

(11) Número de Publicação: **PT 854190 E**

(51) Classificação Internacional:

C12N 15/56 (2006.01) **C12N 9/42** (2006.01)

D06M 16/00 (2006.01) **C11D 3/386** (2006.01)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: **1997.11.24**

(30) Prioridade(s): **1996.11.25 FI 964691**

(43) Data de publicação do pedido: **1998.07.22**

(45) Data e BPI da concessão: **2007.08.01**
110/2007

(73) Titular(es):

AB ENZYMES GMBH

FELDBERGSTRASSE 78 64293 DARMSTADT DE

(72) Inventor(es):

ARJA SISKI KAARINA MIETTINEN-OINONEN

MINNA JOHANNA ELOVAINIO

PIRKKO LIISA SUOMINEN

FI

FI

FI

(74) Mandatário:

MANUEL ANTÓNIO DURÃES DA CONCEIÇÃO ROCHA

AV LIBERDADE, Nº. 69 1250-148 LISBOA

PT

(54) Epígrafe: **COMPOSIÇÃO DE CELULASE APERFEIÇOADA PARA O TRATAMENTO DE
MATÉRIAS TÊXTEIS COM CELULOSE**

(57) Resumo:

RESUMO**"COMPOSIÇÃO DE CELULASE APERFEIÇOADA PARA O TRATAMENTO DE
MATÉRIAS TÊXTEIS COM CELULOSE"**

A presente invenção refere-se a uma nova composição de celulase para o tratamento e acabamento de têxteis que contenham celulose. O aperfeiçoamento das propriedades da composição de celulase baseia-se no teor elevado de um componente do tipo da endoglucanase EGII numa composição que, de outro modo, é constituída completamente por celulase. Quando a composição com teor elevado em EGII é utilizada, consegue-se melhorar as propriedades da cor, aumentar a leveza, melhorar o aspecto visual e reduzir a tendência para formar borbotos. Quanto à resistência, as matérias têxteis permanecem essencialmente inalteradas face a composições de celulase previamente utilizadas.

DESCRIÇÃO**"COMPOSIÇÃO DE CELULASE APERFEIÇOADA PARA O TRATAMENTO DE
MATÉRIAS TÊXTEIS COM CELULOSE"**

A presente invenção dirige-se a métodos para o tratamento e acabamento de matérias têxteis com celulose através de uma composição de celulase que possua um teor de celulase tipo EGII elevado mínimo de 15 por cento em peso, em comparação com um meio completo que contenha 45-80% de CBHI, 10-25% de CBHII, 5-15% de EGI e 8-15% de EGII. A composição de celulase referida pode obter-se de uma estirpe com sobreprodução de EGII, em que a composição de células possui uma proporção de EG:CBH de 0,6:1 e uma proporção de CBHI:EG de 1-1,4:1, ou através da adição de EGII ao meio completo.

O tratamento com celulase de matérias têxteis com celulose, durante ou seu fabrico ou acabamento, é ele próprio conhecido neste domínio. O tratamento enzimático para acabamento de matérias têxteis com celulose é denominado bioacabamento. O bioacabamento tem sido utilizado para remover todos os tipos de impurezas e fibras soltas individuais salientes da superfície do têxtil. Os principais benefícios conferidos pelo bioacabamento com celulases são a melhoria permanente da formação de borbotos, uma estrutura superficial mais limpa devido à redução da formação de felpe, a melhoria do manuseamento do têxtil, que se torna mais suave e

macio, com um toque mais sedoso, a melhoria do cair do têxtil, cujas cores passam a ser mais brilhantes, assim como uma capacidade maior de absorver humidade.

Além disso, as celulases foram utilizadas para dar a gangas um aspecto gasto (*stone-washed*). A biodegradação completa das celulases é uma vantagem do tratamento com estas enzimas que, em consequência, se salientam como alternativa favorável ao ambiente para o tratamento químico.

Os conhecimentos anteriores mais próximos, apresentados no documento WO 94 07983, expõem a purificação de EGII e uma experiência em que a EGII (8-10 por cento em peso) é testada quanto à sua capacidade de dar um aspecto *stone-washed* a tecidos de ganga. A conclusão da experiência é que o teor total de EG deve ser aumentado e o teor de CBH diminuído.

A perda de resistência do tecido é um problema associado ao tratamento com celulase. Esta perda de resistência é causada pela hidrólise induzida pela celulase das ligações beta-1,4-glicosídicas da celulose que, por sua vez, resultam na degradação parcial do polímero celulósico e, desta feita, podem resultar na perda de resistência do tecido.

No tratamento de tecidos, é geralmente empregada a celulase derivada de fungos, como *Trichoderma reesei*,

sendo esta celulase composta por componentes do tipo da celobiohidrolase (CBH), endoglucanase (EG) e beta-glucosidase (BG). Os componentes CBH e EG podem ainda ser divididos nos tipos CBHI e CBHII e em vários tipos de EG, cujos principais são EGI e EGII. Os componentes BG não reagem com polímeros celulósicos, mas clivam novamente os produtos de degradação, por exemplo, a celobiose, que são formados em resultado do efeito sinérgico dos componentes CBH e EG.

O isolamento dos componentes de celulase a partir de fungos é conhecido neste domínio. Veja-se, por exemplo, Bhikhabhai, R. *et al.*, (1984), Saloheimo, M., *et al.*, (1988), Wood *et al.*, (1988), Bhat, K.M. *et al.*, (1989) and Schulein (1988).

Um método para tratar tecidos de algodão com solução de celulase, antes da coloração e do acabamento, para remover pêlo e fibras soltas à superfície e, desta forma, conferir-lhe melhor aspecto, é exposto na Patente dos EUA Nº 5 232 851. A celulase empregada pode ser produzida, por exemplo, pelas espécies *Trichoderma reesei*, *T. koningii*, *Penicillium sp* ou *Humicola insolens*. Nos exemplos apresentados utilizou-se CYTOLASE 123-celulase (Genencor Int.), sem que a publicação indicasse a composição detalhada. Além da celulase, a solução de celulase pode conter tampões, surfactantes, agentes abrasivos e outros similares. Após o tratamento, declarou-se que a resistência à tracção do tecido de

algodão era pelo menos 50% da resistência à tracção do tecido não tratado.

A composição original de celulase que se pode obter a partir do meio de fermentação, que é derivada directamente dos microrganismos, por exemplo de fungos *T. reesei*, raras vezes é a adequada para proporcionar resultados desejáveis. A composição original de celulose pode incluir cerca de 45-80% de CBHI, 10-25% CBHII, 5-15% de EGI e 8-15% de EGII do teor proteico total em celulase. As inter-relações dos componentes CBH e EG podem assim ser alteradas por diversos métodos conhecidos pelos especialistas neste campo. Tais métodos incluem, por exemplo, a fraccionamento e a engenharia genética.

A Patente dos EUA N° 5 120 463, por exemplo, expõe uma composição de um detergente constituída por um surfactante e, além disso, 0,002 a 10 por cento, em peso, de celulase composta por componentes dos tipos CBHI e EG em que a proporção de CBHI para (EGI + EGII) é $\geq 10:1$.

O Pedido de Patente Internacional WO 93/22428 expõe um método para tratar tecidos de algodão com composições de celulase fúngica constituídas por componentes dos tipos CBHI e EG, sendo a sua proporção, em peso, superior a 10:1. O pedido menciona que a resistência à tracção do tecido tratado é pelo menos 50 por cento da resistência à tracção do tecido não tratado. Contudo, não são fornecidos resultados de testes.

Na Publicação de Patente Internacional WO 94/23113, é descrito um método para tratar durante o fabrico tecidos celulósicos, com e sem algodão, para reduzir a geração de pêlo. As composições de celulase contêm componentes de todos os tipos de EG e componentes de todos os tipos de CBH, numa proporção superior a 5:1.

Na Publicação de Patente Internacional WO 92/06221, declara-se que os tecidos com algodão tratados com uma solução de celulase essencialmente isenta de componentes de celulase do tipo CBHI apresentam menor perda de resistência do que os tecidos tratados com uma solução de celulase com composição completa da enzima.

As celulases foram também empregadas no acabamento de tecidos ou peças de vestuário de ganga para lhes conferir um aspecto stone-washed.

A lavagem "stone-wash" era tradicionalmente realizada com a chamada pedra-pomes. Contudo, o uso de pedra-pomes causa vários problemas de lavagem, como o peso do manuseamento das pedras, o labor despendido na sua recolha à mão de entre as peças de vestuário, o desgaste significativo das máquinas, com os resultantes custos elevados de reparação e investimento, a crescente quantidade de resíduos provocados pelas pedras partidas e, além disso, o acesso complicado à própria pedra-pomes,

pois a sua extracção é proibida nalguns países por motivos ambientais.

É exposto um método para conferir um aspecto stone-washed a peças de vestuário de ganga com recurso a enzimas de celulase, por exemplo, na Patente dos EUA N° 4 832 864. Também neste caso o problema é o enfraquecimento, ou seja, a perda de resistência da ganga em resultado do tratamento enzimático único empregado para conferir um aspecto stone-washed ao tecido.

Sabe-se também neste domínio que a actividade da composição de celulase depende da acidez do meio em que o tratamento é realizado. No geral, a actividade é máxima a pH ligeiramente ácido, ainda que possam também ser utilizadas composições que funcionem em ambiente neutro, sabendo-se mesmo que tais composições de celulase actuam em condições alcalinas. Contudo, as composições utilizadas em meio neutro ou alcalino possuem um tempo de reacção prolongado, ou seja, as composições actuam mais devagar. Visto que tempo é dinheiro, os tratamentos morosos não são apenas menos rentáveis em termos de tempo, como também em termos de custos. Por outro lado, é necessário mais equipamento para tratar a mesma quantidade de tecidos ao mesmo tempo. Isto é também dispendioso e requer mais espaço e instalações. Naturalmente, são utilizados os tampões conhecidos daqueles com conhecimentos neste domínio para ajustar a

acidez do meio de tratamento com celulase, mas estes não resolvem todos os problemas.

O problema de se obter melhores propriedades de retenção/recuperação da cor, assim como melhores propriedades de maciez e toque e aspecto visual dos tecidos de algodão foi discutido em diversas patentes e pedidos de patente.

Na Patente dos EUA N° 5 090 474, por exemplo, é descrita uma composição de detergente que contém EGIII substancialmente pura. A composição não contém mais do que 5 por cento em peso de componentes de tipo CBHI.

A Publicação de Patente Internacional WO 92/062210 descreve uma composição de celulase enriquecida com componentes de tipo da endoglucanase não especificados. A proporção de componentes de tipo EG para todos os componentes de tipo CBHI é superior a 5:1. Afirma-se que a composição confere melhores propriedades de maciez, assim como melhores propriedades de retenção/recuperação à composição de detergente quando utilizada em meios de lavagem ácidos, neutros ou alcalinos.

A Patente dos EUA N° 5 246 853 expõe um método aperfeiçoado para tratar tecidos com algodão com composições de celulase fúngica essencialmente isentas de componentes de celulase de tipo CBHI, mas que contenham pelo menos 10% de componentes não especificados de tipo

EG com base no peso total de proteínas na solução de celulase.

Na Publicação de Patente Internacional WO 92/06165 é exposta uma composição de celulase que contém 0,01 a 5 por cento, em peso, de componentes de celulase. As composições contêm um ou mais componentes de tipo EG não especificados e, de todos os componentes de celulase, menos de 5 por cento, em peso, consistem em componentes de tipo CBHI.

A Publicação de Patente Internacional WO 95/25840 descreve uma composição de celulase essencialmente isenta de componentes de celulase de tipo CBHI e que possui uma proporção em peso de todos os componentes de tipo EG para todos os componentes de tipo CBHI superior a 5:1. O referido Pedido de Patente Internacional corresponde à Patente dos EUA N° 5 525 507, que expõe uma composição útil para o tratamento de material sem algodão. A composição é essencialmente isenta de todos os componentes de celulase de tipo CBHI e o aperfeiçoamento das propriedades obtém-se modificando a composição fúngica completa natural pela adição de pelo menos 10 por cento de componentes de endoglucanase não especificados. A Publicação de Patente Internacional WO 92/17572 descreve uma composição de celulase essencialmente isenta de componentes de celulase de tipo CBHI e que contém pelo menos 20 por cento em peso de componentes de tipo EG não especificados. A Publicação de Patente Internacional WO

92/17574 descreve uma composição de celulase que contém um ou mais componentes de EG não especificados e um ou mais componentes de CBHI e em que a proporção de todos os componentes de EG para todos os componentes de CBHI é superior a 5:1. O Pedido de Patente Internacional WO 94/07983 expõe a EGII purificada e o seu uso no tratamento de matérias têxteis.

À luz do que foi dito até aqui, o principal problema da utilização de composições de celulase no tratamento e acabamento de matérias têxteis com celulose não tem sido apenas a perda de resistência do tecido em resultado do tratamento com celulase, mas também o facto de não se terem alcançado alterações significativas nas propriedades de bioacabamento mesmo com a variação subtil das proporções dos componentes de CBH e EG, conforme foi sugerido em patentes e pedidos de patente anteriores neste domínio. É como se diferentes proporções dos componentes de tipo CBH e EG tivessem sido variadas mais ou menos ao acaso e os resultados, como a remoção de impurezas e extremidades de fibras soltas individuais que sobressaem da superfície do tecido, se obtivessem de forma igualmente aleatória. Os principais benefícios reivindicados pelas patentes e pelos pedidos de patente utilizando diferentes proporções dos componentes de tipo EG e CBH em termos de bioacabamento, ou seja, a melhoria permanente em termos da formação de borbotos, uma estrutura superficial mais limpa devido à redução da formação de felpe, a melhoria do manuseamento do tecido,

que se torna mais suave e macio, com um toque mais sedoso, a melhoria do cair do têxtil, cujas cores passam a ser mais brilhantes, assim como uma capacidade maior de absorver humidade, parecem permanecer inalteradas, no essencial, mesmo quando se variam as proporções de EG e CBH. Além disso, a remoção de certos componentes e a adição de outros à composição de celulase completa fúngica não é necessariamente rentável em termos económicos.

Verificámos agora com surpresa que não é a variação das proporções de componentes de CBH e de EG que aperfeiçoa as propriedades no fabrico e acabamento dos têxteis. É o aumento do valor de EGII que é responsável pela melhoria. Obtêm-se resultados iguais ou melhores no fabrico e acabamento logo que se adicionam mesmo pequenas quantidades de componente(s) de tipo EGII a uma composição base de celulose completa natural. Esta melhoria é totalmente independente das proporções de CBH e EG expostas em documentos anteriores neste domínio.

Assim, o objectivo da presente invenção é proporcionar um método para tratar matérias têxteis com celulose.

Em particular, o objectivo da presente invenção é proporcionar um método para tratar matérias têxteis com celulose que não resulte numa perda significativa da sua resistência em virtude do tratamento.

Além disso, o objectivo da presente invenção é proporcionar um método para conferir um aspecto stone-washed aceitável a gangas e peças de vestuário de ganga sem causar uma perda significativa da sua resistência.

Além disso, o método da presente invenção aplica um meio de tratamento aperfeiçoado para matérias têxteis com celulose que pode consistir, além da composição de celulose desta invenção, por exemplo, surfactantes, polímeros, tampões, agentes de volume, conservantes, estabilizantes e/ou agentes abrasivos.

O objectivo da presente invenção é proporcionar um método com um menor tempo de reacção, ou seja, composições que actuem mais rapidamente. Isto significa utilizar procedimentos de tratamento mais rentáveis em termos de tempo e custos e poupar tanto em equipamento como em instalações de tratamento.

O objectivo da presente invenção é proporcionar um método aperfeiçoado de tratar matérias têxteis com celulose de forma a preservar as propriedades de resistência, assim como obter tecido com melhor aspecto e toque mais macio.

Um objectivo muito importante da presente invenção é realizar a produção de forma economicamente mais rentável. A composição utilizada no método da presente invenção é menos dispendiosa por a actividade necessária ser menor, dado que a enzima é mais eficaz do que outras

enzimas. Assim, a quantidade que o meio de tratamento requer é também menor.

Um outro objectivo do método da presente invenção é obter tons de cor agradáveis aos clientes. Demonstrou-se que os tons acinzentados que são especialmente agradáveis à vista e apreciados pelos clientes se podem obter com a composição da presente invenção.

Os objectivos descritos do método da presente invenção foram alcançados empregando uma composição de celulose que contém quantidades elevadas de celulase de tipo EGII, face a composições de celulase completas, conforme é definido nas reivindicações.

A composição de celulase utilizada no método da presente invenção pode obter-se de uma solução de celulase cultivando fungos ou bactérias e recolhendo o caldo ou meio de fermentação exaurido, essencialmente isento de células, contendo os componentes completos do meio de base natural de celulase, como os componentes CBH e EG, mas, acima de tudo, com um teor elevado em componentes EGII, face às composições de celulase completas naturais e às composições de celulase anteriormente publicadas neste domínio com diferentes proporções de CBH e EG. O teor elevado de EGII deve ser tal que se obtenham os efeitos pretendidos. A celulase de tipo EGII será o componente que é essencial para alcançar os benefícios e objectivos da presente invenção.

A presente invenção relaciona-se com um método para tratar matérias têxteis com celulose durante o seu fabrico ou o seu acabamento. O método aplica uma composição de celulose constituída, pelo menos, por um teor elevado de 15 por cento, em peso, de componentes de tipo EGII, em comparação com a composição de celulase completa natural que se pode obter de um meio de fermentação desprovido de células. Quando se utilizam tais composições de celulase com um teor elevado de EGII para o tratamento de tecidos com celulose, os resultados são a melhoria dos efeitos de bioacabamento e/ou aspecto stone-washed, no essencial sem perda de resistência das matérias têxteis em comparação com os resultados que se obtêm com as proporções anteriormente documentadas em composições de celulase naturais completas ou modificadas.

A composição de celulase utilizada no método da presente invenção contém um teor elevado do componente de tipo EGII, face a composições completas e modificadas anteriormente utilizadas. A quantidade de EGII será de pelo menos 15 por cento em peso; de preferência, de pelo menos 20 - 60 por cento em peso e, ainda mais preferível, de pelo menos 25 - 40 por cento, em peso, da composição de celulase. Estima-se que a proporção de EG:CBH em *T. reesei* ALK03529, a estirpe sobreprodutora de EGII, seja de aproximadamente 0,6-1:1 e que a proporção de CBHI:EG seja de cerca de 1-1,4:1.

A composição de celulase utilizada no método da presente invenção obtém-se a partir de fungos ou bactérias, sobretudo de fungos do género *Trichoderma*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Humicola* ou *Fusarium*. A fonte mais preferível da composição de celulase será a espécie *Trichoderma reesei*, sobretudo as estirpes de *Trichoderma reesei* sobreprodutoras de EGII.

No método da presente invenção é utilizado um meio de tratamento aperfeiçoado (composição) para tratar matérias têxteis com celulose. O referido meio de tratamento contém ainda a composição de celulase aperfeiçoada com maior quantidade de celulase de tipo EGII do que as composições de celulase completas naturais e não completas modificadas referidas em documentação anterior neste campo. O meio de tratamento que contém celulase não só confere melhores propriedades durante o fabrico e acabamento às matérias têxteis com celulose, como também a mesma ou menor perda de resistência do que as matérias com celulose tratadas nas mesmas condições com composições de celulase desprovidas de um teor elevado em EGII.

O meio de tratamento é útil no bioacabamento de matérias têxteis com celulose e para conferir um aspecto stone-washed a tecidos ou peças de vestuário em ganga. O referido meio contém surfactantes, polímeros, tampões,

agentes de volume, conservantes, estabilizantes e/ou agentes abrasivos.

A presente invenção relaciona-se com um método para tratar matérias têxteis com celulose, em que o meio acima definido é utilizado para o tratamento ou acabamento de matérias têxteis com celulose. As referidas matérias têxteis modificáveis, com celulose, são algodão, linho, alinhados, cânhamo, rami, juta, viscose, Polynosic, Modal, lyocell, Cupro, etc.

A Figura 1 mostra o mapa do plasmídeo de pALK537.

A Figura 2 mostra o mapa do plasmídeo de pALK540.

A Figura 3 mostra o mapa do plasmídeo de pALK546.

A Figura 4 mostra o mapa do plasmídeo de pALK543.

A Figura 5 mostra a claridade dos tecidos de ganga após 1 hora de tratamento em Launder-Ometer com uma preparação de celulase de VTT-D-79125 e com uma preparação de celulase de VTT-D-79125 adicionada a diferentes quantidades de celulases purificadas de *Trichoderma*.

A Figura 6 mostra a claridade dos tecidos de ganga após 2 horas de tratamento em Launder-Ometer com uma preparação de celulase de VTT-D-79125 e com uma preparação de celulase de VTT-D-79125 adicionada a diferentes quantidades de celulases purificadas de *Trichoderma*.

A Figura 7 mostra a remoção de borbotos de tecidos de algodão após 1 hora de tratamento em Launder-Ometer com

diferentes dosagens de preparações de celulase de VTT-D-79125, ALKO3760, ALKO3798, ALKO4097, ALKO2656, ALKO3529 e ALKO3528.

Na descrição que se segue recorre-se amplamente a diversos termos usados na indústria têxtil e na tecnologia enzimática, assim como na tecnologia de ADN recombinante. De forma a permitir uma compreensão clara e consistente da especificação e das reivindicações, incluindo o âmbito a atribuir a tais termos, apresentamos as seguintes definições.

Matérias têxteis ou tecidos com celulose. O termo «matérias têxteis ou tecidos com celulose», tal como é utilizado na presente invenção, refere-se a matérias têxteis compostas apenas ou em parte de fibras celulósicas. A matéria têxtil inclui fibra, fio, tecido, tecido de malha ou peça de pronto-a-vestir em cujo fabrico se utilizou como matéria-prima algodão, linho, alinhado, cânhamo, rami, juta ou fibras celulósicas artificiais, como viscose Polynosic, Modal, lyocell (ou seja, Tencel®), Cupro, etc. Quando se utilizam fibras artificiais sintéticas, a quantidade de fibra celulósica na matéria têxtil tem de ser pelo menos de 30 por cento, de preferência acima de 50 por cento.

Composição de celulase completa. O termo «composição de celulase completa», tal como aqui é utilizado, refere-se a celulasas derivadas de fungos, por exemplo, de

Trichoderma reesei. Tais celulasas serão compostas de componentes do tipo celobiohidrolase (CBH), endoglucanase (EG) e beta-glucosidase (BG). Os componentes CBH e EG podem ainda ser divididos nos tipos CBHI e CBHII e em vários tipos de EG, cujos principais são EGI e EGII. Os componentes BG não reagem com polímeros celulósicos, mas clivam novamente os produtos de degradação, por exemplo, a celobiose, que são formados em resultado do efeito sinérgico dos componentes CBH e EG. Como exemplo típico de tais estirpes de *Trichoderma reesei*, é utilizada na presente invenção a estirpe VTT-D-79125.

A composição de celulase original que se obtém do meio de fermentação derivado directamente dos microorganismos, como de fungos *T. reesei* cuja composição de celulase contém cerca de 45-80% de CBHI, 10-25% de CBHII, 5-15% de EGI e 8-15% de EGII do teor total de proteína de celulase, é considerada como a composição de celulose completa, de acordo com a presente invenção. Estima-se que a proporção de EG:CBH em *T. reesei* ALK03529, a estirpe sobreprodutora de EGII, seja de aproximadamente 0,6-1:1 e que a proporção de CBHI:EG seja de cerca de 1-1,4:1.

Composição de celulase modificada. O termo «composição de celulose modificada», tal como aqui é utilizado, refere-se a uma composição de celulase completa em que as inter-relações dos componentes CBH e EG contidos numa composição foram alteradas por diversos métodos

conhecidos pelos especialistas neste campo. Tais métodos incluem, por exemplo, a fraccionamento e a engenharia genética, assim como a combinação de diferentes soluções de celulase.

Essencialmente isento de componentes de tipo CBH significa que pelo menos um componente de tipo CBH seleccionado de entre um grupo que consiste em CBHI, CBHII ou ambos está ausente da composição de celulase, ou seja, a referida composição é produzida por um hospedeiro a que são removidos os genes que codificam as ditas proteínas.

Essencialmente isento de componentes de tipo EG significa que pelo menos um componente de tipo EG seleccionado de entre um grupo que consiste em EGI, EGIII, EGV, ou todas ou qualquer combinação das referidas proteínas de EG está ausente, ou seja, a referida composição é produzida por um hospedeiro a que é removido um ou mais genes que codificam as ditas proteínas.

O termo **Componentes de celulase de tipo EGII de concentração ou quantidade elevada** significa que a composição de celulase contém, pelo menos, por 15-100 por cento em peso, de preferência, por pelo menos 20 - 60 por cento em peso e, ainda mais preferivelmente, por pelo menos 25 - 40 por cento, em peso, em celulase de tipo EGII, do peso total de proteínas de celulase.

Biostoning. «*Biostoning*» do tecido ou peça de vestuário significa que são utilizadas em enzimas ou em vez de pedra-pomes, ou em conjunto com esta, para o tratamento do tecido ou peça de vestuário, em particular em ganga.

Bioacabamento. «Bioacabamento» refere-se à utilização de enzimas numa hidrólise controlada de fibras celulósicas para modificar o tecido ou superfície do fio de forma a prevenir formação permanente de borbotos, melhorar o manusear do tecido, como a sua suavidade e maciez, limpar a estrutura superficial reduzindo a formação de felpo, que resulta na clarificação das cores, melhorar o cair do têxtil, aperfeiçoar a capacidade de absorver humidade e que pode também melhorar a facilidade de tingimento.

Backstaining. O corante libertado tem tendência a voltar a depositar-se à superfície das fibras do tecido. Este efeito designa-se «*backstaining*».

Detergente. Por detergente entende-se um agente de limpeza que pode conter agentes tensioactivos (surfactantes aniónicos, não iónicos, catiónicos e anfóliticos), adjuvante para detergente e outros ingredientes opcionais, como agentes de anti-redeposição e suspensão de sujidade, abrilhantadores ópticos, agentes branqueadores, corantes e pigmentos e hidrolases. A listagem adequada do conteúdo dos detergentes é indicada na Patente dos EUA N° 5 433 750, sendo a listagem

adequada de surfactantes indicada na Patente dos EUA N° 3 664 961.

Preparação enzimática. Por «preparação enzimática» entende-se uma composição que contenha enzimas. De preferência, as enzimas foram extraídas de (quer parcialmente ou completamente purificadas de) um microrganismo ou do meio utilizado para cultivar o referido microrganismo.

«Extraído de» significa que as enzimas pretendidas são separadas da massa celular. Isto pode ser efectuado por qualquer método que alcance este objectivo, incluindo a degradação das células e também a simples remoção do meio de cultura das células exauridas. Por conseguinte, o termo «preparação enzimática» inclui as composições que contenham meio previamente utilizado para cultivar o(s) microrganismo(s) pretendido e quaisquer enzimas que tenham sido libertadas pelas células microbianas no referido meio durante a cultura ou os passos de processamento a jusante.

Por hospedeiro **«substancialmente incapaz»** de sintetizar uma ou mais enzimas entende-se um hospedeiro em que a actividade de uma ou mais das enzimas listadas está diminuída, deficiente ou ausente face ao tipo selvagem. Por uma sequência de aminoácidos que é **«equivalente»** a uma sequência de aminoácidos específica entende-se uma sequência de aminoácidos que não é idêntica à sequência

de aminoácidos específica, mas que, ao invés disso, contém pelo menos algumas alterações de aminoácidos (deleções, substituições, inversões, inserções, etc.) que não afectam essencialmente a actividade biológica da proteína face a uma actividade similar da sequência de aminoácidos específica quando é utilizada para o fim pretendido. A actividade biológica de uma celulase é a sua actividade catalítica e/ou a sua capacidade de se ligar a material celulósico. De preferência, uma sequência de aminoácidos «equivalente» contém pelo menos 80%-99% de identidade, em termos de aminoácidos, relativamente à sequência de aminoácidos específica; preferivelmente, contém pelo menos 90%, sendo particularmente preferível que a identidade quanto a aminoácidos seja de pelo menos 95%.

Veículo de clonagem. Um veículo de clonagem é um plasmídeo ou fago de ADN ou outra sequência de ADN (como ADN linear) que proporcione um ambiente transportador de ácido nucleico apropriado para a transferência de um gene de interesse para uma célula hospedeira. Os veículos de clonagem da invenção podem ser concebidos para se replicar autonomamente em hospedeiros procarióticos e eucarióticos. No geral, em hospedeiros fúngicos como *Trichoderma*, os veículos de clonagem não se replicam autonomamente; ao invés, proporcionam meramente um veículo para o transporte do gene de interesse para o hospedeiro *Trichoderma* para subsequente inserção no genoma deste hospedeiro. O veículo de clonagem pode ser

ainda caracterizado por um ou um pequeno número de locais de reconhecimento de endonuclease onde tais sequências de ADN podem ser cortadas de uma determinada forma sem perda de função biológica essencial do veículo, e em que o ADN pode ser *spliced* para realizar a replicação e clonagem do dito ADN. O veículo de clonagem pode conter ainda um marcador apropriado para utilizar na identificação de células transformadas com mesmo veículo. Os marcadores, por exemplo, são resistentes a antibióticos. Em alternativa, tais marcadores podem ser fornecidos num veículo de clonagem separado daquele que transporta o gene de interesse. A palavra «vector» por vezes utilizada para «veículo de clonagem».

Veículo de expressão. Um veículo de expressão é um veículo de clonagem ou vector semelhante a um veículo de clonagem mas que é capaz de expressar um gene de interesse, após transformação em hospedeiro pretendido. Quando se utiliza um hospedeiro fúngico, o gene de interesse é de preferência fornecido ao hospedeiro fúngico como parte de um veículo de clonagem ou de expressão que se integra nos cromossomas fúngicos ou que permite que o gene de interesse se integre nos cromossomas do hospedeiro. As sequências que formam parte do veículo de clonagem ou veículo de expressão podem também ser integradas com o gene de interesse durante o processo de integração. Em *T. reesei*, os locais de integração para os quais se pode vocacionar o gene de interesse incluem os locais *cbh* e/ou *egl*. Mais preferível

é que o gene de interesse esteja vocacionado para substituir um ou mais genes que codifiquem características indesejáveis.

O gene de interesse é também, de preferência, colocado sob o controlo (ou seja, ligado operacionalmente) de certas sequências de controlo, como sequências promotoras proporcionadas pelo vector (que são integradas com o gene de interesse). Em alternativa, as sequências de controlo podem ser as do local de inserção.

As sequências de controlo da expressão de um vector de expressão variam consoante o vector está concebido para expressar um dado gene num hospedeiro procariótico ou eucariótico (por exemplo, um vector *shuttle* pode transportar um gene para selecção em hospedeiros bacterianos). As sequências de controlo da expressão podem conter elementos de regulação da transcrição, como promotores, elementos reforçadores e sequências de terminação da transcrição, e/ou elementos de regulação da tradução, como, por exemplo, locais de iniciação e terminação da tradução.

Descrição geral da invenção

No fabrico ou no acabamento de matérias têxteis com celulose, verificou-se inesperadamente que com a utilização de uma composição de celulase constituída por uma maior quantidade de componente de celulase de tipo

EGII numa composição de celulase completa, de outra forma natural, se conseguia produzir um produto têxtil com celulose dotado, essencialmente, das mesmas ou de melhores propriedades. A matéria têxtil com algodão apresentava ainda melhor aspecto e toque e exibiu uma tendência reduzida para formar borbotos, mantendo ainda a sua resistência. Também gangas e peças de vestuário de ganga tratadas com a composição de celulase com quantidades elevadas de EGII alcançaram o mesmo ou melhor aspecto stone-washed do que as composições de celulase completas naturais e modificadas.

Para obter os melhores resultados da presente invenção durante o fabrico e acabamento, a composição de celulase ou meio de tratamento contendo as composições devem possuir um teor em EGII mais ou menos elevado.

Demonstrou-se que o uso da composição de celulase da presente invenção permite alcançar melhor aspecto, maciez, cair, absorção de humidade e cores mais brilhantes em matérias têxteis com celulose. Além disso, obtém-se uma redução da formação de borbotos e felpo. Mais, a composição de celulase desta invenção pode ser utilizada no acabamento das chamadas gangas para criar um melhor aspecto designado stone-washed.

Pode utilizar-se fungos e bactérias como material de fonte para a produção da composição de celulase da presente invenção. De preferência, as composições de

celulase desta invenção são derivadas a partir de fungos, por exemplo de espécies do género *Trichoderma*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Humicola* ou *Fusarium*, sendo *Trichoderma reesei* os fungos de preferência para a produção da composição de celulase. De acordo com os conhecimentos anteriores na matéria, as composições de celulase completas naturais contendo componentes de CBH e vários componentes de EG não são aplicáveis ao tratamento de matérias têxteis com celulose para a produção do resultado final pretendido. Os métodos sugeridos para a produção de composições modificadas para dar diferentes proporções de CBH para EG não são necessários para alcançar os resultados pretendidos. O único aspecto necessário para obter os resultados desejados é um teor elevado de EGII na composição base de celulose completa.

Quando se utiliza outra estirpe de *Trichoderma* para obter a composição de celulase, é possível, de forma similar, modificar as proporções dos tipos de celulase produzidos pela estirpe empregada, produzindo celulases funcionalmente correspondentes às produzidas por *Trichoderma* e adicionando uma quantidade adequada de EGII, o que dá o resultado pretendido.

Para que o resultado seja bom e o pretendido, é essencial que a composição de celulase contenha uma quantidade mais ou menos significativamente maior de endoglucanases de tipo EGII de *Trichoderma*. Se a composição de celulase for derivada de *Trichoderma*, a composição de celulase da

presente invenção contém, além do teor elevado em EGII, componentes de EGI e possivelmente outras quantidades menores de EG, tal como EGIII e EGV, assim como componentes CBHI e talvez CBHII, mas os referidos componentes mais ou menos indesejáveis EG e CBH, cuja proporção não é particularmente importante, podem também ser removidos por técnicas convencionais de recombinação e fraccionamento. Estima-se que a proporção de EG:CBH em *T. reesei* ALK03529, a estirpe sobreprodutora de EGII, seja de aproximadamente 0,6-1:1 e que a proporção de CBHI:EG seja de cerca de 1-1,4:1.

O teor elevado em EGII pode ser fornecido em composições de celulase com uma proporção relativa de CBHI ou EGI para outros componentes aumentada ou diminuída por métodos conhecidos, por si, neste domínio técnico, mas tal como analisámos acima tal não é um pré-requisito para se obterem os resultados desejados. Na composição de celulase da presente invenção, as proporções dos pesos dos componentes de CBH e EG não são cruciais. É mais importante que a quantidade de componentes de tipo EGII na composição seja mais ou menos significativamente elevada acima do nível normal em composições de celulase completas. Isto significa que a proporção de EGII deve ser de pelo menos 15 por cento em peso do peso total da composição completa de proteínas de celulase. Mais preferivelmente, a quantidade de EGII será de pelo menos 20-60 por cento em peso e, ainda mais preferível, de pelo menos 25-40 por cento, em peso, da composição de

celulase. Naturalmente, a composição de celulase pode conter quase em 100 por cento em peso de EGII no teor total de celulase, mas esta não é toda a formulação preferida e não é necessariamente requerida para obter os resultados pretendidos. O modo preferencial da presente invenção consiste numa composição base de celulose completa natural com um teor elevado de EGII.

A actividade enzimática é um conceito aplicado na determinação das propriedades das enzimas. As actividades enzimáticas utilizadas no presente pedido de patente são ECU, FPU e MUL, definidas da forma que se segue:

ECU

A endo-1,4-betaglucanase presente na amostra hidrolisa o substrato hidroxietilcelulose e os açúcares redutores daí resultantes são analisados por espectrofotometria utilizando um reagente de ácido dinitrosalicílico (DNS). Define-se uma unidade de endo-1,4-betaglucanase como a quantidade de enzima que produz uma nmol de açúcares redutores, como glicose, por segundo ($1 \text{ ECU} = 1 \text{ ncat}$), (Bailey M. e Nevalainen, H., 1981).

FPU

A celulase presente na amostra hidrolisa o papel de filtro utilizado como substrato e os açúcares redutores daí resultantes são analisados por espectrofotometria

utilizando um reagente DNS. A actividade de degradação de papel de filtro é descrita em unidades FPU. O cálculo baseia-se na definição de Unidade Internacional (UI). 1 IU = 1 micromol min.⁻¹ de produto formado (açúcares redutores, como glicose) (IUPAC, 1984).

MUL

A celobiohidrolase (CBHI) e a endoglucanase (EGI) presentes na amostra hidrolisam o 4-metilumbeliferil-beta-D-lactosídeo que actua como substrato, libertando-se assim metilumbeliferona, que pode ser medida por espectrofotometria. O método pode ser aplicado à determinação da actividade da celobiohidrolase I (CBHI). O método mede ainda a actividade de endoglucanase I (EGI), cuja proporção pode ser determinada inibindo a actividade da celobiohidrolase utilizando 5 mM de celobiose. Uma unidade MUL é a quantidade de actividade enzimática que, por segundo e nas condições de determinação, liberta 1 nmol de metilumbeliferona de 4-metilumbeliferil-beta-D-lactosídeo (van Tilbeurgh *et al.*, 1988).

O tratamento de matérias têxteis com celulose pela composição de celulase da presente invenção confere aos tecidos um toque macio, não formação de borbotos, e maciez, assim como bom aspecto. As fibras com algodão tratadas com a composição desta invenção mantiveram a sua estrutura tão bem ou melhor do que as tratadas com

composições de celulase que continham as composições de celulase anteriores ou convencionais.

Foi também possível demonstrar que as propriedades de resistência das matérias têxteis com celulose, ou seja, a resistência à rotura, a resistência à quebra e a resistência ao rasgamento permaneceram tão boas como nas matérias têxteis tratadas com as composições anteriormente conhecidas neste domínio, incluindo a composição de celulase completa.

Dado que o efeito pretendido é obtido com tempos de tratamento mais curtos, as propriedades em termos de resistência podem ser ainda melhores do que as composições anteriormente conhecidas.

Os meios de tratamento das matérias têxteis com celulose através de composições expostas na presente invenção podem conter, além de enzimas, por exemplo, surfactantes, polímeros como PVA e PVP, tampões como citratos, acetatos e fosfatos para regular a acidez das soluções, possivelmente agentes de volume, agentes conservantes convencionais, estabilizantes e agentes abrasivos.

A dosagem de produtos de celulase numa solução depende do resultado pretendido, da aplicação, da actividade do produto de celulase, etc. Dosagens adequadas de celulase, conforme expostas na presente invenção, correspondem às dosagens das celulasas líquidas comuns disponíveis no

mercado, como Ecostone L, Ecostone L 20, Biotouch L (*Primalco Ltd*, Biotec, Nurmijärvi, Finlândia). As dosagens adequadas caem assim no intervalo de 0,05 a 15 por cento, de preferência de 0,5 a 6 por cento do peso da matéria têxtil a tratar.

As dosagens adequadas de enzima para efectuar um tratamento de bioacabamento a matérias têxteis dependem do resultado pretendido, do método de tratamento e da actividade do produto enzimático. As dosagens são de cerca de 0,05 a 10 por cento, mais preferivelmente de 0,5 a 5 por cento do peso da matéria têxtil tratada, correspondendo estas às dosagens das celulasas líquidas comuns disponíveis no mercado, como Biotouch L, Biotouch C 601, Ecostone L 20 or Ecostone C 80 (*Primalco Ltd*, Biotec, Nurmijärvi, Finlândia).

Para conferir um aspecto stone-washed a gangas, as composições de celulase desta invenção podem ser empregadas com sucesso para substituir as pedras-pomes. O resultado é um aspecto stone-washed de alta qualidade e essencialmente as mesmas ou melhores propriedades de resistência do que as obtidas em tecidos tratados com os meios de tratamento têxtil que não contêm quantidades elevadas dos componentes de EGII.

As dosagens de enzima adequadas para conferir um aspecto stone-washed ao tecido dependem do resultado pretendido, do método de tratamento e da actividade do produto

enzimático, sendo de cerca de 0,05 a 5 por cento, mais preferivelmente de 0,5 a 2 por cento do peso do tecido tratado, correspondendo estas às dosagens das celulasas líquidas comuns disponíveis no mercado, como Ecostone L, Ecostone L 20, Ecostone L Plus (*Primalco Ltd*, Biotec, Nurmijärvi, Finlândia).

O intervalo de pH para a aplicação da composição de celulase desta invenção depende do perfil de actividade da enzima segundo o pH. Quando se empregam enzimas que funcionam a pH ácido, o pH do ambiente de aplicação estará situado, de preferência, entre 3,5 e 7, mais preferencialmente no intervalo de 4 a 5,5.

A composição de celulase contém quantidades consideráveis de endoglucanases de tipo EGII de *Trichoderma*, podem ser produzidas, por exemplo, por fraccionamento ou mutação da estirpe de produção utilizada ou por engenharia genética. Pode correspondentemente ser preparada uma composição de celulase com quantidades elevadas de endoglucanase de tipo EGII. A forma mais conveniente de produzir um produto com uma quantidade mais elevada de proteína EGII é adicionar cópias do gene que codifica esta proteína à estirpe produtora, por exemplo à estirpe de *Trichoderma*, tal como é descrito no Exemplo 1. A estirpe de *Trichoderma* seleccionada ou outro organismo empregado na produção pode ser uma estirpe selvagem ou uma estirpe mais adequada para utilização como organismo produtor desenvolvida a partir da estirpe selvagem por mutação ou

engenharia genética. Quanto a *Trichoderma reesei*, as estirpes adequadas incluem, por exemplo, a estirpe selvagem *T. reesei* QM6a e as estirpes mutantes dela derivadas, como QM9414 e RutC-30, desenvolvidas para a produção de celulase, e estirpes novamente desenvolvidas a partir destas, em que o nível de, por exemplo, celulase e/ou hemicelulase foi novamente elevado e/ou em que o nível de protease produzida foi reduzido. VTT-D-79125 e ALK02221 (uma estirpe mutante com um baixo nível de produção de protease) e seus derivados, como por exemplo a estirpe sobreprodutora da enzima EGII, cuja elaboração é exposta no Exemplo 1, são exemplos de estirpes que foram ainda mais desenvolvidas. Nas estirpes referidas, um ou mais genes que codificam CBH ou EG, que não os que codificam EGII, podem ser substituídos por um gene que codifique EGII.

Abaixo apresenta-se uma descrição geral dos métodos para inserir o gene que codifica a proteína EGII e do método para aumentar o nível de produção da proteína EGII em *Trichoderma reesei*. Aplicando o mesmo método, é possível alterar as proporções das celulasas também noutras espécies e, por exemplo, adicionar cópias dos genes que codificam celulase(s) do tipo de *Trichoderma* EGII ou substituir alguns genes nativos por genes que codificam celulase(s) do tipo de *Trichoderma* EGII.

O gene que codifica a proteína EGII (*egl2*; Saloheimo *et al.*, 1988; na publicação, o gene *egl2* é referido como

egl3, que é o seu nome original) pode ser inserido na estirpe de *Trichoderma* seleccionada ou, por exemplo, substituir um gene que codifique EGI (*egl1*; Penttilä et al., 1986) ou outro gene que codifique uma proteína desnecessária; pode ainda adicionar-se meramente o número de cópias por inserções sem eliminar nada. Quando o gene *egl2* substitui, por exemplo, o gene *egl1*, a actividade de EGII da mistura enzimática produzida pela estirpe é mais elevada do que na mistura enzimática produzida por estirpes das quais o gene *egl2* é eliminado ou existe apenas numa cópia. Qualquer marcador adequado para *Trichoderma* pode ser empregado como gene marcador, como, por exemplo, *amdS* (por exemplo do plasmídeo p3SR2; Kelly and Hynes, 1985), *hygB* (por exemplo do plasmídeo pRLMex30; Mach et al., 1994) e *ble* (por exemplo do plasmídeo pAN8-1, Mattern e Punt, 1988). No caso de estirpes auxotróficas, o gene complementar da auxotrofia em causa pode também ser empregado como marcador.

O gene marcador seleccionado e o gene *egl2* são ligados entre as regiões de flanco 5' e 3' do gene alvo, formando um plasmídeo direccionador. Utilizando as regiões de flanco, pode ocorrer recombinação homóloga e os genes desejados podem servir de alvo para dar lugar à inserção de um gene *egl2*. O princípio da substituição de genes é descrito por Suominen et al. (1993). Para que a frequência de ataque seja satisfatoriamente elevada, a dimensão das regiões de flanco tem de ser longa o suficiente; por exemplo, em *Trichoderma*, de pelo menos

1,5 kb. Foram descritos exemplos de regiões de flanco adequadas para a substituição de genes de celulase por Suominen *et al.* (1993). As regiões de flanco necessárias do gene da celulase podem ser isoladas do banco genético de *Trichoderma*.

Podem seleccionar-se estirpes com fenótipos de sobreprodução de EGII de entre transformantes; por exemplo, analisando o meio de cultura com base na elevação da sua actividade de endoglucanase face à estirpe hospedeira (actividade ECU, Bailly e Nevalainen, 1981).

O nível de produção da proteína EGII pode ser aumentado numa estirpe seleccionada, por exemplo na estirpe de *Trichoderma reesei* (foram atrás mencionados exemplos de estirpes de *T.reesei* aplicáveis), por mutação ou pelo aumento do número de cópias do gene *egl2*, tal como é descrito no Exemplo 1A. Além do promotor *cbhl*, também podem ser utilizados para a expressão do gene *egl2* outros promotores adequados para a estirpe seleccionada. Qualquer marcador adequado para *Trichoderma* pode ser utilizado como gene marcador na transformação, tal como foi descrito atrás.

As fontes referidas na descrição acima são indicadas na lista de bibliografia apresentada no fim da especificação.

Os exemplos e figuras seguintes proporcionam mais detalhes sobre a preparação da composição de celulase da presente invenção, assim como do efeito da composição de celulase nas propriedades das matérias têxteis com celulose.

EXEMPLO 1

Elaboração das estirpes

Foram elaboradas estirpes de *Trichoderma reesei* sobreprodutoras das principais celulases de *Trichoderma*, endoglucanases I e II (EGI e EGII) e celobiohidrolases I e II (CBHI e CBHII) para a produção de diferentes preparações de celulase.

A. Elaboração da estirpe de *Trichoderma reesei* sobreprodutora de EGII

Na elaboração da estirpe de *Trichoderma reesei* sobreprodutora de EGII, transformou-se a estirpe progenitora de *T. reesei* VTT-D-79125 com a cassette de expressão do plasmídeo pALK537 (Figura 1). Na cassette, a EGII é expressada a partir do promotor *cbhl* forte. *T. reesei* VTT-D-79125 é uma estirpe mutante hipercelulolítica que contém todas as principais celulases de *Trichoderma* (Nevalainen, 1985).

O plasmídeo pALK537 contém:

* Promotor *cbh1* de *T. reesei* (celobiohidrolase 1) de *Trichoderma reesei* VTT-D-80133 (Teeri et al., 1983). Foi utilizado na elaboração o fragmento de 2,2 kb *EcoRI*-*SacII*. A sequência da área do promotor que precede ATG foi publicada por Shoemaker et al. (1983). Os últimos nucleótidos do promotor *cbh1* L27 de *T. reesei* (o locus *SacII* está sublinhado) são CCGCGGACTGGCATC (Shoemaker et al., 1983). O promotor *cbh1* da estirpe de *T. reesei* VTT-D-80133 foi sequenciado no laboratório da empresa *Primalco Ltd.* e foi notada a diferença de um nucleótido na sequência de ADN da região acima mencionada. Na estirpe de *T. reesei* VTT-D-80133, a sequência que precede ATG é CCGCGGACTGCGCATC.

Os nucleótidos que faltam ao promotor (10 bps após o *SacII* até ao ATG) foram adicionados e a fusão exacta do promotor à sequência de sinalização do cADN de *egl2* (endoglucanase 2) foi efectuada pelo método de PCR (reacção em cadeia da polimerase). Os fragmentos obtidos por fusão e por PCR foram sequenciados para garantir que não ocorreram quaisquer erros na reacção.

* cADN de *egl2* de *T. reesei* *egl2* (endoglucanase 2, originalmente designada *egl3*). A sequência de nucleótidos do cADN de *egl2* é descrita por Suominen et al. (1988). No plasmídeo pALK537 utilizou-se um fragmento de 1,4 kb (da sequência de sinalização até ao local de *EcoRI*).

* Terminador *cbh1* de *T. reesei* de *T. reesei* VTT-D-80133 (Teeri et al., 1983). O fragmento de 739 pb *AvaII*, com

início 113 pb antes do codão de paragem (STOP) do gene *cbh1*, foi adicionado após o cADN de *egl2*.

* Fragmento 3' de *cbh1*: O fragmento de 1,4 kb *BamHI-EcoRI* foi isolado de *T. reesei* ALK02466 (Suominen *et al.*, 1993). O fragmento 3' pode ser utilizado em conjunto com a área do promotor para dirigir o cADN de *egl2* para o locus *cbh1* por recombinação homóloga.

* gene *amdS*: O gene foi isolado de *Aspergillus nidulans* e codifica a acetamidase (Hynes *et al.*, 1983). A acetamidase permite à estirpe crescer utilizando a acetamida como única fonte de azoto, tendo esta característica sido utilizado para seleccionar os transformantes. O fragmento de 3,1 kb *SpeI-XbaI* do plasmídeo p3SR2 (Kelly e Hynes, 1985) foi utilizado no plasmídeo ALK537.

Os métodos habituais de manuseamento de ADN descritos por Maniatis *et al.* (1982) foram utilizados na elaboração dos vectores. As enzimas de restrição T4 ADN ligase, fragmento de Kelnow da polimerase I de ADN e fosfatase alcalina do intestino de vitelo utilizadas nas manipulações de ADN eram originárias das empresas *Boehringer* (Alemanha) e *New England Biolabs* (EUA). Todas as enzimas foram utilizadas de acordo com as instruções do fornecedor. O ADN do plasmídeo de *E. coli* foi isolado com colunas Qiagen (*Diagen GmbH*, Alemanha), de acordo com as instruções do fornecedor. Os fragmentos de ADN para clonagem ou transformações foram isolados em geles de

agarose de baixo ponto de fusão (*FMC Bioproducts*, EUA) pelo método de liofilização de fenol (Benson, 1984). Os oligonucleótidos utilizados nas reacções de PCR e nas reacções de sequenciação foram sintetizados por um ABI (*Applied Biosystems*, EUA). A sequenciação da fusão foi realizada por sequenciador automático (*Applied Biosystems* 373A, EUA).

A estirpe de *T. reesei* VTT-D-79125 foi transformada com o fragmento linear de 9,2 kb *NotI* de pALK537, tal como descrito por Penttilä et al. (1987). Os transformantes de *T. reesei* foram transferidos num meio selectivo e purificados através de conídeas. Os transformantes purificados foram cultivados em frascos sob agitação, num meio contendo 4% de soro de leite, 1,5% de uma fonte complexa de azoto de cereais, 1,5% de KH₂PO₄ e 0,5% de (NH₄)₂SO₄, a pH 5,5. As culturas foram incubadas a 30°C e a 250 rpm durante 7 dias. A actividade contra hidroxietilcelulose (HEC) foi medida a partir dos meios de cultura dos transformantes. No transformante ALK03529, a actividade contra HEC (3400 ECU/ml) foi cerca do triplo da actividade da estirpe progenitora VTT-D-79125 (1200 ECU/ml). De acordo com a análise por *Southern blot*, a estirpe ALK03529 possui pelo menos duas cópias consecutivas do fragmento do vector transformado que contém a cassette de expressão de *egl2*.

ECU: Define-se uma unidade de actividade de ECU (endo-1,4-betaglucanase) como a quantidade de enzima que produz

uma nmol de açúcares redutores, como glicose, por segundo, a partir do substrato hidroxietilcelulose (HEC) 1 ECU = 1 ncat, (Bailey M. e Nevalainen, H., 1981).

B. Elaboração de estirpes de *T. reesei* sobreprodutoras de EGI

A elaboração da estirpe de *T. reesei* sobreprodutora de EGI ALK02656, em que o gene de CBHI foi eliminado, é descrita em Karhunen *et al.* (1993).

C. Elaboração da estirpe de *T. reesei* que sobreproduz EGI e EGII sem CBHI e CBHII

Para a sobreprodução de EGI e EGII de *T. reesei* sem CBHI e CBHII, transformou-se a cassete de expressão do plasmídeo pALK540 (Figura 2) em *T. reesei* ALK02698 (Karhunen *et al.*, 1993). ALK02698 é uma estirpe sobreprodutora de EGI que não contém o gene *cbh1*. Na cassete de pALK540, a EGII é expressada a partir do promotor de *cbh1* forte.

O plasmídeo pALK540 contém:

* Promotor de *cbh1* de *T. reesei*, terminador e cADN de *egl2*, tal como é descrito no exemplo 1A.

* gene *ble*. O gene foi isolado de *Streptoalloteichus hindustanus* (Drocourt *et al.* 1990). O gene confere resistência à bleomicina e a antibióticos relacionados,

fleomicina e talisomicina. A resistência à fleomicina foi utilizada para seleccionar os transformantes. Foi utilizado o fragmento de 3,3 kb *XbaI*-*Bgl2* do plasmídeo pAN8-1 (Mattern et al., 1987) no plasmídeo ALK540. O fragmento contém o gene da fleomicina (*ble*), flanqueado pelo promotor *gpdA* de *Aspergillus nidulans* e pelas regiões terminadoras *trpC*.

* Fragmento 5' de *cbh2* de *T. reesei*: O fragmento foi isolado da estirpe de *T. reesei* VTT-D-80133 (Teeri et al., 1987). Foi utilizado um fragmento de 3,4 kb de *HhoI*-*PvuII*, com início 1,4 kb a montante do gene *cbh2*, em conjunto com o fragmento 3' de *cbh2*, para direccionar a cassette de expressão para o locus *cbh2*.

* Fragmento 3' de *T. reesei*. O fragmento foi isolado da estirpe de *T. reesei* VTT-D-80133 (Teeri et al., 1987). Foi utilizado um fragmento de 1.6 kb de *XbaI* - *BglIII*, com início 1.1 kb a jusante do gene *cbh2*, em conjunto com o fragmento 5' de *cbh2*, para direccionar a cassette de expressão para o locus *cbh2*.

Foram utilizados na elaboração dos vectores os mesmos métodos que foram descritos no exemplo 1A.

A estirpe de *T. reesei* ALK02698 foi transformada com o fragmento de 11,6 kb *ClaI*-*PvuI* de pALK540, tal como descrito por Penttilä et al. (1987). Os protoplastos transformados foram transferidos para a superfície de placas MnR osmoticamente estabilizadas com sacarose a 0,44 M e incubados durante 6 horas a 30°C, antes da

adição de 5 ml de MnR derretido, como camada superior, contendo 300 µg/ml de fleomicina (Cayala, França). Os transformantes foram purificados em meio de MnR selectivo suplementado com 50 µg/ml de fleomicina através de um esporo antes da transferência para meios de cultura inclinados de MnR contendo 50 µg/ml de fleomicina durante três gerações e, depois disso, para meios de cultura inclinados PD. Os transformantes purificados foram cultivados em placas de microtitulação para a detecção da proteína CBHII por *Western blotting* com um anticorpo monoclonal contra CBHII. ALK03528 era um dos transformantes cBHII negativos, contendo uma cópia da cassette de expressão de *egl2* em lugar de *cbh2* (*Southern blot*). O transformante ALK03528 foi cultivado tal como no exemplo 1A para medir a actividade contra HEC (ECU/ml) do meio de cultura. A actividade contra HEC era cerca do dobro na estirpe ALK03528 daquela da estirpe progenitora ALK02698 e cerca do quádruplo da actividade da estirpe VTT-D-79125, que é uma estirpe progenitora de ALK02698.

D. Elaboração de estirpes de *T. reesei* sobreprodutoras de CBHI

A elaboração da estirpe de *T. reesei* ALK03760, sobreprodutora de CBHI, é descrita na Publicação do Pedido de Patente Internacional WO 96/34945, aqui incorporada para referência.

E. Elaboração de estirpes de *T. reesei* sobreprodutoras de CBHII

Para a sobreprodução em *T. reesei* da cassette de expressão de CBHII do plasmídeo pALK546 (Figura 3), efectuou-se a transformação em *T. reesei* ALK02221 (estirpe mutante VTT-D-79125 com baixo nível de actividade da protease). Na cassette de pALK546, a CBHII é expressada a partir do promotor de *cbh1* forte.

O plasmídeo pALK546 contém:

- * Promotor de *cbh1* de *T. reesei* e terminador, tal como é descrito no exemplo 1A.

- * gene *cbh2*. O gene *cbh2* proveio da estirpe de *T. reesei* VTT-D-80133 (Teeri et al., 1987). O fragmento que contém o gene *cbh2* tem um comprimento de cerca de 2,2 kb, 1,5 kb do qual é área codificadora.

- * gene *ble*, promotor *gpdA* e terminador *trpC*, tal como é descrito no exemplo 1C.

- * o fragmento 5' de *egl2* foi isolado da estirpe VTT-D-79125 de *T. reesei*, sendo subclonado a partir de um clone λ , originalmente designado *egl3*, isolado por Saloheimo et al. (1988). pALK546 contém o fragmento de 1,4 kb *XhoI*-*SacI* cerca de 2,2 kb a montante do gene *egl2*. Este fragmento pode ser utilizado em conjunto com o fragmento 3' de *egl2* para dirigir a cassette de expressão para o locus *egl2*.

- * fragmento 3' de *egl2*: O fragmento de 1,6 kb *AvrII*-*SmaI*, a cerca de 0,2 kb do gene *cbh2*, foi utilizado em pALK546. O fragmento tem origem no mesmo clone que o fragmento 5'.

pALK546 foi elaborado de acordo com os exemplos 1A e 1C. A estirpe de *T. reesei* ALK02221 foi transformada com o fragmento de 11,8 kb *EcoRI-BamHI* de pALK546 de acordo com o exemplo 1C. Os transformantes purificados foram cultivados tal como no exemplo 1A e a quantidade de celulase CBHII segregada foi quantificada pelo método ELISA (Buehler, 1991) com anticorpo monoclonal contra CBHII. No transformante ALK03798, a quantidade de proteína de CBHII aumentou para o quádruplo face à estirpe progenitora ALK02221. De acordo com a análise por *Southern blot*, ALK03798 contém uma cópia da cassete de expressão de *cbh2*.

F. Elaboração da estirpe de *T. reesei* que sobreproduz CBHI e e CBHII sem EGI e EGII

Para a sobreprodução de CBHI e CBHII de *T. reesei* sem EGI e EGII, transformou-se a cassete de expressão do plasmídeo pALK543 (Figura 4) no locus de *egl2* de *T. reesei* ALK03761. ALK03761 é uma estirpe sobreprodutora de CBHI EGI-negativa. A elaboração da estirpe ALK03761 é descrita no documento WO 96/34945, aqui incorporado para referência, excepto quanto ao facto de os transformantes EGI-negativos terem sido analisados por *Western blot* com anticorpo monoclonal contra EGI. ALK03761 contém uma cópia da cassete de expressão no locus *egl1* e a quantidade de celulase CBHI segregada aumentou face à estirpe progenitora ALK02221. Na cassete de pALK543, *cbh2* é expressado a partir do seu próprio promotor.

O plasmídeo pALK543 contém:

- * O promotor, o gene e o terminador de *cbh2* da estirpe de *T. reesei* VTT-D-80133 (Teeri *et al.*, 1987). O fragmento de 4,7 kb *SphI*-*SacII* utilizado em pALK543 contém cerca de 1,5 kb de área codificadora, aproximadamente 2,5 kb de região promotora e cerca de 0,7 kb de região terminadora.
- * gene *ble*, promotor *gpdA* e terminador *trpC*, tal como é descrito no exemplo 1C.
- * Fragmentos 5' e 3' de *egl2*, tal como é descrito no exemplo 1E.

pALK543 foi elaborado de acordo com os exemplos 1A e 1C.

A estirpe de *T. reesei* ALK03761 foi transformada com o fragmento de 11,2 kb *BamHI* de pALK543, tendo os transformantes sido analisados de acordo com o exemplo 1C e 1E. ALK04097 foi um dos transformantes EGII-negativos que, de acordo com a análise por *Southern blot*, contém uma cópia da cassete de expressão de *cbh2* no locus de *egl2*. Em ALK04097, a quantidade de proteína de CBHII segregada aumentou para o triplo face à estirpe progenitora ALK03761.

EXEMPLO 2

Efeitos das celulasas purificadas de *Trichoderma* no *biostoning*

Nesta experiência, estuda-se os efeitos de *stone-washing* (efeito desgastado) da preparação de celulase derivada da estirpe VTT-D-79125 de *Trichoderma reesei* com a adição das diferentes celulases purificadas de *Trichoderma* CBHI (celobiohidrolase I), CBHII, EGI (endoglucanase I) e EGII. VTT-D-79125 é uma estirpe mutante de *Trichoderma reesei* hipercelulolítica (Nevalainen, 1985).

Pré-lavou-se o tecido de ganga durante 10 minutos, a 60°C, com Ecostone A 200 (1 ml/litro, *Primalco Ltd*, Biotec, Finlândia). O tecido foi então cortado em amostras de referência de 12 x 12 cm. A cor foi medida no tecido em valores de reflectância com o sistema *Minolta Chroma Meter 1000R L*a*b* (Osaka, Japão).

Os tratamentos com celulase foram realizados num LP-2-Lauder-Ometer (*Atlas*, Illinois, EUA) da seguinte forma. Foram adicionados a um recipiente de 1,2 litros cerca de 7 g de amostras de referência de ganga. Este recipiente continha 200 ml de tampão citrato 0,05 M a pH 5. Para auxiliar a remoção da cor, adicionou-se a cada recipiente uma certa quantidade de bolas de aço. A preparação de VTT-D-79125 foi utilizada em unidades de endoglucanase (ECU/ml, exemplo 1). Utilizou-se em cada teste 300 ECU por g de tecido, adicionando-se celulases CBHI, CBHII, EGI ou EGII a 1 ou 2 mg por g de tecido. Os recipientes foram então encerrados e inseridos num banho a 50°C *Lauder-Ometer*. O *Lauder-Ometer* funcionou a 42 rpm durante 1 e 2 horas.

Depois de removidas dos recipientes, as amostras foram mergulhadas durante 10 minutos em 200 ml de NaOH 0,01 M e enxaguadas 2 x, durante 5 minutos, em água fria. As amostras foram então secadas durante 1 hora a 105°C e novamente secadas ao ar, durante a noite, a temperatura ambiente. A cor de ambos os lados da amostra foi medida com o Chroma Meter Minolta. Os resultados das medições da cor em tecidos de ganga tratados são apresentados na Tabela I. As Figuras 5 e 6 mostram o aumento da claridade do lado direito do tecido após tratamentos de 1 e 2 horas.

TABELA I. Medições da cor em tecidos de ganga tratados com uma preparação de celulase de VTT-D-79125 e uma preparação de celulase de VTT-D-79125 com adição de celulases purificadas.

Celulase adicionada a preparação de VTT-D-79125	mg/g		Lado direito		deltaE
		L		b	
1 hora					
-*	-	0,8		1,5	1,5
CBHI	1	0,8		2,0	1,5

CBHI	2	1,8		2,0	2,2
CBHII	1	1,1		1,7	1,6
CBHII	2	0,6		1,7	1,3
EGI	1	1,1		2,0	1,9
1 hora					
EGI	2	1,8		2,5	3,0
EGII	1	1,9		3,2	3,2
EGII	2	2,7		2,5	3,8
2 horas					
*	-	1,2		1,9	1,5
CBHI	1	2,2		2,5	3,1
CBHI	2	1,4		2,5	2,7
CBHII	1	1,0		2,2	1,5
CBHII	2	1,3		2,7	2,6
EGI	1	2,2		2,9	2,2
EGI	2	2,0		3,1	3,5
EGII	1	2,5		3,7	1,9
EGII	2	4,2		3,5	5,2

* Preparação de VTT-D-79125 pura

O efeito do tampão nas cores foi eliminado destes valores

L: Unidade de claridade do tecido após o tratamento menos a unidade de claridade do tecido antes do tratamento

b: Unidade de grau de azul do tecido após o tratamento menos a unidade de grau de azul do tecido antes do tratamento

deltaE: Diferença de cor no espaço L*a*b* entre a cor da amostra e a cor alvo (alvo = tecido de ganga não tratado)

Os resultados mostram que a adição de celulase EGII à preparação de VTT-D-79125 é a que mais aumenta a claridade (efeito stone-washed) dos tecidos de ganga no processo de *stone-washing* face à adição de outras celulasas purificadas. A adição de CBHI ou EGI melhorou o efeito stone-washed face à preparação pura de VTT-D-79125, mas menos que a adição de EGII. Após uma hora de tratamento, foi necessário o dobro da quantidade de CBHI ou EGI, face a EGII, para obter o mesmo efeito stone-washed. A adição de CBHII conferiu o mesmo efeito stone-washed que a preparação pura de VTT-D-79125.

EXEMPLO 3

Efeitos de diferentes preparações de celulasas de *Trichoderma* no *biostoning*

Neste exemplo estuda-se o efeito stone-washed conferido por preparações de celulase derivadas das estirpes de *Trichoderma reesei* ALKO3760, ALKO3798, ALKO 4097, ALKO2656, ALKO3529, ALKO3528 e VTT-D-79125 (exemplo 1).

O procedimento experimental foi o mesmo que no exemplo 2, tendo-se utilizado em cada experiência 3 e 6 mg de proteína total em preparações de celulase por g de tecido. Os tempos de lavagem foram de 1 e 2 horas a 50°C.

Os resultados das medições da cor são apresentados na Tabela II

TABELA II. Medições da cor de tecidos de ganga tratados com preparações de celulases de VTT-D-79125, ALK03798, ALK04097, ALK02656, ALK03529 e ALK03528.

preparação	dosagem mg/g			Lado direito	
		L	b		deltaE
1 hora					
VTT-D-79125	3	1,5	1,4		1,8
	6	1,5	1,8		2,0
ALK03760	3	1,3	1,2		1,8
	6	0,6	1,9		1,6
ALK03798	3	1,4	1,4		1,4
ALK04097	3	0	0,8		0
	6	0,5	0,8		0,3
ALK02656	3	0,1	2,6		2,2
1 hora					
ALK03529	3	1	1,8		1,8
	6	2,1	2,9		3,3
ALK03528	3	1,3	2,0		1,8
	6	1,5	2,8		2,3
2 horas					
VTT-D-79125	3	1,8	2,3		NM
	6	2,4	2,6		NM
ALK03760	3	2,2	2,9		2,7
ALK03798	3	1,6	2,5		2,5
ALK04097	3	0,1	1,2		NM

	6	0,8	1,7		NM
ALKO2656	3	2,5	2,9		3,1
ALKO3529	3	3,2	2,6		3,6
ALKO3528	3	2,7	3,2		NM

NM = não medido

O efeito do tampão nas cores foi eliminado destes valores.

L: Unidade de claridade do tecido após o tratamento menos a unidade de claridade do tecido antes do tratamento

b: Unidade de grau de azul do tecido após o tratamento menos a unidade de grau de azul do tecido antes do tratamento

deltaE: Diferença de cor no espaço L*a*b* entre a cor da amostra e a cor alvo (alvo = tecido de ganga não tratado)

Os resultados mostram que, após 1 hora de tratamento com uma dosagem de 3 mg/g, o efeito stone-washed medido em unidades de claridade é quase igual com preparações de celulase de VTT-D-79125, ALKO3528, ALKO3760, ALKO3529 e ALKO3798. Não se obtém um aumento nítido das unidades de claridade com as preparações de ALKO4097 ou ALKO2656. Com uma dosagem de 6 mg/g, após 1 hora de tratamento, a preparação de ALKO3529 é a que exhibe o maior aumento de unidades de claridade face às preparações de VTT-D-79125, ALKO3528, ALKO4097 ou ALKO3760. Após 2 horas de tratamento com a dosagem de 3 mg/g, o melhor efeito stone-washed medido em unidades de claridade é o obtido com a preparação de ALKO3529.

EXEMPLO 4**Utilização de diferentes preparações de celulases de *Trichoderma* no bioacabamento de tecido com algodão**

Um tecido de 100% algodão (obtido de *Pirkanmaan Uusi Värjäämö Ltd*, Finlândia) foi sujeito a tratamento com preparações de celulase de VTT-D-79125, ALK02656, ALK03529, ALK03528, ALK03760, ALK03798 e ALK04097 (exemplo 1) no Launder-Ometer. Em cada experiência utilizou-se 20 g de tecido pré-lavado não tingido. As condições de tratamento com celulase foram as descritas no exemplo 2, excepto quanto ao facto de a proporção de líquido (volume de líquido por peso de tecido) ter sido de 1:15, tendo-se utilizado em cada experiência 2 e 6 mg de proteína total em preparações de celulase por g de tecido. O tempo de lavagem foi de 1 hora a pH 5 e 50°C. Após lavagem com uma solução alcalina e água, os tecidos tratados foram secados em máquina secadora (Cylinda 7703, Suécia).

Foram utilizados os seguintes métodos para a avaliação dos efeitos dos tratamentos com celulase em tecidos de algodão: A perda de peso dos tecidos tratados foi definida como a percentagem do peso do tecido antes e após o teste (antes da pesagem, os tecidos foram condicionados numa atmosfera de $21 \pm 2^\circ\text{C}$ e $50 \pm 2\%$ HR. A

perda de peso foi utilizada para descrever a quantidade de felpo removida da superfície do tecido.

A avaliação do aspecto visual dos tecidos tratados com enzimas foi efectuada por um painel constituído por cinco pessoas. Os tecidos foram classificados de acordo com uma escala de 1 a 5, correspondendo 5 a uma superfície limpa sem felpo nem borbotos e em que a textura do tecido era mais aparente. A pontuação de 1 correspondia a muitos borbotos e felpo.

O método de esfregamento de Martindale (SFS-4328) foi utilizado para a avaliação da formação de borbotos. Esta foi classificada por um painel, segundo uma escala de 1 a 5, após 200 ciclos de abrasão (1 = muitos borbotos, 5 = sem borbotos). Os resultados são apresentados na Tabela III e na Figura 7

TABELA III. Perda de peso, aspecto visual e formação de borbotos dos tecidos tratados em Launder-Ometer com diferentes preparações de celulase

preparação	dosagem mg/g	perda de peso %	aspecto visual	formação de borbotos após 200 ciclos
-	-	0	1	1
VTT-D-79125	2	0,8	2,3	2,3
	6	2,2	2,7	3,6

ALKO3760	2	2,1	3,1	2,3
	6	4,2	3,4	3,8
ALKO3798	2	3,1	3,3	3,1
	6	4,9	3,4	4,3
ALKO4097	2	0	1,5	1,2
	6	1,0	2,5	2,2
ALKO2656	2	2,5	3,8	3,5
	6	3,6	3,8	4,4
ALKO3529	2	3,1	3,9	4,3
	6	4,8	3,8	4,4
ALKO3528	2	0,7	3,7	3,5
	6	2,0	3,4	4,3

Os resultados mostram que o melhor aspecto visual e a maior redução da tendência de formação de borbotos é obtida com a preparação de celulase de ALKO3529, quando se comparam as dosagens de diferentes preparações. Além disso, para obter o mesmo nível de remoção da formação de borbotos (por exemplo, 4,3), é necessário utilizar ALKO3529 em doses consideravelmente menores do que as outras preparações.

EXEMPLO 5

Utilização de diferentes preparações de celulases de *Trichoderma* no bioacabamento de tecido com algodão

Um tecido de 100% algodão (obtido de *Pirkanmaan Uusi Värjäämö Ltd*, Finlândia) foi sujeito a tratamento com preparações de celulase de VTT-D-79125, ALKO3760, ALKO3798, ALKO2656, ALKO3529 e AL_KO3528 (exemplo 1) em *Gavazzi s.r.l.* Campiocolor mod. RD/1 (Itália). Cerca de 25 g de tecido pré-lavado e não tingido e 10 litros de água foram utilizados em cada experiência a pH 5. As dosagens de enzima foram de 6 e 12 mg de proteína total em preparações de celulase por g de tecido. Os tempos de lavagem foram de 1 hora a pH 5 e a 50°C.

Para a avaliação dos efeitos dos tratamentos com celulase nos tecidos de algodão foram utilizados os mesmos métodos já descritos no exemplo 4. A resistência à tracção foi medida de acordo com a Norma 3981 SFS. Os resultados são apresentados na Tabela IV.

TABELA IV. Perda de peso, aspecto visual, formação de borbotos e resistência à tracção dos tecidos tratados em Gavazzi Campiocolor com diferentes preparações de celulase

preparação	dosagem mg/g	perda de peso %	aspecto visual	formação de borbotos após 200 ciclos	resistên cia à tracção (trama) N
-	-	0	1	1	15,5
VTT-D-79125	6	1,9	2,3	3,2	14,0

	12	2,6	2,8	3,6	13,4
ALKO3760	6	2,7	3,6	3,2	14,2
	12	3,1	3,1	3,8	13,4
ALKO3798	6	2,8	3,0	3,5	13,3
	12	3,9	3,8	4,5	12,7
ALKO2656	6	2,3	3,1	3,3	13,8
	12	2,5	3,6	3,8	13,8
ALKO3529	6	2,9	4,3	3,7	12,9
	12	4,1	4,5	4,4	13,4
ALKO3528	6	1,5	2,9	2,2	13,1
	12	2,2	2,9	2,9	13,9

O melhor aspecto visual e a maior redução da tendência para formar borbotos foi alcançada com a preparação de celulase de ALKO3529.

EXEMPLO 6

Utilização de diferentes preparações de celulases de *Trichoderma* no bioacabamento de tecido de malha com algodão

Um tecido de malha de 100% algodão (obtido de *Apropos Finland, Ltd, Finlândia*) foi sujeito a tratamento com preparações de celulase de VTT-D-79125, ALKO2656, ALKO3529, ALKO3528, ALKO3760, ALKO3798 e ALKO4097 (exemplo 1) no Launder-Ometer. Utilizou-se em cada

experiência 20 g de tecido de malha não tingido e as condições de tratamento com celulase foram as descritas no exemplo 2, excepto quanto ao facto de a proporção de líquido (volume de líquido por peso de tecido) ter sido de 1:15, tendo-se utilizado em cada experiência 1, 2 e 4 mg de proteína total em preparações de celulase por g de tecido. O tempo de lavagem foi de 1 hora a pH 5 e 50°C. Após enxaguamento com uma solução alcalina e água, as malhas tratadas foram secadas em máquina secadora.

Para a avaliação dos efeitos dos tratamentos com celulose em malhas de algodão, foram utilizados os mesmos métodos descritos no exemplo 4.

TABELA V. Perda de peso, aspecto visual e formação de borbotos dos tecidos de malha de algodão tratados em Launder-Ometer com diferentes preparações de celulase

preparação	dosagem mg/g	perda de peso %	aspecto visual	formação de borbotos após 200 ciclos	após 2000
VTT-D-79125	1	4,4	2,0	1,3	NE
	2	5,5	3,3	2,7	1,9
	4	6,8	3,5	2,2	NE
média			2,9	2,1	
ALKO3760	1	4,3	2,0	1,7	NE
	2	5,4	3,2	2,3	2,5

	4	6,8	3,2	1,0	NE
média			2,8	1,7	
ALKO3798	1	4,9	2,3	2,2	NE
	2	6,1	2,8	2,2	2,1
	4	7,6	3,0	1,8	NE
média			2,7	2,1	
ALKO2656	1	4,4	3,0	1,5	NE
	2	6,0	3,8	3,2	2,8
	4	6,9	3,7	2,2	NE
média			3,5	2,3	
ALKO3529	1	5,4	3,0	2,0	NE
	2	6,7	3,8	3,1	2,9
	4	8,4	3,0	2,3	NE
média			3,3	2,5	
ALKO3528	1	4,6	2,7	1,7	NE
	2	5,6	3,5	2,1	2,3
	4	5,9	3,7	2,0	NE
média			3,3	1,9	

NE = não efectuado

Os resultados mostram que, após 1 hora de tratamento, em média, o melhor e quase igual aspecto visual foi obtido com as malhas tratadas com celulase de ALK02656, ALK03529 ou ALK03528. Contudo, em média, a maior redução da tendência para formar borbotos foi alcançada nas malhas tratadas com ALK03529.

EXEMPLO 7**Utilização de diferentes preparações de celulases de *Trichoderma* no bioacabamento de tecido de malha com algodão**

Um tecido de malha de 100% algodão (obtido de *Apropos Finland, Ltd, Finlândia*) foi sujeito a tratamento com preparações de celulase de VTT-D-79125, ALK02656, ALK03529, ALK03528, ALK03760 e ALK03798 (exemplo 1) no *Gavazzi s.r.l. Campiocolor mod. RD/1 (Itália)*. Cerca de 230 g de malha e 10 litros de água foram utilizados em cada experiência a pH 5. As dosagens de enzima foram de 6 mg de proteína total em preparações de celulase por g de tecido. Os tempos de lavagem foram de 1 hora a 50°C.

Para a avaliação dos efeitos dos tratamentos com celulose em malhas de algodão, foram utilizados os mesmos métodos descritos no exemplo 4.

Os resultados são apresentados na Tabela VI.

TABLE VI. Perda de peso, aspecto visual e formação de borbotos das malhas de algodão tratadas em *Gavazzi Campiocolor* com diferentes preparações de celulase

preparação	perda de peso %	aspecto visual	formação de borbotos após 200 ciclos
-	2,7	1	1,1
VTT-D-79125	4,2	3,4	2,3
ALKO3760	4,6	2,6	2,5
ALKO3798	5,2	3,4	3,1
ALKO2656	4,6	3,6	2,8
ALKO3529	5,7	3,8	3,5
ALKO3528	3,6	2,9	2,6

Na Tabela VI é mostrado que, no tratamento de malha de algodão, o melhor aspecto visual e a maior redução da tendência para formar borbotos foram alcançados com a preparação de celulase de ALKO3529.

EXEMPLO 8

Utilização de diferentes preparações de celulasas de *Trichoderma* no bioacabamento de tecido de algodão

Um tecido de 100% algodão (obtido de *Pirkanmaan Uusi Värjäämö Ltd*, Finlândia) foi sujeito a tratamento com preparações de celulase de ALKO3529, ALKO3760 e ALKO3798 numa máquina de lavar de tambor semi-industrial Esteri 20 HS-P. Utilizaram-se em cada experiência cerca de 1,5 kg de tecido. O consumo de água da máquina foi de cerca de

100 litros. O pH foi ajustado a 5, o tempo de tratamento foi de 45 minutos a 50°C. As dosagens de enzima foram de 6 mg de proteína total em preparações de celulase por g de tecido.

Após o tratamento enzimático, os tecidos foram tingidos com três corantes reactivos diferentes, Remazol (*Bayer*), Levafix (*Bayer*) e Cibacron (*Ciba*), utilizando procedimentos de tingimento normais.

Os efeitos dos tratamentos com celulase nos tecidos de algodão tingidos foram avaliados pelo painel segundo o seu aspecto visual. Os resultados são apresentados na Tabela VII.

TABELA VII. Aspecto visual dos tecidos tratados com diferentes preparações de celulase numa máquina de lavar Esteri 20 HS-P. Dosagem de 6 mg de proteína total por g de tecido.

preparação	Remazol	Levafix	Cibacron
-	1,3	1,3	1,3
ALK03529	4,3	4,1	4,4
ALK03760	3,8	3,6	3,8
ALK03798	3,6	3,8	4,0

Os resultados mostram que o melhor aspecto visual foi obtido com ALK03529 em todos os tecidos.

EXEMPLO 9**Utilização de diferentes preparações de celulases de *Trichoderma* no bioacabamento de tecido lyocell**

Foram utilizadas as preparações de celulase de ALK03760, ALK03798, ALK04097, ALK03529, ALK02656 e ALK03528 (exemplo 1) no controlo da fibrilhação e bioacabamento de 100% Tencel® (lyocell). Antes do tratamento enzimático, o tecido foi pré-fibrilhado numa máquina de lavar de tambor semi-industrial (Esteri 20 HS-P) com 2,5 g/l de carbonato de sódio a 60°C. Os tratamentos com celulase foram realizados num Gavazzi s.r.l. Campiocolore mod. RD/1 (Itália). Cerca de 70 g de tecido pré-fibrilhado e 10 litros de água foram utilizados em cada experiência a pH 5. As dosagens de enzima foram de 6 mg de proteína total em preparações de celulase por g de tecido. Os tempos de lavagem foram de 2 horas a pH 5 e a 50°C.

Foram utilizados os seguintes métodos para a avaliação dos efeitos dos tratamentos com celulase em tecidos Tencel®:

* A avaliação do aspecto visual dos tecidos tratados com enzimas foi efectuada por um painel constituído por cinco pessoas. Os tecidos foram classificados de acordo com uma escala de 1 a 5, correspondendo 5 a uma superfície limpa sem felpo, fibrilhas ou borbotos. A pontuação de 1 correspondia a muitos borbotos, fibrilhas e felpo.

* Remoção da fibrilhação (índice): Os pêlos superficiais foram removidos do tecido e colocados em água, sobre uma lâmina de vidro. Esta foi visualizada num microscópio óptimo, tendo-se analisado 10 áreas da lâmina e calculado a média dos seus resultados. Quanto mais baixo o índice de fibrilhação, mais eficaz a enzima.

Os resultados são apresentados na Tabela VIII.

TABELA VIII. Aspecto visual e o índice de fibrilhação dos tecidos tratados em Gavazzi Campiocolor com diferentes preparações de celulase

preparação	aspecto visual	índice de fibrilhação
-	1	10,2
ALKO3760	3,6	6,1
ALKO3798	3,3	8,1
ALKO4097	3,3	8,0
ALKO2656	3,7	8,2
ALKO3529	4,4	6,8
ALKO3528	3,1	6,4

O índice de fibrilhação é uma média de duas análises. O aspecto visual é uma média do lado direito e do avesso dos tecidos.

O melhor aspecto visual foi obtido com ALK03529. A remoção da fibrilhação foi mais eficaz com as preparações ALK03760, ALK03528 e ALK03529.

As referências mencionadas na descrição geral e nos exemplos são listadas na seguinte secção:

Bibliografia:

Bailey, M. and Nevalainen, H. 1981. Induction, isolation and testing of stable *Trichoderma reesei* mutants with improved production of solubilizing cellulase. *Enz.Micr.Tech.* 3:153-157.

Benson, S.A. 1984. *Bio/Techniques* 2:66-68.

Bhat, K.M., McCrae, S.I. and Wood, T.M. 1989. The endo-1-4-beta-d-glucanase system of *penicillium*, *aspergillus-pinoophilum* cellulase isolation purification and characterization of five major endoglucanase components. *Carbohydrate Research* 190:279-297.

Bhikhabhai, R., Johansson, G. and Pettersson, G. 1984. Isolation of Cellulolytic Enzymes from *Trichoderma reesei* QM9414. *Journal of Applied Biochemistry* 6:335-345.

Buehler, R. 1991. Double-antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for quantitation of endoglucanase I

of *Trichoderma reesei*. Appl.Environ.Microbiol. 57:3317-3321.

Drocourt, D., Calmels, T., Reynes, J.P., Baron, M. and Tiraby, G. 1990. Cassettes of the *Streptoalloteichus hindustanus* ble gene for transformation of lower and higher eukaryotes to phleomycin resistance. Nuc.Acids Res. 18: 4009.

IUPAC Commission on Biotechnology. 1984. Measurement of Cellulase Activities, Ghose, T.K.

Hynes, M., Corrick, C. and King, S. 1983. Isolation of genomic clones containing the amdS gene of *Aspergillus nidulans* and their use in the analysis of the structural and regulatory mutations. Mo.Cell.Biol. 3:1430-1439.

Karhunen, T., Mäntylä, A., Nevalainen, H. and Suominen, P. 1993. High frequency one_step gene replacement in *Trichoderma reesei*. I. Endoglucanase I overproduction. Mol.Gen.Genet. 241:515-522.

Kelly, J. and Hynes, M. 1985. Transformation of *Aspergillus niger* by the amdS gene of *Aspergillus nidulans*. EMBO J. 4: 475-479.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193:265-275.

Mach, R.L., Schindler, M. and Kubicek, C.P. 1994. Transformation of *Trichoderma reesei* based on hygromycin B resistance using homologous expression signals. Curr. Genet. 25:567-570.

Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J. 1982. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, USA.

Mattern, J.E., Punt, P.J. and van den Hondel, C.A.M.J. 1988. A vector of *Aspergillus* transformation conferring phleomycin resistance. Fungal Genet. Newslett. 35:25.

International Patent Publication No. WO 96/34945.

Nevalainen, Genetic improvement of enzyme production in industrially important fungal strains. 1985 VTT, Technical Research Centre of Finland, publications 26, Espoo Finland.

Penttilä et al. 1987. A versatile transformation system for the cellulolytic filamentous fungus *Trichoderma reesei*. Gene 61:155-164.

Penttilä, M., Lehtovaara, P., Nevalainen, H., Bhikhabhai, R. and Knowles, J. 1986. Homology between cellulase genes of *Trichoderma reesei*: complete nucleotide sequence of the endoglucanase I gene. *Gene* 45:253-263.

Saloheimo, M., Lehtovaara, P., Penttilä, M., Teeri, T., Ståhlberg, J., Johansson, G., Claeysens, M., Tomme, P. and Knowles, J. 1988. EGIII, a new endoglucanase from *Trichoderma reesei*: the characterization of both gene and enzyme. *Gene* 63:11-21.

Schulein, M. 1988. Cellulases of *Trichoderma reesei*. *Methods in Enzymology* 160:234-242.

Shoemaker, S., Schweikart, V., Ladner, M., Gelfand, D., Kwok, S., Myambo, K. and Innis, M. 1983. Molecular cloning of exocellobiohydrolase from *Trichoderma reesei* strain L27. *Bio/Technology* 1. 691-696.

Suominen, P., Mäntylä, A., Karhunen, T., Hakola, S. and Nevalainen, H. 1993. High frequency one_step gene replacement in *Trichoderma reesei*. II Effects of deletions of individual cellulase genes. *Mol.Gen.Genet.* 241:523-530.

Teeri, T., Salovuori, I. and Knowles, J. 1983. The molecular cloning of the major cellulase gene from *Trichoderma reesei*. *Bio/_Technology* 1:696-699.

Teeri, T., Lehtovaara, P., Kauppinen, S., Salovuori, I. and Knowles, J. 1987. Homologous domains in *Trichoderma reesei* cellulolytic enzymes: gene sequence and expression of cellobiohydrolase II.

Van Tilbeurgh, H., Loontjens, F.G., De Bruyne, C.K. and Clayessens, M. 1988. Fluorogenic and chromogenic glycosides as substrates and ligands of carbohydrases. *Methods in Enzymology* 160:45-59.

Wood, T.M., McCrae, S.I., Wilson, C.A., Bhat, K.M. and Gow, L.A. 1988. Aerobic and anaerobic fungal cellulases, with special reference to their mode of attack on crystalline cellulose. *FEMS Symposium No. 43, Biochemistry and Genetics of Cellulose Degradation*, pp. 31-52.

REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO

Esta lista de referências citadas pelo requerente é indicada apenas para conveniência do leitor. Não constitui parte do documento de patente europeia. Ainda que se tenha usado de grande cuidado na compilação das referências, não se pode excluir a possibilidade de conter erros ou omissões e o EPO (*European Patent Office*) declina qualquer responsabilidade a este respeito.

Documentos de patentes citados na descrição

- WO 9407983 A
- US 5232851 A
- US 5120463 A
- WO 9322428 A
- WO 9423113 A
- WO 9206221 A
- US 4832864 A
- US 5090474 A
- WO 9206210 A
- US 5246853 A
- WO 9206165 A
- WO 9525840 A
- US 5525507 A
- WO 9217572 A
- WO 9217574 A
- US 5433750 A
- US 3664961 A
- WO 9634945 A

Bibliografia não referente a patentes citada na descrição

- **BAILEY, M ; NEVALAINEN, H.** Induction, isolation and testing of stable *Trichoderma reesei* mutants with improved production of solubilizing cellulase.
Enz.Micr.Tech, 1981, vol. 3, 153-157
- **BENSON, S.A.** *Bio/Techniques*, 1984, vol. 2, 66-68
- **BHAT, K.M ; MCCRAE, S.I ; WOOD, T.M.** The endo-1-4-beta-d-glucanase system of *penicillium, aspergillus-pinophilum* cellulase isolation purification and characterization of five major endoglucanase components. *Carbohydrate Research*, 1989, vol. 190, 279-297
- **BHIKHABHAI, R ; JOHANSSON, G ; PETTERSSON, G.** Isolation of Cellulolytic Enzymes from *Trichoderma reesei* QM9414. *Journal of Applied Biochemistry*, 1984, vol. 6, 335-345
- **BUEHLER, R.** Double-antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for quantitation of endoglucanase I of *Trichoderma reesei*. *Appl.Environ.Microbiol*, 1991, vol. 57, 3317-3321
- **DROCOURT, D ; CALMELS, T ; REYNES, J.P ; BARON, M ; TIRABY, G.** Cassettes of the *Streptoalloteichus hindustanus ble* gene for transformation of lower and higher eukaryotes to phleomycin resistance. *Nuc.Acids Res*, 1990, vol. 18, 4009
- **GHOSE, T.K.** *IUPAC Commission on Biotechnology. Measurement of Cellulase Activities*, 1984
- **HYNES, M; CORRICK, C ; KING, S.** Isolation of genomic clones containing the *amdS* gene of *Aspergillus*

nidulans and their use in the analysis of the structural and regulatory mutations. *Mo.Cell.Biol*, 1983, vol. 3, 1430-1439

- **KARHUNEN, T ; MÄNTYLÄ, A ; NEVALAINEN, H ; SUOMINEN, P.** High frequency one-step gene replacement in *Trichoderma reesei*. I. Endoglucanase I overproduction. *Mol.Gen.Genet*, 1993, vol. 241, 515-522 [0156]

- **KELLY, J; HYNES, M.** Transformation of *Aspergillus niger* by the *amdS* gene of *Aspergillus nidulans*. *EMBO J.*, 1985, vol. 4, 475-479

- **LOWRY, O.H; ROSEBROUGH, N.J ; FARR, A.L ; RANDALL, R.J.** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 1951, vol. 193, 265-275

- **MACH, R.L ; SCHINDLER, M ; KUBICEK, C.P.** Transformation of *Trichoderma reesei* based on hygromycin B resistance using homologous expression signals. *Curr. Genet*, 1994, vol. 25, 567-570

- **MANIATIS, T ; FRITSCH, E.F ; SAMBROOK, J.** *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, 1982

- **MATTERN, J.E ; PUNT, P.J ; VAN DEN HONDEL, C.A.M.J.** A vector of *Aspergillus* transformation conferring phleomycin resistance. *Fungal Genet.Newslett*, 1988, vol. 35, 25

- **NEVALAINEN.** *Genetic improvement of enzyme production in industrially important fungal strains*. VTT, Technical Research Centre of Finland, 1985, vol. 26

- **PENTTILÄ et al.** A versatile transformation system for the cellulolytic filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Gene*, 1987, vol. 61, 155-164
- **PENTTILÄ, M ; LEHTOVAARA, P ; NEVALAINEN, H ; BHIKHABHAI, R ; KNOWLES, J.** Homology between cellulase genes of *Trichoderma reesei*: complete nucleotide sequence of the endoglucanase I gene. *Gene*, 1986, vol. 45, 253-263
- **SALOHEIMO, M; LEHTOVAARA, P ; PENTTILÄ, M ; TEERI, T ; STÅHLBERG, J ; JOHANSSON, G ; CLAEYSSSENS, M ; TOMME, P ; KNOWLES, J.** EGIII, a new endoglucanase from *Trichoderma reesei*: the characterization of both gene and enzyme. *Gene*, 1988, vol. 63, 11-21
- **SCHULEIN, M.** Cellulases of *Trichoderma reesei*. *Methods in Enzymology*, 1988, vol. 160, 234-242
- **SHOEMAKER, S ; SCHWEIKART, V ; LADNER, M ; GELFAND, D ; KWOK, S ; MYAMBO, K ; INNIS, M.** Molecular cloning of exocellobiohydrolase from *Trichoderma reesei* strain L27. *Bio/Technology*, 1983, vol. 1, 691-696
- **SUOMINEN, P ; MÄNTYLÄ, A ; KARHUNEN, T ; HAKOLA, S ; NEVALAINEN, H.** High frequency one-step gene replacement in *Trichoderma reesei*. II Effects of deletions of individual cellulase genes. *Mol.Gen.Genet*, 1993, vol. 241, 523-530
- **TEERI, T ; SALOVUORI, I ; KNOWLES, J.** The molecular cloning of the major cellulase gene from *Trichoderma reesei*. *Bio/Technology*, 1983, vol. 1, 696-699

- **TEERI, T ; LEHTOVAARA, P ; KAUPPINEN, S ; SALOVUORI, I ; KNOWLES, J.** Homologous domains in *Trichoderma reesei* cellulolytic enzymes: gene sequence and expression of cellobiohydrolase II, 1987
- **VAN TILBURGH, H ; LOONTIENS, F.G ; DE BRUYNE, C.K ; CLAYESSENS, M.** Fluorogenic and chromogenic glycosides as substrates and ligands of carbohydrases. *Methods in Enzymology*, 1988, vol. 160, 45-59
- **WOOD, T.M; MCCRAE, S.I ; WILSON, C.A ; BHAT, K.M ; GOW, L.A.** Aerobic and anaerobic fungal cellulases, with special reference to their mode of attack on crystalline cellulose. *Biochemistry and Genetics of Cellulose Degradation*, 1988, (43), 31-52

REIVINDICAÇÕES

1. Um método para tratar matérias têxteis com celulose com um meio de tratamento contendo uma composição de celulase, resultando na melhoria das propriedades da matéria têxtil com celulose, incluindo melhoria do aspecto e toque, redução da tendência para formação de borbotos e manutenção da resistência ou melhoria do aspecto do acabamento stone-washed, face a um meio completo, **caracterizado pelo facto de** a matéria têxtil ser tratada com uma composição de celulase de elevado teor em EGII, cuja composição de celulase é um meio contendo 45-80% de CBHI, 10-25% de CBHII, 5-15% de EGI e 8-15% de EGII, à qual se adiciona EGII para criar o teor elevado em EGII de, pelo menos, 15 por cento em peso do peso total de proteínas de celulase, ou uma composição de celulase obtida a partir de uma estirpe sobreprodutora de EGII, em que a composição de celulase possui uma proporção de EG:CBH de 0,6-1:1 e uma proporção de CBHI:EG de 1-1,4:1.

2. O método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo facto de** a composição de celulase ser constituída por pelo menos 20-60 por cento em peso de celulase de tipo EGII relativamente à proteína de celulase total.

3. O método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo facto de** a composição de celulase ser

constituída por pelo menos 25-40 por cento em peso de celulase de tipo EGII relativamente à proteína de celulase total.

4. O método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo facto de** a composição de celulase poder ser obtida de fungos ou bactérias.

5. O método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo facto de** a composição de celulase poder ser obtida de fungos dos géneros *Trichoderma*, *Penicillium*, *Humicola* ou *Fusarium*.

6. O método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo facto de** a composição de celulase poder ser obtida da espécie *Trichoderma reesei*.

7. O método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo facto de** a composição de celulase poder ser obtida de uma estirpe de *Trichoderma reesei* sobreprodutora de EGII.

8. O método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo facto de** a proporção de fibra celulósica na matéria têxtil ser de pelo menos 30 por cento.

9. O método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo facto de** a proporção de fibra

celulósica na matéria têxtil ser de pelo menos 50 por cento.

10. O método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo facto de** a fibra celulósica na matéria têxtil com celulose ser seleccionada de entre um grupo constituído por algodão, linho, alinhado, rami, juta, viscose, modal, lyocell e cupro.

11. O método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo facto de** a fibra celulósica na matéria têxtil com celulose ser de algodão.

12. O método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo facto de** a matéria têxtil com celulose ser tecido ou peças de vestuário de ganga.

13. O método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo facto de** o meio de tratamento conter surfactantes, polímeros, tampões, agentes de volume, conservantes, estabilizantes e/ou agentes abrasivos.

Lisboa, 16/10/2007

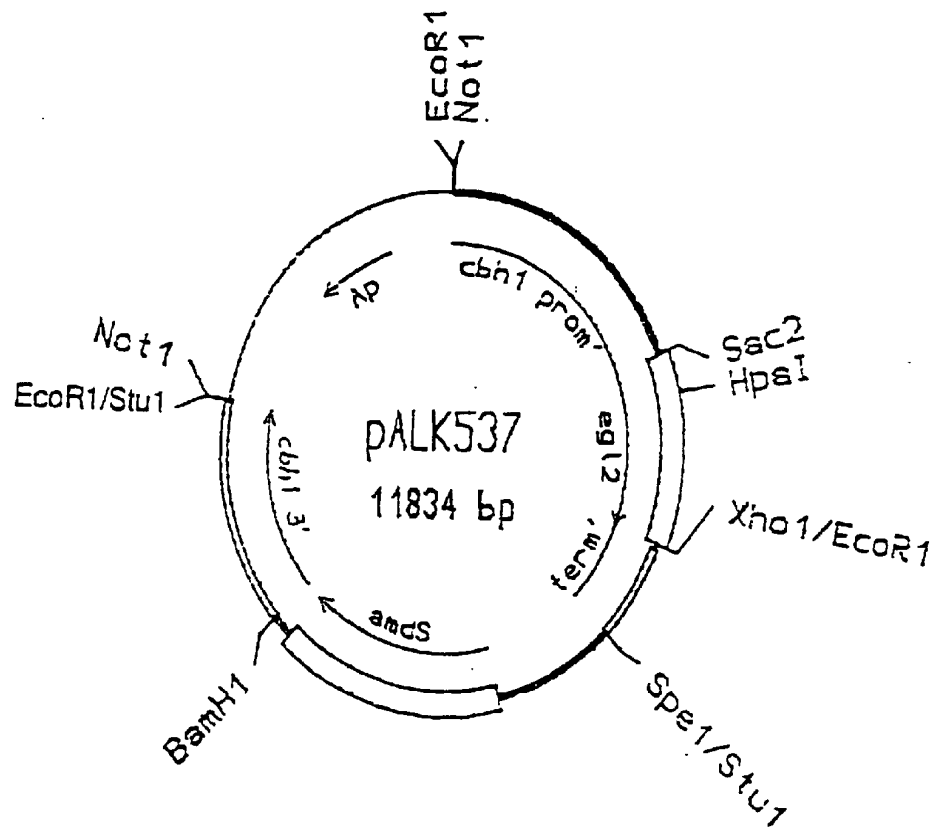


Figura 1

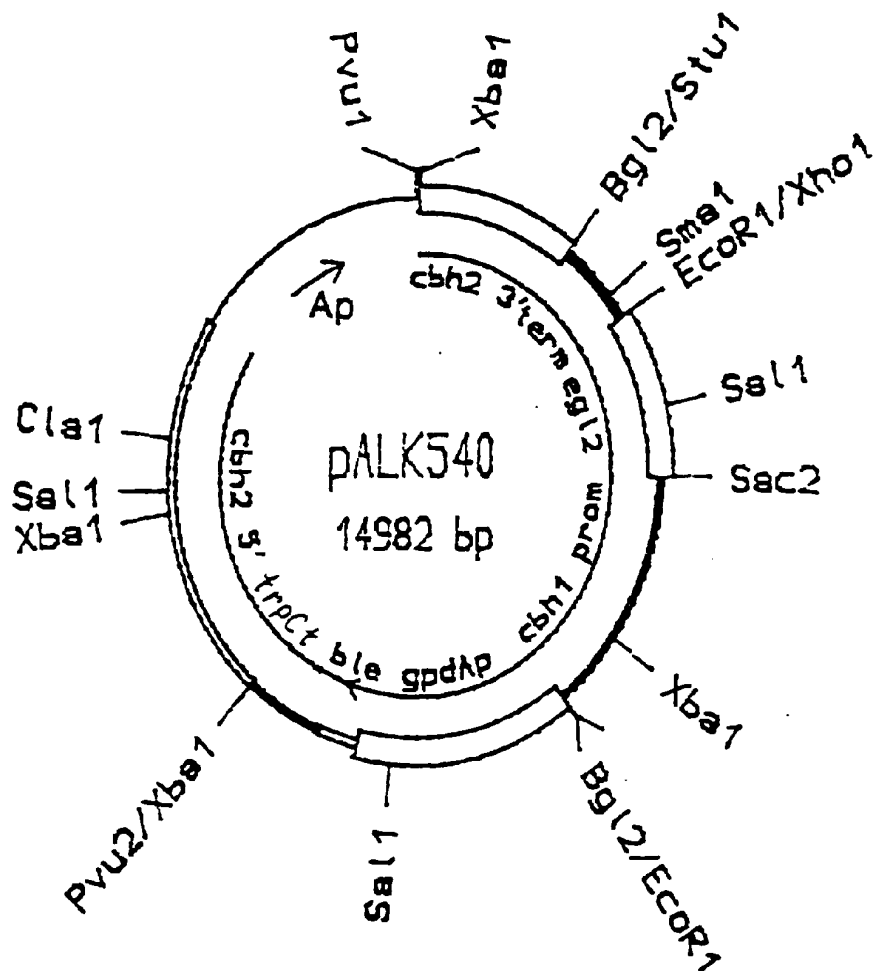


Figura 2

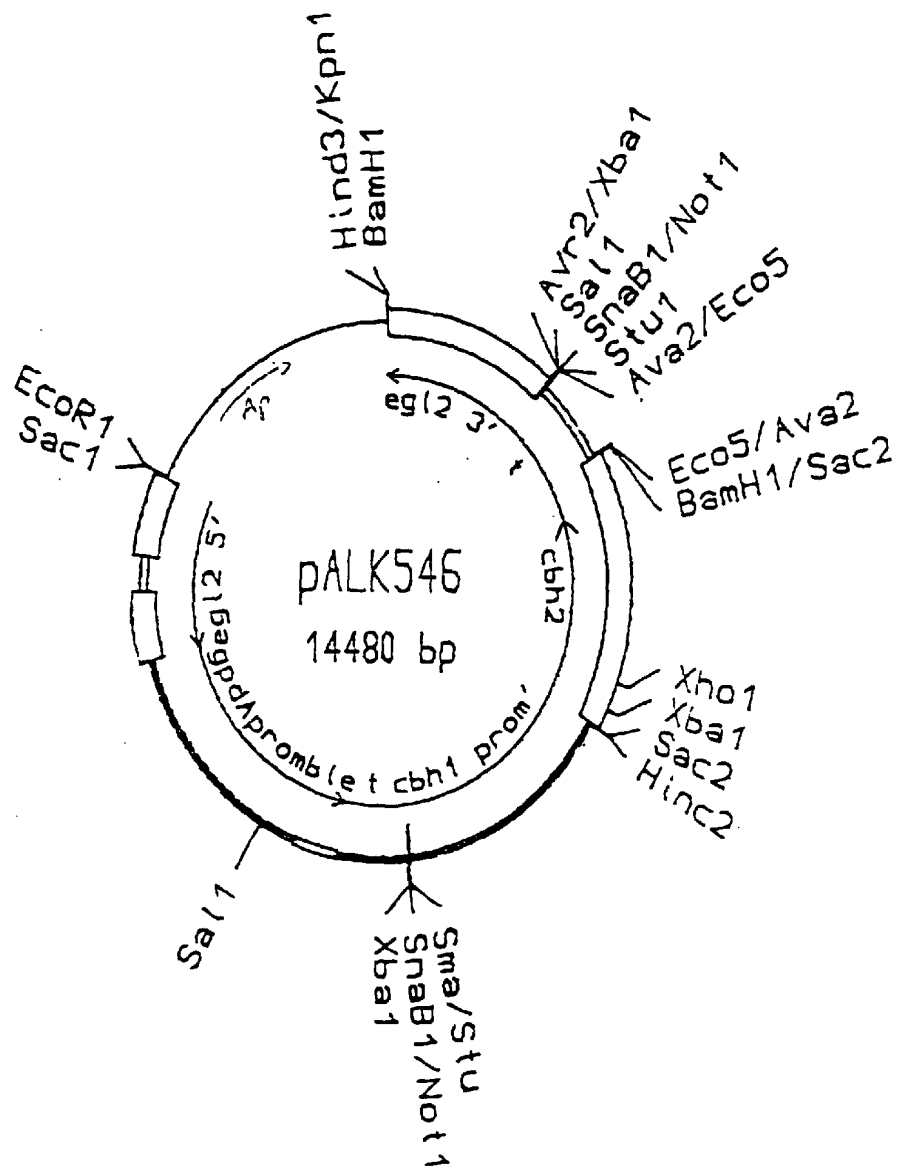


Figura 3

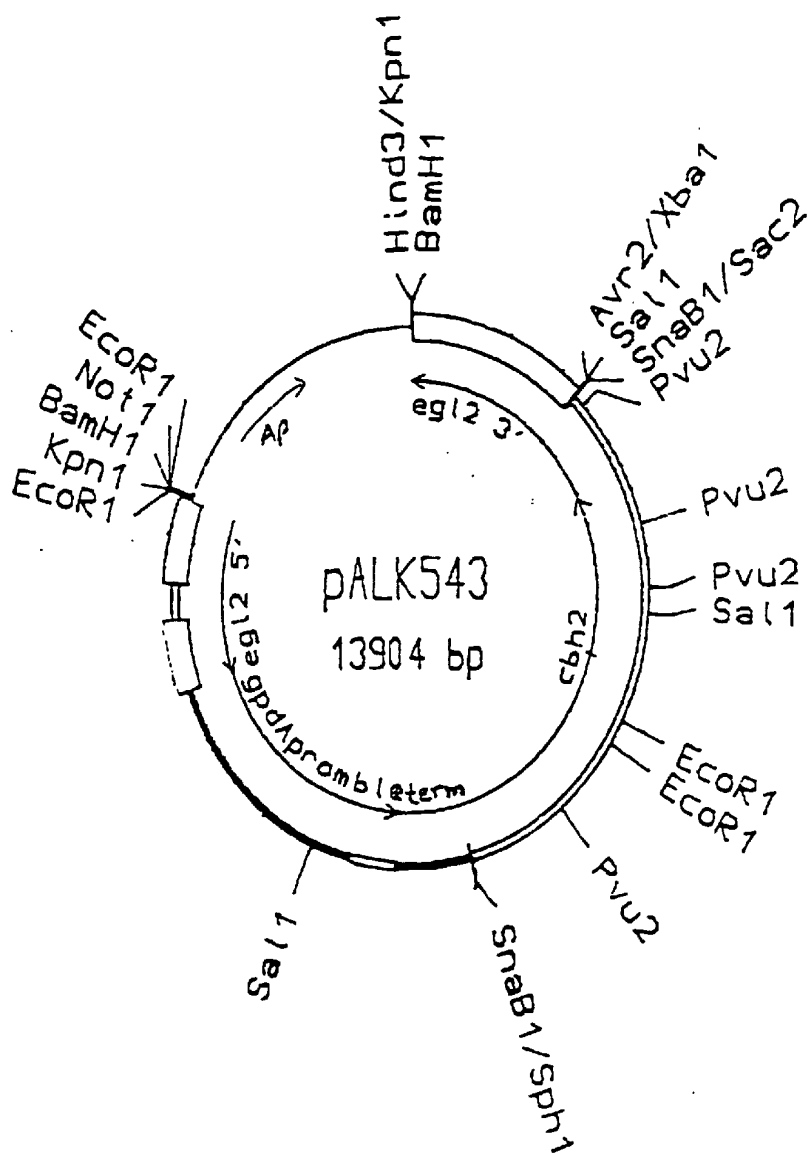


Figura 4

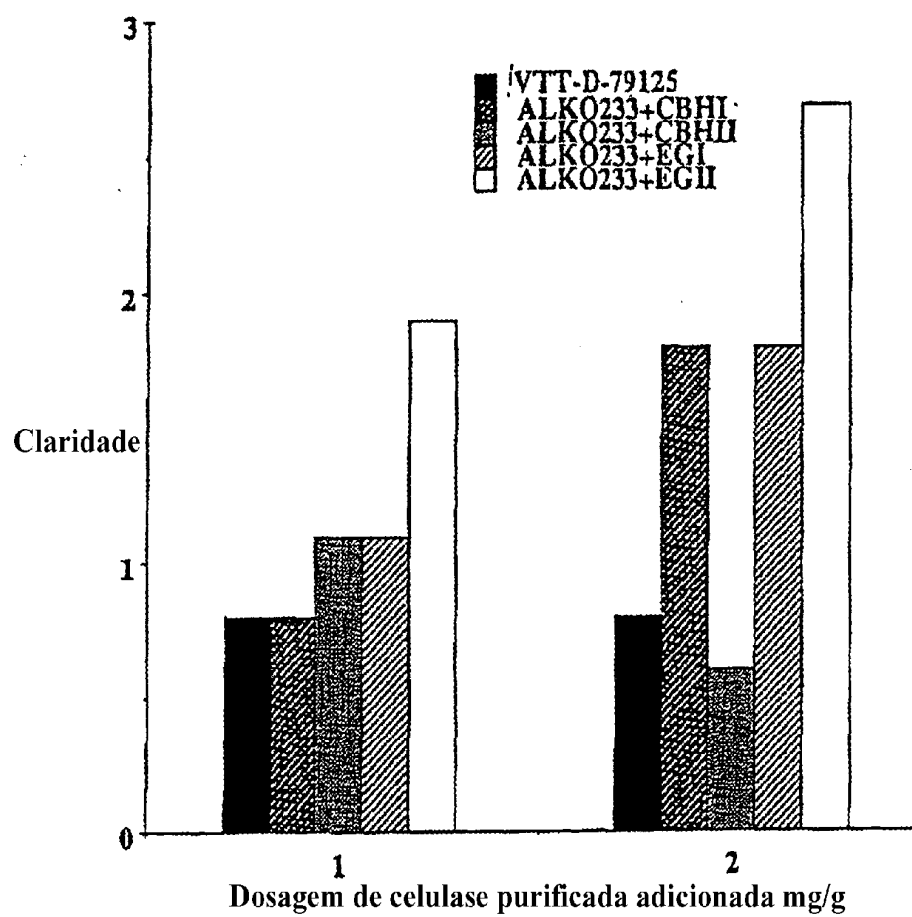


Figura 5

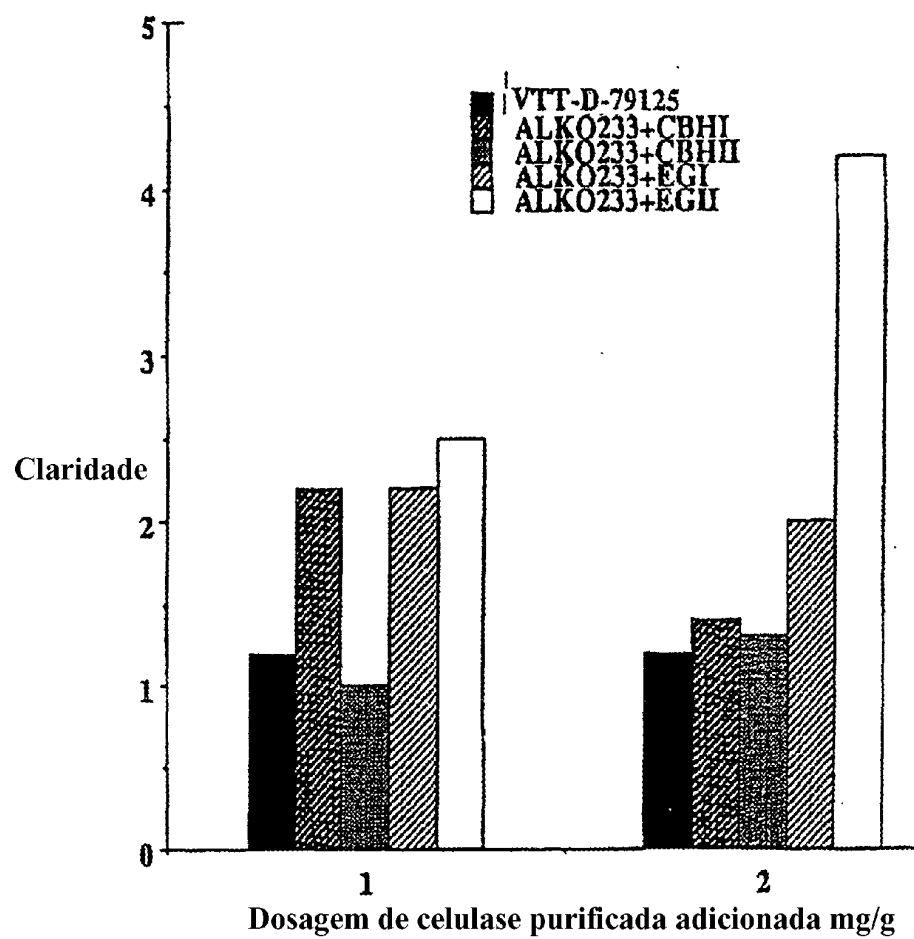


Figura 6



Figura 7