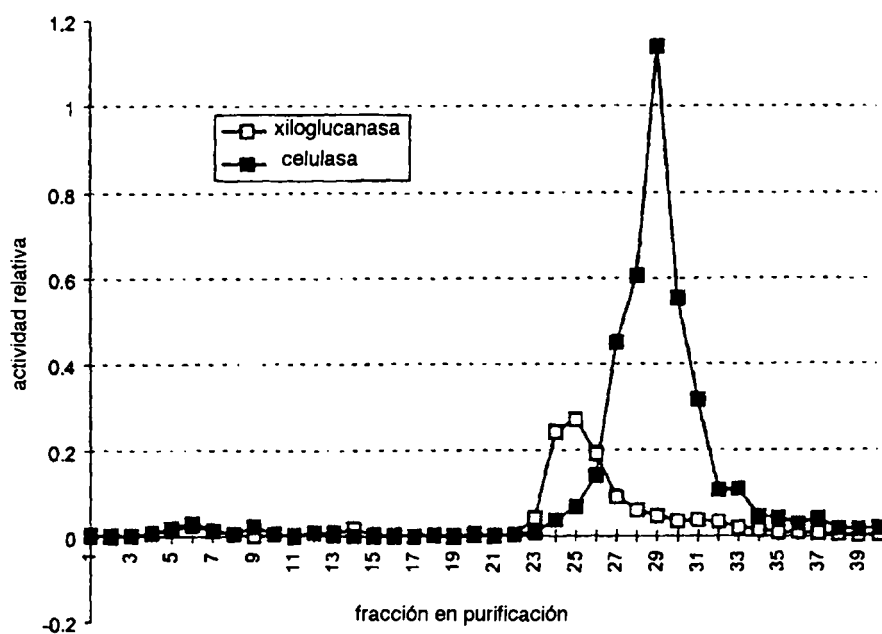


Fig. 4

# ES 2 265 960 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> Novozymes A/S

5 <120> Xiloglucanasa de *Malbranchea*

<130> 5929.205-EP

10 <160> 2

<170> PatentIn versión 3.3

15 <210> 1

<211> 1109

<212> ADN

<213> *Malbranchea cinnamomea*

20 <220>

<221> CDS

25 <222> (57)..(806)

<220>

<221> mat\_péptido

30 <222> (141)..(806)

<400> 1

gctcaatttc tcgcggcac aactatttagc ctcaacgacc caacgataga gtcgag atg 59  
Met

35

aag gtc gct gtt gca tcc ctt ctc ctt gct tct gcc gtc cca ggc atc 107  
Lys Val Ala Val Ala Ser Leu Leu Leu Ala Ser Ala Val Pro Gly Ile  
-25 -20 -15

40

ttt gcg cag ccc acc ggg agc ctt gag aaa cgg gcc gac ttt tgc ggg 155  
Phe Ala Gln Pro Thr Gly Ser Leu Glu Lys Arg Ala Asp Phe Cys Gly  
-10 -5 -1 1 5

45

caa tgg gac tcc gaa cag agc ggc ccg tat att gtc tac aat aat ctc 203  
Gln Trp Asp Ser Glu Gln Ser Gly Pro Tyr Ile Val Tyr Asn Asn Leu  
10 15 20

50

tgg aat atg ggc aca ggt acg ggc tcg cag tgc acg gga gtc gac ggc 251  
Trp Asn Met Gly Thr Gly Thr Gly Ser Gln Cys Thr Gly Val Asp Gly  
25 30 35

55

att gat ggc tcg acg ctg gcg tgg cac acc agc tgg tcc tgg tcg gga 299  
Ile Asp Gly Ser Thr Leu Ala Trp His Thr Ser Trp Ser Trp Ser Gly  
40 45 50

60

65

## ES 2 265 960 T3

```

    ggg caa ggc caa gtc aag tcc tac gca aat gcc gtc ctt gca gac att      347
    Gly Gln Gly Gln Val Lys Ser Tyr Ala Asn Ala Val Leu Ala Asp Ile
        55                      60                      65

5   gtc tcc aac cca cgc gcc atc tcc gac att aac agc atc ccc tcg acc      395
    Val Ser Asn Pro Arg Ala Ile Ser Asp Ile Asn Ser Ile Pro Ser Thr
        70                      75                      80                      85

10  tgg cgc tgg agc tac agc ggc agc tct ctc gtc gcc aac gtc gca tac      443
    Trp Arg Trp Ser Tyr Ser Gly Ser Ser Leu Val Ala Asn Val Ala Tyr
                90                      95                      100

15  gac ctc ttt acc tcc tcc agc ccc tcg ggc tcc gag gag tac gag gtg      491
    Asp Leu Phe Thr Ser Ser Ser Pro Ser Gly Ser Glu Glu Tyr Glu Val
                105                      110                      115

20  atg atc tgg ctc gca gca ctg ggc gcc gcg gcc ccc atc tct gag aca      539
    Met Ile Trp Leu Ala Ala Leu Gly Gly Ala Gly Pro Ile Ser Glu Thr
                120                      125                      130

25  gga tcg ccg att gcg aac ccc acg gtt gcg ggg gtc aat tgg aat ttg      587
    Gly Ser Pro Ile Ala Asn Pro Thr Val Ala Gly Val Asn Trp Asn Leu
                135                      140                      145

30  ttc gag ggg tac aac ggc aac atg cac gtg tac agc ttc gtg gct gcg      635
    Phe Glu Gly Tyr Asn Gly Asn Met His Val Tyr Ser Phe Val Ala Ala
    150                      155                      160                      165

35  ggt gga agt gtt gag aat ttc agt ggg gac ttg aag gat ttc ttg aac      683
    Gly Gly Ser Val Glu Asn Phe Ser Gly Asp Leu Lys Asp Phe Leu Asn
                170                      175                      180

40  tat ttg ggg agc gag cag ggg atg gac cag agc cag tat gtg atc aat      731
    Tyr Leu Gly Ser Glu Gln Gly Met Asp Gln Ser Gln Tyr Val Ile Asn
                185                      190                      195

45  att ggc gcg gga aca gag ccg ttt agt ggt aat aat gcc gtc ttc acc      779
    Ile Gly Ala Gly Thr Glu Pro Phe Ser Gly Asn Asn Ala Val Phe Thr
                200                      205                      210

50  act tct gcg tat agc gtc cag gtt caa tagagaccgt tgccgagggc      826
    Thr Ser Ala Tyr Ser Val Gln Val Gln
        215                      220

55  aacgggatct gaagcgagtg accacgaccg gaaagattgg atgagagtga gttgtacgaa      886
    agagttttgc gaatgcaggg aaaagatccg ctcgtggaga acccttctgc attcattcag      946
    tgcacttcaa atatctgtca tgagatatgt tgtaaatac gatgtatcag tccaggtcac      1006
    acgcttcatg tgccgagag catcgtaaat caactttttt agctcttttg ctcgccc aaa      1066
    aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaa      1109

55  <210> 2
    <211> 250
    <212> PRT
60  <213> Malbranchea cinnamomea

    <400> 2

65  Met Lys Val Ala Val Ala Ser Leu Leu Leu Ala Ser Ala Val Pro Gly
        1                      5                      10                      15

```

