

FOLHA DO RESUMO

Modalidade e n.º (11)	T D	Data do pedido: (22)	Classificação Internacional (51)
0.1.nº101.152 L		1992/12/22	
Requerente (71): THE PROCTER & GAMBLE COMPANY, norte-americana, com sede em One Procter & Gamble Plaza, Cincinnati, Ohio 45202, ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA			
Inventores (72): Finlay McCORQUODALE e Alfred BUSCH, ambos residentes na Bélgica			
Reivindicação de prioridade(s) (30)			Figura (para interpretação do resumo)
Data do pedido	País de Origem	N.º de pedido	
---	---	---	
Epígrafe: (54) COMPOSIÇÕES DETERGENTES ENZIMÁTICAS INIBIDORAS DA TRANSFERÊNCIA DE CORANTES			
Resumo: (máx. 150 palavras) (57) Descrevem-se composições detergentes inibidoras da transferência de corantes entre tecidos durante a sua lavagem, constituídas por um enzima que apresenta uma actividade de peroxidase, um peróxido de hidrogénio ou um precursor de peróxido de hidrogénio ou um sistema enzimático capaz de gerar peróxido de hidrogénio, um substrato oxidável adicional, e uma celulase, composições caracterizadas por a celulase fornecer pelo menos 10% de remoção de carboximetil celulose imobilizada, radioactivamente marcada de acordo com o método C14CMC a $25 \times 10^{-6}\%$ em peso da solução de ensaio de lavagem. De acordo com a presente invenção, uma celulase preferida é essencialmente constituída por um componente homogêneo de endoglucanase, que é imunoreactivo com um anticorpo monoclonal criado contra uma celulase de 43 KD, parcialmente purificada, derivada do <i>Hemicola insolens</i> DM1800.			

NÃO PREENCHER AS ZONAS SOMBRADAS

10 MAR 1993

COMPOSIÇÕES DETERGENTES ENZIMATICAS INIBIDORAS DA TRANSFERENCIA DE CORANTES

Campo da Invenção

A presente invenção refere-se a uma composição enzimática para inibição da transferência de corantes de um tecido tinto para outro tecido, durante a lavagem.

Antecedentes da Invenção

Um dos problemas mais persistentes e mais complicados que se levantam durante as operações de lavagem dos tecidos modernos, é a tendência que alguns tecidos tintos têm libertar o corante nas soluções de lavagem. O corante é assim transferido para outros tecidos que estejam a ser simultaneamente lavados.

Uma forma de ultrapassar este problema seria retirarem por meio de branqueamento, os corantes saídos dos tecidos tintos, antes de eles terem a oportunidade de se fixarem aos outros artigos presentes na lavagem.

Os corantes suspensos ou solubilizados podem sofrer um certo grau de oxidação na solução por meio do emprego de agentes branqueadores conhecidos. A patente GB 2 101 167 descreve uma composição branqueadora líquida estável que contém um precursor de peróxido de hidrogénio que é activado para libertar peróxido de hidrogénio na diluição.

É no entanto importante que, ao mesmo tempo, não se branqueiem os corantes existentes realmente nos tecidos, isto é, que não se danifiquem as cores.

A Patente Norte-americana 4.077.768 descreve um processo para a inibição da transferência de corantes por meio da utilização de um agente branqueador oxidante, juntamente com compostos catalíticos tais como porfinas de

10 MAR 1993

1 ferro.

5 O Pedido de Patente Norte-americano 421.414 descreve peroxidases e oxidases utilizadas para a oxidação de substâncias orgânicas ou inorgânicas, incluindo substâncias tingidas. Uma composição inibidora da transferência de corantes constituída por sistema enzimático capaz de gerar peroxidase de hidrogénio e catalizadores de ferro, foi descrita no Pedido de Patente Europeia copendente 10 91202655.6 depositado em 9 de Outubro de 1991.

15 A patente EP 424 398-A descreve um aditivo detergente capaz de exercer um efeito de branqueamento que compreende uma peroxidase. O aditivo compreende ainda um ou mais enzimas, particularmente uma lipase, protease, amilase ou uma celulase.

20 A patente EP-A-350 098 descreve um método C14CMC que define critérios de selecção de celulase que são relevantes para aplicação em detergentes. Verificou-se que um mínimo de 10% de remoção de carboximetilcelulose imobilizada radioactivamente marcada de acordo com o método CMC a $25 \times 10^{-6}\%$ em peso de proteína da celulase na solução de ensaio, proporciona uma elevada celulase activa.

25 Um grupo de celulase preferido, que cabe na definição de elevada actividade, de acordo com a presente invenção, foi descrito no Pedido copendente de Patente Dinamarquesa N^o 1159/90 depositado em 5 de Maio de 1990. Descreve-se aí uma preparação de celulase essencialmente constituída por uma componente de endoglucanase homogénea, 30 que é imunoreactivo com um anticorpo monoclonal criado contra uma celulase de 43kD parcialmente purificada, derivada do *Hemicola insolens* DM1800.

35 Verificou-se agora, surpreendentemente, que a eficiência da peroxidase, em termos de inibição da transferência de corantes, é consideravelmente ampliada por

Jul 1993

1 meio da utilização da referida celulase de alta actividade e
mais particularmente a preparação de celulase específica
descrita no Pedido copendente de Patente Dinamarquesa Nº
1159/90. Constitui portanto um objecto da presente invenção,
5 proporcionar composições inibidoras da transferência de
corantes que apresentem um índice óptimo de transferência
de corantes nos líquidos de lavagem, por meio da utilização
das referidas celulase e peroxidase de altas actividades
de celulase e peroxidase.

10 De acordo com uma forma de realização desta
invenção, proporciona-se uma composição inibidora da
transferência de corantes que compreende uma preparação
de celulase que é economicamente eficaz, por exemplo
15 com a utilização de, por exemplo, técnicas de ADN
recombinante.

De acordo com outra forma de realização desta
invenção, proporciona-se igualmente um processo para
operações de lavagem que envolvam tecidos tintos.

20

Sumário da Invenção

A presente invenção proporciona uma composição
inibidora da transferência de corantes constituída por um
25 enzima que apresenta actividade de peroxidase, um peróxido
de hidrogénio ou um percurso de peróxido de hidrogénio ou
um sistema enzimático capaz de gerar peróxido de
hidrogénio, um substrato oxidável adicional e uma
celulase, caracterizado por a celulase proporcionar pelo
30 menos 10% de remoção de carboximetil celulose
imobilizada radioactivamente marcada de acordo com o
método C14CMC a $25 \times 10^{-6}\%$ em peso da solução de ensaio de
lavagem.

35 De acordo com a presente invenção, uma celulase

12 MAR 1993

1 preferida é constituída essencialmente por um componente
homogénio de endoglucanase que é imunoreactivo com um
anticorpo monoclonal criado contra uma celulase de 43kD
5 parcialmente purificada, derivada de *Humicola insolens*
DM1800.

Descrição pormenorizada da Invenção

CELULASE

10 A actividade dos enzimas e particularmente a actividade
do enzima da celulase, foi definida para várias aplicações
por diferentes métodos analíticos. Esses métodos tentam
todos proporcionar uma avaliação realística do desempenho
15 esperado em utilização, ou pelo menos uma medição que se
relacione com o desempenho em utilização. Conforme foi
descrito pormenorizadamente no Pedido de Patente Europeia
EP-A-350098, muitos dos métodos, particularmente os
frequentemente usados pelos fabricantes de celulase, não
se encontram suficientemente relacionados com o desempenho
20 em utilização da celulase em composições detergentes
para lavandaria. Isto deve-se às outras condições de
utilização para as quais esses métodos de medição da
actividade foram desenvolvidos.

25 O método descrito no EP-A-350098, foi
desenvolvido para ser e para ter uma correlação preditiva
para a hierarquia da actividade de celulase nas composições
detergentes para lavandaria.

30 A presente invenção utiliza, por isso, o método
descrito no EP-A-350098, para investigar as celulases a fim
de distinguir as celulases que são úteis na presente invenção
daquelas que não proporcionarão os objectivos da presente
invenção. O método de detecção, daqui em diante referido como
Método C14-CMC, que foi adoptado do método descrito no EP-A-
35 350098, pode ser descrito como segue:

19 MAR 1987

Princípio :

O princípio do Método C14CMC para investigar é medir, a uma concentração de celulase definida numa solução de lavagem, a remoção da carboximetil celulose imobilizada (CMC) de um substrato de tecido. A remoção da CMC é medida por meio de marcação radioactiva de alguma da CMC, por meio da utilização de carbono C14 radioactivo. A simples contagem da quantidade de C14 radioactivo existente no substrato de tecido, antes e depois do tratamento com celulase, permite a avaliação da actividade da celulase.

Preparação das amostras:

Preparação da CMC: A solução base da CMC radioactiva é preparada de acordo com o Quadro I. A CMC radioactiva pode ser obtida pelos métodos referidos no EP-A-350098.

Substratos de tecido: Os substratos de tecido são constituídos por mechas de algodão egípcio com um tamanho de 5cm x 5cm. São inoculados, no seu centro, com 0,35 ml da solução de base com CMC marcada radioactivamente. As mechas de algodão egípcio são então secas ao ar.

Imobilização da CMC: Para imobilizar a CMC radioactivamente marcada nas mechas de algodão egípcio, é usado equipamento lavandométrico "Linitest Original Haunau", fabricado por Original Haunau, Alemanha. Um frasco de metal do lavandómetro é cheio com 400 ml de água dura (4 mmol/litro de íões de Ca^{++}). Pode ser utilizado um número máximo de 13 mechas por jarro. O jarro é a seguir incubado num ciclo de aquecimento progressivo de 20°C a 60°C, durante 40 minutos, num equipamento lavandométrico. Após a incubação, as mechas são enxaguadas com água corrente de cidade durante 1 minuto. São espremidas e deixadas secar ao ar durante pelo menos 30 minutos. De acordo com as amostras EP-A-350098 das mechas com

CMR 1993

1 a CMC radioactiva imobilizada podem ser também medidas como
"amostras em branco", sem lavagem.

5 TRATAMENTO DAS AMOSTRAS:

10 **Solução de ensaio de lavagem:** A solução de ensaio de lavagem
é preparada de acordo com a composição do Quadro II. é
equilibrada até um pH de 7,5. A solução de ensaio de
lavagem é a base a que adiciona uma amostra para o ensaio
da celulase. Dever-se-à ter o cuidado de não diluir a
15 solução de ensaio de lavagem por meio da adição de
água até 100% de equilíbrio, antes de se ter determinado
qual a quantidade de celulase a ser adicionada. A
quantidade de celulase que é utilizada neste ensaio de
detecção, deverá ser adicionada de forma a fornecer 25×10^{-6}
em peso por cento de proteína de celulase, na solução de
ensaio de lavagem (equivalente a 0,25 miligramas/litro a
14,5°C).

20 **Processo de lavagem:** As mechas assim inoculadas com CMC
radioactivamente marcada, são então tratadas num processo de
simulação de lavagem. O processo de lavagem é simulado no
equipamento tipo lavandómetro, "Linitest, Original Haunau"
fabricado pela Original Haunau, Haunau, Alemanha. Uma mecha
individual é colocada num tubo de vidro de 20cm³. O tubo é
25 cheio com 10 ml de solução de ensaio de lavandaria e depois
selado de maneira estanque aos líquidos. Em cada frasco
lavandométrico são colocados até 5 frascos. O frasco é cheio
com água, como meio de transferência do calor para a
simulação da lavagem. A simulação da lavagem é efectuada sob
30 a forma de um ciclo de aquecimento progressivo desde 20°C a
60°C, ao longo de 40 minutos.

35 Após o processamento das amostras, os frascos são
submersos em água fria e posteriormente cada uma das mechas
é extraída do seu frasco, enxaguada numa proveta com água

19. MAR. 1993

1 macia corrente, espremida e deixada secar ao ar durante pelo menos 30 minutos.

5 Medição:

Para se medir a remoção da CMC marcada radioactivamente, é usado um contador de cintilação, por exemplo um LKB 1210 Ultrabeta Scintillation Counter. A fim de se obterem resultados mais precisos, dever-se-á seguir o manual de instruções para o funcionamento óptimo daquele contador particular de cintilações. Por exemplo, para o contador de cintilações Ultrabeta LKB 1210,0 deve ser seguido o seguinte procedimento. A mecha a ser medida é colocada num frasco de plástico cheio com 12 ml de líquido cintilador (por exemplo, cintilador 299 da Packard). A amostra é então deixada estabilizar durante pelo menos 30 minutos. O frasco é então colocado dentro do LKB 1210 Ultrabeta Scintillation Counter e obtêm-se as respectivas contagens de radioactividade para a mecha.

Para se medir a quantidade da remoção da CMC devida apenas à celulase, é necessária uma medição de uma mecha que tenha sido inoculada ao mesmo tempo, mas que tenha sido tratada na solução de ensaio de lavagem sem celulase. A actividade da celulase é então expressa como percentagem da remoção da CMC radioactivamente marcada. Esta percentagem é calculada por meio da seguinte fórmula:

$$\% \text{ de remoção da CMC radioactiva} = \frac{X_0 - X_C}{X_0} \times 100$$

onde X_0 é a contagem da radioactividade por cintilação de uma mecha tratada com a solução de ensaio de lavagem sem celulase
 X_C é a contagem de cintilação radioactiva de uma mecha tratada com a solução de ensaio de lavagem que contém a celulase a ser avaliada.

12 MAR 1973

1 Considerações estatísticas, confirmação do processo:

5 A fim de se proporcionarem resultados estatisticamente seguros, dever-se-á empregar uma análise estatística padrão. Para o exemplo dado, com a utilização do Ultrabeta Scintillation Counter (Contador de Cintilação Ultrabeta) LKB 1210, verificou-se que se pode utilizar um tamanho de amostra de 3 mechas para cada contagem da radioactividade por cintilação.

10 A fim de se confirmar o processo por meio de uma contra-prova interna, recomenda-se a medição e cálculo da "amostra em branco" de acordo com a EP-A-350098. Isso permitirá detectar e eliminar erros.

15 Interpretação de resultados:

20 O ensaio de detecção descrito proporciona um método rápido, único e seguro para identificar celulasas que satisfazem os critérios de actividade da presente invenção, contra as celulasas que não fazem parte da presente invenção.

25 Verificou-se que uma remoção de 10% ou mais da CMC radioactivamente marcada imobilizada de acordo com o método C14CMC acima indicado, indica que a celulase respectiva satisfaz as exigências da invenção.

30 Será óbvio para os técnicos do ramo que as percentagens de remoção situadas acima de 10%, indicam uma actividade mais elevada para a respectiva celulase. É por isso considerado que a celulase que proporcione mais de 25% ou preferivelmente mais de 50% de remoção da CMC radioactivamente marcada, na concentração de proteínas na solução de ensaio de lavagem de acordo com o método C14CMC, fornecerá indicação de um desempenho da celulase ainda melhor na utilização em detergentes para lavandaria.

35 Foi igualmente considerado que a utilização de

CMC 1993

concentrações mais elevadas de celulase para o método C14CMC, forneceria percentagens de remoção mais elevadas. Não obstante, não existe nenhuma relação linear provada entre a concentração da celulase e a percentagem de remoção obtida por intermédio dela.

Foi igualmente considerado que a utilização de concentrações mais elevadas de celulase para o método C14CMC, forneceria percentagens mais elevadas de remoção.

Quadro I : Solução base de CMC marcada com C₁₄ radioactivo
(Todas as percentagens em peso da solução total)

CMC* Total (a CMC deverá ser de grau detergente, com um grau de substituição de entre cerca de 0,47 e cerca de 0,7)	99,2 x 10 ⁻³ %
Etanol	14985,12 x 10 ⁻³ %
Água desionizada	84915,68 x 10 ⁻³ %
Total:	100%

* A CMC total contém CMC radioactiva e não-radioactiva, para proporcionar uma radioactividade que permita leituras suficientemente claras no contador de cintilação utilizado. Por exemplo, a CMC radioactiva pode ter uma actividade de 0,7 milicuries/g e estar misturada com CMC não radioactiva numa proporção de 1:6,7.

65555

10 MAR 1993

1

Quadro II: Solução de ensaio de lavandaria

(todas as percentagens em peso da solução total)

5	Ácido C ₁₂ alquil benzeno sulfónico	0,110%
	Alquil sulfato de coco (sal TEA)	0,040%
	Etoxilato de álcool C ₁₂₋₁₅ (EO7)	0,100%
	Ácido gordo de coco	0,100%
10	Ácido oleico	0,050%
	Ácido cítrico	0,010%
	Trietanolamina	0,040%
	Etanol	0,060%
15	Propanediol	0,015%
	Hidróxido de sódio	0,030%
	Formato de sódio	0,010%
	Protease	0,006%
20	Água (2,5 mmol/litro Ca ⁺⁺), agente de ajustamento do pH (soluções de HCL ou NaOH) e celulase	Restante para 100%

25

De acordo com a presente invenção, as celulasas preferidas são as semelhantes às descritas no Pedido de Patente Dinamarques 1159/90. Por exemplo, uma preparação de celulase útil nas composições da invenção, pode ser essencialmente constituída por um componente homogéneo de endoglucanase, que é imunoreactivo com um anticorpo criado contra uma celulase de 43kD altamente purificada, derivada do Humicola insolens, DSM 1800, ou que seja homóloga à referida

35

10 MAR 1993

1 endoglucanase de 43kD.

Deverá salientar-se que todos os enzimas de celulase de acordo com a presente invenção, têm de preencher os critérios do ensaio de detecção acima referido. No entanto, no Pedido de Patente Dinamarquês 1159/90, são estabelecidos critérios adicionais que, em combinação com o presente ensaio de detecção, permitem identificar enzimas de celulase preferidos.

Preparações de celulase particularmente úteis nas composições da presente invenção, são aquelas em que, além do ensaio de detecção, o componente de endoglucanase apresenta uma actividade de endoase CMC de, pelo menos, cerca de 50, preferivelmente pelo menos cerca de 60, especialmente cerca de 90 unidades de endoase CMC por mg da proteína total. Um componente de endoglucanase preferido apresenta, particularmente, uma actividade de endoase CMC de, pelo menos, 100 unidades de endoase CMC por miligrama de proteína total.

No presente contexto, o termo "actividade de endoase CMC" (cevu) refere-se à actividade de endoglucanase do componente de endoglucanase, em termos da sua capacidade para degradar a celulose em glucose, celobiose e triose, conforme determinado pela diminuição da viscosidade de uma solução de carboximetil celulose (CMC), após incubação com a preparação de celulase da invenção, conforme descrito pormenorizadamente abaixo.

A actividade de endoase CMC (endoglucanase) pode ser determinada a partir da diminuição da viscosidade da CMC, conforme segue: Prepara-se uma solução de substrato contendo 35 g/l de CMC (Hercules 7 LFD) em 0,1 M de tampão tris a pH 9,0. A amostra do enzima a ser analisada é dissolvida nesse mesmo tampão. 10 ml de solução de substrato e 0,5 ml de solução de enzima são

10 MAR 1993

1 misturados e transferidos para um viscosímetro (por
exemplo, um Haake VT 181, com sensor NV, a 181 rpm),
termostatados para 40°C. As leituras de viscosidade são
5 obtidas logo que possível após a mistura e de novo 30
minutos mais tarde. A quantidade de enzima que reduz a
viscosidade a metade, nestas condições é definida como 1
unidade de actividade de endoase CMC.

10 A electroforese em geleia de poliacrilamida de
SDS (SDS-PAGE) e a focagem isoeléctrica com proteínas alvo
de uma maneira conhecida dos técnicos do ramo, foram
utilizadas para determinar o peso molecular e o ponto
isoeléctrico (pI), respectivamente, do componente de
15 endoglucanase na preparação de celulase útil no presente
contexto. Desta forma, o peso molecular de um componente
específico de endoglucanase foi determinado como sendo
de 43kD. O ponto isoeléctrico desta endoglucanase foi
determinado como sendo de cerca de 5,1.

20 A actividade de celo-bio-hidrolase pode ser
definida como sendo a actividade que tende para a p-
nitrofenil celobiose. A actividade é determinada como μ mole
de nitrofenil libertada por minuto a 37°C e pH 7,0.
Verificou-se que o presente componente de endoglucanase
25 não tinha praticamente nenhuma actividade de celo-bio-
hidrolase.

O componente de endoglucanase na presente
preparação de celulase, foi inicialmente isolado por meio
de processos extensivos de purificação, envolvendo, por
30 exemplo, purificação por CLAP (Cromatografia Líquida de Alta
Pressão) de fase invertida de uma mistura em bruto de
celulase de H.insolens de acordo com a patente Norte-
americana 4.435.307. Este processo resultou,
surpreendentemente, no isolamento de uma endoglucanase de
35 43kD, como único componente com propriedades inesperadamente

Cav. 13937

1 favoráveis, devido a uma actividade de endoglucanase surpreendentemente elevada.

5 Da mesma forma, além do ensaio de detecção, os enzimas de celulase úteis nas presentes composições podem ainda ser definidos como enzimas que apresentam actividade de endoglucanase (no seguimento, referidos como "enzimas de endoglucanase"), enzimas esses que têm a sequência de aminoácidos representada na Lista de Sequências ID#2
10 anexa, ou um seu homólogo que apresente actividade de endoglucanase.

15 No presente contexto, o termo "homólogo" pretende indicar um polipéptido codificado pelo ADN que hibrida à mesma sonda como a codificação do ADN para o enzima de endoglucanase com esta sequência, sob certas condições especificadas (tais como o embebimento prévio com 5xSSC e pré-hibridação durante 1 h a 40°C, numa solução de 20% de formamida, 5x de solução de Denhardt, 50 mM de fosfato de sódio, pH 6,8 e 50 µg de ADN de timo de vitela sonificado e
20 desnaturado, seguido de hibridação na mesma solução, suplementada com 100 µM de ATP durante 18 h a 40°C). O termo pretende incluir derivados da sequência anteriormente mencionada, obtida por adição de um ou mais resíduos de aminoácido, a um ou a ambos os C- e N- terminais da sequência nativa, substituição de um ou mais resíduos de aminoácidos em qualquer uma ou em ambos os locais da sequência de aminoácidos nativa deleção de um ou mais
25 resíduos de aminoácidos em qualquer uma ou ambas as extremidades da sequência de aminoácidos ou num ou mais locais dentro da sequência nativa, ou inserção de um ou mais resíduos de aminoácidos numa ou mais localizações na sequência nativa.

30 O presente enzima de endoglucanase pode ser um enzima produzível por espécies Humicola tais como o Humicola
35

1 insolens, por exemplo a estirpe DSM 1800, depositada em 1 de
Outubro de 1981 na Deutsche Sammlung von Mikroorganismen,
Mascheroder Weg 1B, D-3300 Braunschweig, (RFA) Alemanha, de
5 acordo com o determinado no Tratado de Budapeste sobre o
Reconhecimento Internacional do Depósito de Micro-organismos
para Fins de Processamento de Patentes (o Tratado de
Budapeste) ["Budapest Treaty on the International Recognition
of the Deposit of Microorganisms for the Purposes of Patente
10 Procedure (the Budapest Treaty)"].

Ainda num outro aspecto, os enzimas de celulase
aqui utilizáveis podem ser definidos, para além do ensaio de
detecção, como enzimas de endoglucanase que possuem a
sequência de aminoácidos representada na Listagem de
15 Sequências ID#4 anexa, ou um seu homólogo (conforme
definido acima) que apresente uma actividade de
endoglucanase. O referido enzima de endoglucanase pode
ser um que seja produzível por uma espécie de Fusarium,
tal como o Fusarium oxysporum, por exemplo a estirpe DSM
20 2672, depositado em 6 de Junho de 1983 no Deutsche
Sammlung von Mikroorganismen, Mascheroder Weg 1B, D-3300
Braunschweig, (RFA) Alemanha, de acordo com as determinações
do Tratado de Budapeste.

25 Além disso, considera-se que podem derivar-se
endoglucanases homólogas de outros microrganismos que
produzem enzimas celulóticos, por exemplo espécies de
Trichoderma, Myceliophthora, Phanerochaete, Schizophyllum,
Penicillium, Aspergillus, e Geotricum.

30 Para a preparação industrial da presente
preparação de celulase é, no entanto, preferido empregarem-se
técnicas de ADN recombinante ou outras técnicas que envolvem
ajustamentos de fermentações ou mutação dos microrganismos
envolvidos, para assegurar a sobreprodução das actividades
35 enzimáticas desejadas. Tais métodos e técnicas são conhecidos

18 MAR 1993

na industria e podem facilmente ser executados pelos técnicos do ramo.

O componente de endoglucanase pode assim ser um que se possa produzir por um método constituído pelo cultivo de uma célula hospedeira transformada por um vector ADN recombinante portador de uma sequência ADN que codifica o referido componente de endoglucanase, ou um precursor do referido componente de endoglucanase, bem como sequências de ADN que codificam funções, que permitem a expressão da sequência de ADN que codifica o componente de endoglucanase ou um seu precursor, num meio de cultura e sob condições que permitam a expressão do componente de endoglucanase ou do seu precursor e a recuperação do componente de endoglucanase de dentro da cultura.

Construções de ADN que compreendem uma sequência de ADN codificadora de um enzima de endoglucanase conforme descrito acima, ou uma forma precursora do enzima, incluem as construções de ADN que têm a sequência de ADN conforme se encontra representada na Listagens de Sequências ID#1 e ID#3 anexa, ou uma sua modificação. Exemplos de modificações adequadas da sequência de ADN são as substituições nucleótidas que não dão origem a outra sequência de aminoácido de endoglucanase, mas que correspondem à utilização como códon do organismo hospedeiro em que a construção de ADN é introduzida ou a substituições nucleótidas que originam uma sequência de aminoácidos diferente e por isso, possivelmente, uma estrutura diferente de proteína que poderá dar origem a uma endoglucanase mutante com propriedades diferentes do enzima nativo. Outros exemplos de modificações possíveis são a inserção de um ou mais nucleótidos em cada uma das extremidades da sequência, ou a deleção de um ou mais nucleótidos em qualquer uma das extremidades ou no interior

MAR 1993

1 da sequência.

5 As construções de ADN que codificam os enzimas de endoglucanase utilizáveis aqui, podem ser preparadas sinteticamente por meio de métodos normalizados estabelecidos, por exemplo, o método da fosfoamidite descrito por S.L. Beaucage e M.H. Caruthers, Tetrahedron Letters 22, 1981, pp.1859-1869, ou o método descrito por Matthes e outros, EMBO Journal 3, 1984, pp. 801-805. De acordo com o
10 método da fosfoamidite, os oligonucleótidos são sintetizados, por exemplo num sintetizador automático de ADN, purificados, extintos, ligados e clonados em vectores adequados.

15 Uma construção de ADN que codifica o enzima de endoglucanase ou um seu precursor pode, por exemplo, ser isolado por meio do estabelecimento de uma biblioteca de ADNc ou genómica de um microrganismo produtor de celulase, tal como o Hemicola insolens, DSM 1800 e detecção de clones positivos por meio de procesos convencionais, tal como por hibridação por meio da
20 utilização de sondas oligonucleótidas sintetizadas na base de uma sequência completa ou parcial de aminoácido da endoglucanase, de acordo com técnicas normalizadas (cf. Sambrook e outros, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª Ed. Cold Spring Harbor, 1989), ou por meio de
25 selecção de clones que expressem a actividade enzimática apropriada (isto é, actividade de endoase de CMC conforme definido acima) ou por meio de selecção dos clones produtores da proteína que reage com um anticorpo contra uma celulase
30 nativa (endoglucanase).

Finalmente, a construção de ADN pode ser de origem mista sintética e genómica, mista sintética e de ADNc preparada por meio da ligação dos fragmentos de
35 origem sintética, genómica e de ADNc (conforme fôr apropriado), correspondendo os fragmentos às várias partes

MAR 1997

1 de toda a construção do ADN de acordo com técnicas
normalizadas. A construção de ADN pode também ser preparada
por meio de reacção da cadeia de polimerase utilizando-se
5 iniciadores específicos, por exemplo conforme descrito na
Patente Norte-americana 4.683.202 ou R.K.Saiki e outros.,
Science 239, 1988, pp. 487-491.

Os vectores de expressão recombinantes em que as
construções de ADN acima são inseridas, incluem qualquer
10 vector que possa convenientemente ser sujeito a processos
recombinantes de ADN e a escolha do vector dependerá muitas
vezes da célula hospedeira em que é para ser introduzido.
Assim, o vector pode ser um vector autónomamente replicante,
isto é, um vector que exista como uma entidade extra-
15 cromossómica, cuja replicação é independente da replicação
cromossómica, por exemplo um plasmidio. Alternativamente, o
vector pode ser um que, quando introduzido numa célula
hospedeira, seja integrado no genoma da célula hospedeira e
replicado juntamente com o(s) cromossoma(s) em que tenha sido
20 integrado.

No vector, a sequência do ADN que codifica a
endoglucanase deverá estar operacionalmente ligada a uma
sequência promotora e terminadora adequada. A sequência
25 promotora pode ser qualquer sequência de ADN que
apresente uma actividade transcritiva na célula hospe-
deira escolhida e pode ser derivada de genes codificadores
de proteínas, tanto homólogos como heterólogos da célula
hospedeira. Os processos usados para ligar, respecti-
vamente, as sequências de ADN que codificam a endo-
30 glucanase, a sequência promotora e a terminadora e para as
inserir em vectores adequados, são bem conhecidos dos
técnicos do ramo (cf., por exemplo, Sambrook e outros,
obra citada).

35 As células hospedeiras que são transformadas com

10 MAR 1993

1 as construções de ADN ou os vectores de expressão acima
indicados, podem pertencer, por exemplo, a uma espécie de
5 Aspergillus, mais preferivelmente Aspergillus oryzae ou
Aspergillus niger. As células de fungos podem ser
transformadas por meio de um processo que envolve a formação
e a transformação protoplástica dos protoplastos, seguidas
pela regeneração da parede da célula de uma maneira em si já
conhecida. O uso do Aspergillus como um microrganismo
10 hospedeiro encontra-se descrito na EP 238 023 (da Novo
Industri A/S), cujo conteúdo é aqui incorporado como
referência. A célula hospedeira pode também ser uma célula de
levedura, por exemplo, de uma estirpe de Saccharomyces
cerevisae.

15 Alternativamente, o organismo hospedeiro pode ser
uma bactéria, em particular estirpes de Streptomyces e
Bacillus e E.coli. A transformação das células bacterianas
pode ser executada de acordo com métodos convencionais,
por exemplo, conforme descrito em Sambrook e outros.,
20 Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring
Harbor, 1989.

O rastreio das sequências de ADN apropriadas e a
construção dos vectores podem também ser efectuados por
meio de processos normalizados, cf. Sambrook e outros, obra
25 citada.

O meio utilizado para cultivar as células
hospedeiras transformadas pode ser qualquer meio convencional
adequado ao desenvolvimento das células hospedeiras em
questão. A endoglucanase expressa pode ser convenientemente
segregada no meio de cultura e pode ser recuperada do
mesmo por meio de procedimentos bem conhecidos, que
30 incluem a separação das células do meio por centrifugação
ou filtração, precipitação dos componentes proteínicos do
meio por intermédio de um sal, tal como o sulfato de
35

12 MAR 1984

1 amônio, seguido de processos cromatográficos tais como
cromatografia de troca iônica, cromatografia de afinidade
ou semelhantes.

5 •Por meio de técnicas de ADN recombinante,
conforme acima indicadas, técnicas de purificação de
proteínas, técnicas de fermentação e mutação e outras
técnicas que são bem conhecidas no ramo, é possível
proporcionarem-se endoglucanases de elevada pureza.

10 O nível de celulase da presente composição
descrita acima deverá ser tal que a quantidade da proteína de
enzima a ser libertada na solução de lavagem seja de entre
0,005 e 40 mg/litro de solução de lavagem preferivelmente
0,01 a 10 mg/litro de solução de lavagem.

15 PEROXIDASES

As peroxidases que podem ser empregues com a
presente finalidade, podem ser isoladas de e ser produzidas
por plantas (por exemplo, peroxidase de rábano silvestre) ou
20 de microrganismos tais como fungos ou bactérias. Alguns
fungos preferidos incluem estirpes pertencentes à subdivisão
Deuteromycotina, classe Hyphomycetes, por exemplo, Fusarium,
Humicola, Trichoderma, Myrothecium, Verticillum, Anthomyces,
Caldaryomices, Ulocladium, Embellisia, Cladosporium ou
25 Dreschlera, em particular Fusarium oxysporum (DSM 2672),
Humicola insolens, Trichoderma reesei, Myrothecium
verrucana (IFO 6113), Verticillum alboatrum, Verticillum
dahliae, Arthromyces ramosus (FERM P-7754), Caldariomyces
fumago, Ulocladium chartarum, Embellisia allior Dreschlera
30 halodes.

Outros fungos preferidos incluem estirpes
pertencentes à subdivisão Basidiomycotina, classe
Basidiomycetes, por exemplo Coprinus, Phanerochaete,
35 Coriolus ou Trametes, em particular Coprinus cinereus

AC. MAR. 1993

1 f.microsporus (IFO 8371), Coprinus macrorhizus, Phanerochaete
chrysosporium (por exemplo, NA-12) ou Coriolus versicolor
(por exemplo, PR4 28-A).

5 Outros fungos preferidos incluem estirpes
pertencentes à subdivisão Zigomycotina, classe Mycoraceae,
por exemplo Rhizopus ou Mucor, em particular Mucor hiemalis.

Algumas bactérias preferidas incluem estirpes da
ordem Actinomycetales, por exemplo Streptomyces spheroides
10 (ATCC 23965), Streptomyces thermoviolaceus (IFO 12382) ou
Streptoverticillum verticillium ssp. verticillium.

Outras bactérias preferidas incluem Bacillus
pumillus (ATCC 12905), Bacillus stearothermophilus,
Rhodobacter sphaeroides, Rhodomonas palustri, Streptococcus
15 lactis, Pseudomonas purrocinia (ATCC 15958) ou Pseudomonas
fluorescens (NRRL B-11).

Outras fontes potenciais de peroxidases úteis
estão listadas em B.C.Saunders e outros, obra citada, pp.
41-43.

20 Métodos para produzir enzimas a serem usados de
acordo com a invenção encontram-se descritos na técnica,
conf.por exemplo FEBS Letters 1625, 173(1), Applied and
Environmental Microbiology, Fev.1985, pp. 273-278, Applied
Microbiol.Biotechnol.26, 1987, pp.158-163, Biotechnology
25 Letters 9 (5), 1987, pp. 357-360, Nature 326, 2 de Abril de
1987, FEBS Letters 4270, 209 (2), p.321, EP 179 486, EP 200
565, GB 2 167 421, EP 171 074 e Agric.Biol.Chem. 50 (1),
1986, p.247.

30 Peroxidases particularmente preferidas são
aquelas que são activas aos pH típicos dos licores de
lavagem, isto é, a um pH de 6,5-10,5, preferivelmente 6,5-9,5
e mais preferivelmente 7,5-9,5. Tais enzimas podem ser
isolados por meio de rastreio para detecção da produção de
35 enzima relevante, por meio de microrganismos alcalófilos, por

10. MAR. 1995

1 exemplo utilizando-se um ensaio ABTS descrito em R.E.Childs
e W.G.Bardsley, Biochem.J. 145, 1975, pp. 93-103.

5 Outras peroxidases preferidas são as que
apresentam uma boa termostabilidade, bem como uma boa
estabilidade em relação aos componentes detergentes
vulgarmente utilizados, tais como tensio-activos não iónicos,
catiónicos ou aniónicos, intensificadores de detergência,
fosfato etc.

10 Outro grupo de peroxidases úteis são as pelas
haloperoxidases, tais como peroxidases decolor e bromo .

15 O enzima-peroxidase pode ainda ser um conjunto
que possa ser produzido por um método constituído pela
cultura de uma célula hospedeira transformada com um vector
recombinante de ADN, portador de uma sequência codificadora
de ADN do referido enzima, bem como sequências de ADN
codificadoras de funções que permitem a expressão da
sequência do ADN que codifica o enzima, num meio de cultura,
sob condições que permitem a expressão do enzima e a
20 recuperação do enzima da cultura.

25 Um fragmento de ADN codificador do enzima pode,
por exemplo, ser isolado por meio do estabelecimento de
uma biblioteca de ADNs ou genómica de um microrganismo
produtor do enzima que interessa, como seja um dos
organismos acima mencionados e rastreio para detecção
de clones positivos por meio de processos convencionais
tais como seja por hibridação com sondas oligonu-
cleótidas sintetizadas na base da sequência total ou
30 parcial de aminoácidos do enzima, ou por selecção de
clones que expressem a actividade enzimática apropriada,
ou por meio da selecção de clones produtores de uma
proteína que seja reactiva com um anticorpo contra o
enzima nativo.

35 Uma vez seleccionada, a sequência de ADN pode ser

10. MAR. 1993

1 inserida num vector de expressão replicável adequado,
compreendendo sequências promotora, operadora e terminal
adequadas, que permitem que o enzima seja expresso num
5 organismo hospedeiro particular, bem como uma origem de
replicação, impossibilitando ao vector que se replique no
organismo hospedeiro em questão.

O vector de expressão resultante pode então ser
transformado numa célula hospedeira adequada, como seja uma
10 célula de um fungo, de que exemplos preferidos são uma
espécie do *Aspergillus*, muito preferivelmente *Aspergillus*
oryzae ou *Aspergillus niger*. As células de fungos podem
ser transformadas por meio de um processo que envolve a
formação e transformação protoplástica dos protoplastos,
15 seguida pela regeneração da parede da célula de uma
maneira conhecida de per si. O uso do *Aspergillus* como
micorganismo hospedeiro encontra-se descrito na EP 238.023
(da Novo Industri A/S), cujo conteúdo é aqui incorporado
como referência.

20 Alternativamente, os organismos hospedeiros podem
ser uma bactéria, em particular estirpes de *Streptomyces* e
Bacillus, ou *E. coli*. A transformação das células
bacterianas pode ser efectuada de acordo com métodos
convencionais, por exemplo, conforme descrito em T. Maniatis
25 e outros, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold
Spring Harbor, 1982.

A detecção das sequências de ADN adequadas e a
construção dos vectores, podem ser efectuadas por processos
normalizados, cf. Maniatis e outros, obra citada.

30 O meio utilizado para cultivar as células
hospedeiras transformadas pode ser qualquer meio convencional
adequado para desenvolver as células hospedeiras em questão.
O enzima expresso pode ser convenientemente segregado para no
meio de cultura e pode ser recuperado dele por processos bem
35

19 MAR 1993

1 conhecidos, incluindo a separação das células do meio por
meio de centrifugação ou filtração, precipitação dos
componentes proteínicos do meio por intermédio de um sal tal
5 como sulfato de amónio, seguidos por processos
cromatográficos tais como cromatografia de troca de iões,
cromatografia de afinidade ou semelhantes.

A detecção das sequências de ADN apropriadas e a
construção dos vectores podem também ser executadas por
10 meio de processos normalizados, cf. T. Maniatis e outros,
obra citada.

O meio usado para cultivar as células hospedeiras
transformadas pode ser qualquer meio convencional adequado
para desenvolver as células hospedeiras em questão. O enzima
15 expresso pode ser convenientemente segregado no meio de
cultura e pode ser dele recuperado por processos bem
conhecidos que incluem a separação das células do meio por
centrifugação ou filtração, precipitação dos componentes
proteicos do meio por intermédio de um sal tal como o sulfato
20 de amónio, seguidos por processos cromatográficos tais como
cromatografia de troca de iões, cromatografia de afinidade ou
semelhantes.

No início ou durante o processo, pode ser
adicionado H_2O_2 , numa quantidade de por exemplo 0,001-5 mM,
25 particularmente 0,01-1 mM. Quando se utiliza peroxidase de
Coprinus, são preferidos 0,01-0,25 mM de H_2O_2 e com peroxidase
de B. pumilus 0,1-1 mM H_2O_2 .

O peróxido de hidrogénio pode ser acrescentado
sob a forma de peróxido de hidrogénio ou de um seu precursor,
30 preferivelmente um perborato ou um percarbonato. O nível de
precursor de peróxido de hidrogénio que pode ser usado é
dependente das propriedades específicas da peroxidase
escolhida, por exemplo, a peroxidase de Coprinus deverá ser
35 aplicada numa composição detergente que contenha menos do que

10 MAR 1993

1 5% de perborato.

5 No processo da presente invenção pode ser desejável utilizar-se um processo enzimático para a formação do peróxido de hidrogénio. Portanto o processo de acordo com a invenção pode também compreender a adição de um sistema enzimático (isto é, um enzima e o respectivo substrato) que seja capaz de gerar peróxido de hidrogénio no início ou durante o processo de lavagem e/ou de enxaguamento.

10 Uma tal categoria de sistemas geradores de peróxido de hidrogénio compreende enzimas que conseguem converter oxigénio molecular e um substrato orgânico ou inorgânico, respectivamente em peróxido de hidrogénio e no substrato oxidado. Estes enzimas produzem apenas baixos níveis de peróxido de hidrogénio, mas podem ser empregues mais vantajosamente no processo da invenção, uma vez que a presença de peroxidase assegura uma utilização eficiente do peróxido de hidrogénio produzido.

20 Enzimas geradores de peróxido de hidrogénio preferidos, são aqueles que actuam sobre substratos baratos e fáceis de obter que podem ser convenientemente incluídos em composições detergentes. Um exemplo de um tal substrato é a glucose, que pode ser utilizada para a produção do peróxido de hidrogénio por meio de uma oxidase da glucose. As oxidases adequadas incluem aquelas que actuam sobre os compostos aromáticos tais como os fenóis e substâncias afins, por exemplo oxidases de catecol, lacase. Outras oxidases adequadas são oxidase de urato, oxidase de galactose, oxidases de álcool, oxidases de amina, oxidases de aminoácidos, amiloglucosidase e oxidase de colesterol.

30 Os sistemas enzimáticos preferidos são as oxidases de álcool e de aldeído.

12 MAR 1993

1

Os sistemas mais preferidos para a aplicação em detergentes granulares terão alcoóis sólidos, por exemplo glucose cuja oxidação seja catalizada por oxidase de glucose para ácido glucorónico, com a formação de peróxido de hidrogénio.

5

10

Os sistemas mais preferidos para a aplicação em detergentes líquidos envolverão alcoóis líquidos que poderão também actuar como, por exemplo, solventes. Um exemplo disso é a oxidase de etanol/etanol.

15

A quantidade de oxidase a ser empregue nas composições de acordo com a invenção deverá ser pelo menos suficiente para proporcionar uma geração constante de 0,01 a 10 ppm Avo por minuto, no banho de lavagem. Com a oxidase de glucose isso pode conseguir-se, por exemplo, à temperatura ambiente e a um pH de 6 a 11, preferencialmente 7 a 9, com 50-5000 U/l de oxidase de glucose, 0,005 a 0,5% de glucose, sob arejamento constante.

20

A adição de outro substrato oxidável para a peroxidase, no início ou durante o processo de lavagem e/ou enxaguamento pode melhorar o efeito inibitório da transferência de corantes da peroxidase empregue. Pensa-se que isso poderá ser atribuído à formação de radicais de vida curta ou outros estados oxidados deste substrato que participam no branqueamento ou outra modificação da substância colorida. Exemplos de tais substratos oxidáveis são os iões de metais, por exemplo Mn^{++} iões de haletos, por exemplo iões de cloreto ou de brometo, ou compostos orgânicos tais como fenóis, por exemplo ácido p-hidroxicinâmico ou 2,4-diclorofenol. Outros exemplos de compostos fenólicos que podem ser usados com o objectivo presente, são os fornecidos em M.Kato e S.Shimizu, Plant Cell Physiol. 26(7), 1985, pp. 1291-1301 (particularmente cf.Quadro 1) ou B.C.Saunders e outros, obra citada, p.141 ff. A quantidade

30

35

18. MAR. 1993

1 de substrato oxidável a ser adicionada é, adequadamente, entre cerca de 1 μ M e 1 mM.

5 No processo de acordo com a invenção, a peroxidase será tipicamente acrescentada como componente de uma composição detergente e pode ser adicionada numa quantidade de 0,01 - 100 mg de enzima por litro de líquido de lavagem. Como tal, pode ser incluída na composição detergente sob a forma de um granulado não pulverizável, um líquido, 10 especialmente um líquido estabilizado, ou um enzima protegido. Os granulados não pulverizáveis podem ser produzidos, por exemplo conforme descrito nas patentes Norte-americanas 4.106.991 e 4.661.452 (ambas concedidas a Novo Industri A/S) e podem ser facultativamente 15 revestidos por meio de métodos conhecidos da técnica. As preparações de enzima líquido podem, por exemplo, ser estabilizadas por meio da adição de um poliol tal como o propileno glicol, um açúcar ou álcool de açúcar, ácido láctico ou ácido bórico, de acordo com métodos estabelecidos. 20 São bem conhecidos da técnica outros estabilizadores enzimáticos.

Os enzimas protegidos podem ser preparados de acordo com o método descrito na EP 238.216. A composição 25 detergente pode também ser constituída por um mais substratos para a peroxidase. Geralmente, o pH de uma solução da composição detergente de acordo com a invenção será, de preferência de 7-12, especialmente de 7,5 a 9,5. O pH do banho de lavagem está dependente da peroxidase escolhida, por 30 exemplo a peroxidase de Coprinus deverá ser aplicada a um pH do banho inferior a 9,5.

Auxiliares de detergência

35 A composição de acordo com a presente invenção pode conter os componentes usuais de tais composições

12. MAR 1953

1 detergentes, nas quantidades usuais. Assim, podem encon-
trar-se presentes agentes tensio-activos orgânicos aniônicos,
5 não iónicos, anfotéricos ou zwitteriônicos ou, mais
raramente, cationicos e suas misturas. Agentes tensio-activos
adequados são bem conhecidos da técnica e uma lista extensiva
de tais compostos é apresentada na Patente Norte-americana
nº 3.717.630 e no pedido de patente Norte-americano com o
Nº de Série 589.116.

10 Composições detergentes úteis na presente
invenção contêm entre 1 e 95%, preferivelmente entre 5 e 40%
de um agente tensio-activo não iónico, aniónico,
zwitteriónico ou suas misturas. Intensificadores de
15 detergência, sejam inorgânicos ou orgânicos, fosfáticos ou
não, solúveis na água ou insolúveis e outros sais solúveis na
água, podem estar presentes e sais desse tipo podem ser
empregues, estejam ou não presentes detergentes orgânicos.
Uma descrição de intensificadores adequados é apresentada na
20 Patente Norte-americana nº 3.936.537 e no pedido de patente
Norte-americano com o nº de série 589.116. Os
intensificadores de detergência encontram-se presentes de 0
a 50%, preferivelmente de 5 a 40%.

25 Outros componentes usados em composições
detergentes podem ser empregues, tais como agentes
intensificadores de espuma ou agentes depressores de
espuma, enzimas e estabilizadores ou activadores, agentes
suspensores da sujidade, agentes libertadores da sujidade,
30 abrillantadores ópticos, abrasivos, bactericidas, inibidores
de nódoas, agentes corantes e perfumes.

35 Estes componentes, particularmente os enzimas,
abrillantadores ópticos, agentes corantes e perfumes,
deverão preferivelmente ser escolhidos de tal forma que
sejam compatíveis com o componente branqueador da
composição.

12. MAR 1963

1 As composições detergentes de acordo com a
invenção podem ter formas líquidas, em pasta ou granulares.
O enzima pode ser formulado de qualquer forma conveniente,
5 por exemplo sob a forma de um pó ou de um líquido. O enzima
pode ser estabilizado num líquido por inclusão de
estabilizadores de enzima. Os detergentes líquidos podem
incluir ainda precursores estabilizados de peróxido de
10 hidrogénio. As composições granulares de acordo com a
presente invenção podem também ser em "forma compacta",
isto é, podem ter uma densidade relativamente mais
elevada do que os detergentes granulares convencionais,
isto é, entre 550 e 950 g/l; em tal caso, as composições
15 detergentes granulares de acordo com a presente invenção
conterão uma quantidade inferior de "sal inorgânico de
enchimento", em comparação com detergentes granulares
convencionais; sais de enchimento típicos são os sais de
metais alcalino-terrosos de sulfatos e cloretos,
20 tipicamente sulfato de sódio; os detergentes "compactos"
não compreendem tipicamente mais do que 10% de sal de
enchimento.

25 A presente invenção refere-se igualmente a um
processo para a inibição da transferência de corantes de um
tecido para outro, dos corantes solubilizados e suspensos
encontrados durante as operações de lavandaria que envolvem
tecidos tintos.

30 O processo compreende a colocação dos tecidos
em contacto com uma solução de lavagem conforme anteriormente
descrito.

35 O processo de acordo com a invenção é
convenientemente executado no decorrer do processo de
lavagem. O processo de lavagem é executado, de preferência,
de 5°C a 75°C, especialmente de 20°C a 60°C. O pH da
solução de tratamento é, de preferência, de 7 e 12,

10 MAR 1993

1 especialmente de 7 a 9,5.

5 O processo e as composições de acordo com a invenção podem também ser usados como aditivos durante operações de lavanderia.

Os exemplos seguintes ilustram a presente invenção e os inesperados benefícios superiores de tratamento das cores obtidos com ela.

10 EXEMPLO 1

Importância do parâmetro de desempenho da celulase da reivindicação 1

Foi efectuado o seguinte ensaio:

Condições do ensaio:

15 Temperatura de lavagem: 60° C (ciclo de aquecimento progressivo)

Tempo de lavagem: 40 minutos

pH = 7,5

Dureza da água: 4 mmol/L

20 Concentração do detergente: 1%

Composição do detergente: cf. EPA 350 098 ex.1

Celulases:

25 1) Celluzyme[®] produzido por Novo Nordisk
= referência

2) endoglucanase de 43kD
= celulase de acordo com a invenção

Resultados do ensaio:

30 % de Remoção de C14-CMC pela Celulase

Detergente sem celulase(=referência) 0

Detergente + Celluzyme[®]

35 1,5 mg proteína/L (150x10⁻⁶ %) 12,7
3,0 mg proteína/L (300x10⁻⁶ %) 17,7
4,5 mg proteína/L (450x10⁻⁶ %) 21,5

65555

10 MAR 1993

1 Detergente + endoglucanase com 43kD

0,3 mg proteína/L (30×10^{-6} %) 20,3

5 **Discussão dos resultados:**

Os dados apresentados acima demonstram claramente a importância do parâmetro reivindicado para as celulasas de acordo com a invenção, sobre o Celluzyme existente no mercado.

10

EXEMPLO II

São preparados dois conjuntos de cada um de quatro tipos de composições detergentes, todos baseados num compacto granular.

15

Tipicamente uma composição detergente granular compacta contém os seguintes ingredientes:

20	Sulfonato de alquil benzeno linear (SAL)	11%
	Sulfato de alquilo	5%
	Não iônico	6%
	Citrato trissódio	15%
	Zeolite	32%
	Acido cítrico	6%
	Polímero	4%
25	Quelante	0,2%
	Sulfato de sódio	5%
	Silicato de sódio	2%
	Perborato	0,5%
30	Sulfonato de fenol	0,1%

A composição detergente acima foi suplementada conforme indicado abaixo:

CONJUNTO 1: Com endoglucanase
de 43kD

35

65555

10 MR 1993

1

A) sem endoglucanase com 43kD nem peroxidase = referência

B) com endoglucanase de 43kD

C) com peróxido

5

D) com endoglucanase de 43kD e peroxidase

CONJUNTO 2: Com Celluzyme^R

10

A) sem celluzyme^R nem peroxidase

B) com celluzyme^R

C) com peroxidase

D) com celluzyme^R e peroxidase

15

O primeiro tipo de cada conjunto de composições detergentes não contém qualquer celulase ou peroxidase (composição de referência: A).

20

No primeiro conjunto de composições detergentes a endoglucanase de 43kD é adicionada a um nível de 2 mg de proteína do enzima/litro de solução de lavagem (55 cevú/litro).

25

No segundo conjunto de composições detergentes, o celluzyme^R é adicionado a um nível de 76 mg de proteína de enzima/litro da solução de lavagem (55 cevú/litro).

Condições do ensaio :

30

- Ensaio em máquina de lavar Miele

- Programa para algodão, baixo nível de água (181), ciclo curto.

- 4 ciclos

- Temperatura 40° C

- Composição da carga de lavagem

35

1) 1 Kg de carga limpa :

10 MAR 1993

1

- 150 g de algodão (veludo em bruto)
- 150 g de malha de algodão (roupa interior)
- 200 g de tecido de algodão

5

- 300 g de polietileno/algodão
- 200 g de polietileno

10

2) Para a graduação da brancura: 3 artigos brancos, sujos (4 repetições de cada um).

3) 10 por 5 cm de corante vermelho ácido 151 em "nylon": Para criar um nível baixo de transferência de corante.

15

- 4) Nódosas preparadas para proporcionarem uma fonte de sujidade típica de lavandaria.
- água dura (15 grs/3,78 litros).
 - Concentração de detergente = 0,6%.

20

Processo do ensaio :

25

A intensão deste ensaio é a de comparar a brancura dos artigos têxteis, lavados cumulativamente por 4 vezes, entre as composições a serem ensaiadas e a composição de referência. Para este ensaio são utilizados três artigos sujos. Para cada tratamento de um artigo são utilizadas quatro repetições. Os artigos a serem examinados são expostos numa superfície de graduação, plana e de cor neutra, colocada paralelamente à fonte de iluminação. Como fonte luminosa é usada uma luz fluorescente : Philips 27 "fria" de cõr TL 40/57 que produz 1080 WATTS de luz, concebida para corresponder à luz do dia normal (D65). A cor T° é de 7400°K, a reflectância da luz é excelente (94) e a emissão luminosa é de 46 LM/W.

35

65555

19. MAR. 1993

1

As diferenças são indicadas em unidades de painel de contagem (upc), sendo positivamente melhores quanto ao desempenho do que as do tratamento de referência.

5

Escala de graduação (graduação UPC)

0 = Igual

1 = Penso que esta é melhor

2 = Sei que esta é um pouco melhor

10

3 = Esta é muito melhor

4 = Esta é muitissimo melhor

15

Os dados da graduação UPC são estatisticamente recontados, obtem-se uma média das 4 repetições, a DMS (diferença menos significativa) está mencionada nos quadros I e II.

QUADRO I :

Resultados do ensaio : peroxidase / cellulzyme^R

20

	B vs. A	C vs. A	D vs. A	DMS
Média - 2 ciclos	0,28	1,67 s	1,80 s	0,61
Média - 3 ciclos	0,22	2,02 s	2,26 s	0,50
Média - 4 ciclos	0,68	2,48 s	2,66 s	0,76

35

65555



1

QUADRO II :

Resultados do ensaio : peroxidase / endoglucanase de 43kD

5

	B vs. A	C vs. A	D vs. A	DMS
Média - 2 ciclos	-0,10	1,38 ±	1,97 ±	0,40

10

Média - 3 ciclos	-0,30	2,25 ±	2,51	0,46
---------------------	-------	--------	------	------

Média - 4 ciclos	0,07	2,44 ±	2,97 ±	0,29
---------------------	------	--------	--------	------

15

Conclusão :

Os resultados acima mostram claramente que a combinação peroxidase/43kD da presente invenção, fornece um melhor desempenho estatisticamente significativo do que a soma das acções individuais de ambos os ingredientes.

20

EXEMPLOS III a VIII

Fazem-se as seguintes composições.

25

a) Detergente granular compacto : exemplos II a IV.

30

EXEMPLOS	III	IV
Sulfonato linear de alquil		
benzeno	11,4	10,70
Sulfato de sebo alquilo	1,80	2,40
Sulfato C ₁₅ alquilo	3,00	3,10
Alcool C ₁₅ etoxilado 7 vezes	4,00	4,00
Alcool seboso etoxilado 11 vezes	1,80	1,80
Dispersante	0,07	0,1
Silicone líquido	0,80	0,80

35

10 MAR 1993

65555

1	Citrato trissódico	14,00	15,00
	Acido cítrico	3,00	2,50
	Zeolite	32,5	32,10
5	Copolímero de ácido maleico		
	ácido acrílico	5,00	5,00
	DETMFA	1,00	0,20
	Celulase de endoglucanase de 43kD	0,03	0,025
	Alcalase	0,60	0,60
10	Lipase	0,36	0,40
	Amilase	0,30	0,30
	Silicato de sódio	2,00	2,50
	Sulfato de sódio	3,50	5,20
	PVP	0,30	0,50
15	Perborato	0,5	1
	Fenol sulfonato	0,1	0,2
	Peroxidase	0,1	0,1
	Componentes menores	até 100	

20 b) Detergente granular convencional : exemplos V e VI

EXEMPLO	V	IV
Sulfonato de sódio C ₁₂ alquil		
benzeno linear	6,5	8,0
25 Sulfato de sódio	15,0	18,0
Zeolite A	26,0	22,0
Nitriloacetato de sódio	5,0	5,0
Celulalase de endoglucanase de 43kD	0,02	0,03
30 PVPO,	5	0,7
TAED	3,0	3,0
Acido bórico	4,0	-
Perborato	0,5	1
Sulfonato de fenol	0,1	0,2
35 Peroxidase	0,1	0,2

10 MAR 1993

65555

1

Componentes menores até 100

c) Detergente líquido : exemplos VII e VIII

5

EXEMPLOS	VII	VIII
Ácido C ₁₂₋₁₄ alcenil succínico	3,0	8,0
Monohidrato de ácido cítrico	10,0	15,0
Sulfato de sódio C ₁₂₋₁₅ alquilo	8,0	8,0
10 Sulfato de sódio de álcool C ₁₂₋₁₅ etoxilado 2 vezes	-	3,0
Alcool C ₁₂₋₁₅ etoxilado 7 vezes	-	8,0
Alcool C ₁₂₋₁₅ etoxilado 5 vezes	8,0	-
Penta dietileno triamina (Ácido metileno fosfónico)	0,2	-
15 Ácido oleico	1,8	-
Etanol	4,0	4,0
Propanediol	2,0	2,0
Protease	0,2	0,2
20 Celulase de endoglucanase de 43kD	0,2	0,05
PVP	1,0	2,0
Supressor de espumas	0,15	0,15
NaOH	até	pH 7,5
Perborato	0,5	1
25 Sulfonato de fenol	0,1	0,2
Peroxidase	0,4	0,1
Água e componentes menores	até 100 partes	

30

INFORMAÇÃO PARA A SEQ.ID Nº 1 :

- (i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA
- (A) Comprimento : 1060 pares de base
- (B) Tipo: ácido nucleico
- (C) Tipo de cordão: simples
- 35 (D) Topologia : linear

Mod. 71 - 20.000 ex. - 90/08

10 MAR 1997

65555

- 1 (ii) TIPO DE MOLÉCULA : ADNc
 (iii) HIPOTÉTICA : NÃO
 (iv) FONTE ORIGINAL
 5 (A) Organismo : Humicola insolens
 (B) Estirpe: DSM 1800
 (ix) CARACTERÍSTICA
 (A) Nome/Chave : péptido mat.
 (B) Localização : 73..927
 10 (ix) CARACTERÍSTICA
 (A) Nome/Chave : péptido sig.
 (B) Localização : 10..72
 (ix) CARACTERÍSTICA
 (A) Nome/Chave : CDS
 15 (B) Localização : 10..927

DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ.ID.Nº 1:

GGATCCAAG ATG CGT TCC TCC CCC CTC CTC CCG TCC GCC GTT GTG GCC	48
Met Arg Ser Ser Pro Leu Leu Pro Ser Ala Val Val Ala	
20 -21 -20 -15 -10	
GCC CTG CCG GTG TTG GCC CTT GCC GCT GAT GGC AGG TCC ACC CGC TAC	96
Ala Leu Pro Val Leu Ala Leu Ala Ala Asp Gly Arg Ser Thr Arg Tyr	
25 -5 1 5	
TGG GAC TGC TGC AAG CCT TCG TGC GGC TGG GCC AAG AAG GCT CCC GTC	144
Trp Asp Cys Cys Lys Pro Ser Cys Gly Trp Ala Lys Lys Ala Pro Val	
10 15 20	
30 AAC CAG CCT GTC TTT TCC TGC AAC GCC AAC TTC CAG CGT ATC ACG GAC	192
Asn Gln Pro Val Phe Ser Cys Asn Ala Asn Phe Gln Arg Ile Thr Asp	
25 30 35 40	

65555

1	TTC GAC GCC AAG TCC GGC TGC GAG CCG GGC GGT GTC GCC TAC TCG TGC	240
	Phe Asp Ala Lys Ser Gly Cys Glu Pro Gly Gly Val Ala Tyr Ser Cys	
	45 50 55	
5	GCC GAC CAG ACC CCA TGG GCT GTG AAC GAC GAC TTC GCG CTC GGT TTT	288
	Ala Asp Gln Thr Pro Trp Ala Val Asn Asp Asp The ala Leu Gly Phe	
	60 65 70	
10	GCT GCC ACC TCT ATT GCC GGC AGC AAT GAG GCG GGC TGG TGC TGC GCC Ala Ala Thr Ser Ile Ala Gly Ser Asn Glu Ala Gly Trp Cys Cys Ala	336
	75 80 85	
	TGC TAC GAG CTC ACC TTC ACA TCC GGT CCT GTT GCT GGC AAG AAG ATG Cys Tyr Glu Leu Thr Phe Thr Ser Gly Pro Val Ala Gly Lys Lys Met	384
	90 95 100	
15	GTC GTC CAG TCC ACC AGC ACT GGC GGT GAT CTT GGC AGC AAC CAC TTC Val Val Gln Ser Thr Ser Thr Gly Gly Asp Leu Gly Ser Asn His Phe	432
	105 110 115 120	
	GAT CTC AAC ATC CCC GGC GGC GGC GTC GGC ATC TTC GAC GGA TGC ACT Asp Leu Asn Ile Pro Gly Gly Val Gly Ile Phe Asp Gly Cys Thr	480
	125 130 135	
20	CCC CAG TTC GGC GGT CTG CCC GGC CAG CGC TAC GGC GGC ATC TCG TCC Pro Gln Phe Gly Gly Leu Pro Gly Gln Arg Tyr Gly Gly Ile Ser Ser	528
	140 145 150	
	CGC AAC GAG TGC GAT CGG TTC CCC GAC GCC CTC AAG CCC GGC TGC TAC Arg Asn Glu Cys Asp Arg Phe Pro Asp Ala Leu Lys Pro Gly Cys Tyr	576
	155 160 165	
	TGG CGC TTC GAC TGG TTC AAG AAC GCC GAC AAT CCG AGC TTC AGC TTC Trp Arg Phe Asp Trp Phe Lys Asn Ala Asp Asn Pro Ser Phe Ser Phe	624
	170 175 180	
25	CGT CAG GTC CAG TGC CCA GCC GAG CTC GTC GCT CGC ACC GGA TGC CGC Arg Gln Val Gln Cys Pro Ala Glu Leu Val Ala Arg Thr Gly Cys Arg	672
	185 190 195 200	
	CGC AAC GAC GAC GGC AAC TTC CCT GCC GTC CAG ATC CCC TCC AGC AGC Arg Asn Asp Asp Gly Asn Phe Pro Ala Val Gln Ile Pro Ser Ser Ser	720
	205 210 215	
30	ACC AGC TCT CCG GTC AAC CAG CCT ACC AGC ACC AGC ACC ACG TCC ACC Thr Ser Ser Pro Val Asn Gln Pro Thr Ser Thr Ser Thr Thr Ser Thr	768
	220 225 230	
	TCC ACC ACC TCG AGC CCG CCA GTC CAG CCT ACG ACT CCC AGC GGC TGC Ser Thr Thr Ser Ser Pro Pro Val Gln Pro Thr Thr Pro Ser Gly Cys	816
	235 240 245	
35	ACT GCT GAG AGG TGG GCT CAG TGC GGC GGC AAT GGC TGG AGC GGC TGC Thr Ala Glu Arg Trp Ala Gln Cys Gly Gly Asn Gly Trp Ser Gly Cys	864
	250 255 260	

Mod. 71 - 20,000 ex. - 90/08

70 MAR 1993

65555

1 ACC ACC TGC CTC GCT GGC AGC ACT TGC ACG AAG ATT AAT GAC TGG TAC 912
Thr Thr Cys Val Ala Gly Ser Thr Cys Thr Lys Ile Asn Asp Trp Tyr
265 270 275 280

5 CAT CAG TGC CTG TAGACGCAGG GCAGCTTGAG GGCCTTACTG GTGSCCGCAA 964
His Gln Cys Leu
285

10 CGAAATGACA CTCCCAATCA CTGTATTAGT TCTTGACAT AATTTCGTCA TCCCTCCAGG 1024
GATTGTCACA TAAATGCAAT GAGGAACAAT GAGTAC 1060

INFORMAÇÃO PARA A SEQ.ID.Nº 2:

15 (i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA
(A) Comprimento : 305 aminoácidos
(B) Tipo : aminoácido
(D) Topologia : linear
(ii) TIPO DE MOLÉCULA : proteína

20 DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ.ID.Nº 2:

Met Arg Ser Ser Pro Leu Leu Pro Ser Ala Val Val Ala Ala Leu Pro
-21 -20 -15 -10

25 Val Leu Ala Leu Ala Ala Asp Gly Arg Ser Thr Arg Tyr Trp Asp Cys
-5 1 5 10
Cys Lys Pro Ser Cys Gly Trp Ala Lys Lys Ala Pro Val Asn Gln Pro
15 20 25

30 Val Phe Ser Cys Asn Ala Asn Phe Gln Arg Ile Thr Asp Phe Asp Ala
30 35 40

35 Lys Ser Gly Cys Glu Pro Gly Gly Val Ala Tyr Ser Cys Ala Asp Gln
45 50 55

40

Ading
 10 MAR 1993

65555

1	Thr	Pro	Tro	Ala	Val	Asn	Asp	Asp	Phe	Ala	Leu	Gly	Phe	Ala	Ala	Thr	60	65	70	75
5	Ser	Ile	Ala	Gly	Ser	Asn	Glu	Ala	Gly	Trp	Cys	Cys	Ala	Cys	Tyr	Glu	80	85	90	
	Leu	Thr	Phe	Thr	Ser	Gly	Pro	Val	Ala	Gly	Lys	Lys	Met	Val	Val	Gln	95	100	105	
10	Ser	Thr	Ser	Thr	Gly	Gly	Asp	Leu	Gly	Ser	Asn	His	Phe	Asp	Leu	Asn	110	115	120	
	Ile	Pro	Gly	Gly	Gly	Val	Gly	Ile	Phe	Asp	Gly	Cys	Thr	Pro	Gln	Phe	125	130	135	
15	Gly	Gly	Leu	Pro	Gly	Gln	Arg	Tyr	Gly	Gly	Ile	Ser	Ser	Arg	Asn	Glu	140	145	150	155
20	Cys	Asp	Arg	Phe	Pro	Asp	Ala	Leu	Lys	Pro	Gly	Cys	Tyr	Trp	Arg	Phe	160	165	170	
	Asp	Trp	Phe	Lys	Asn	Ala	Asp	Asn	Pro	Ser	Phe	Ser	Phe	Arg	Gln	Val	175	180	185	
25	Gln	Cys	Pro	Ala	Glu	Leu	Val	Ala	Arg	Thr	Gly	Cys	Arg	Arg	Asn	Asp	190	195	200	
30	Asp	Gly	Asn	Phe	Pro	Ala	Val	Gln	Ile	Pro	Ser	Ser	Ser	Thr	Ser	Ser	205	210	215	
	Pro	Val	Asn	Gln	Pro	Thr	Ser	Thr	Ser	Thr	Thr	Ser	Thr	Ser	Thr	Thr	220	225	230	235

35

Mod. 71 - 20,000 ex. - 90/03

65555

19.11.1993

1 Ser Ser Pro Pro Val Gln Pro Thr Thr Pro Ser Gly Cys Thr Ala Glu
240 245 250

5 Arg Trp Ala Gln Cys Gly Gly Asn Gly Trp Ser Gly Cys Thr Thr Cys
255 260 265

Val Ala Gly Ser Thr Cys Thr Lys Ile Asn Asp Trp Tyr His Gln Cys
270 275 280

10 Leu

INFORMAÇÃO PARA A SEQ.ID Nº 3

- 15 (i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA
(A) COMPRIMENTO: 1473 pares de base
(B) TIPO : ácido nucleico
(C) TIPO DE CORDÃO : simples
(D) TOPOLOGIA : linear
20 (ii) TIPO DE MOLÉCULA : ADNc
(iii) HIPOTÉTICA : NAO
(iv) SENTIDO INVERSO : NAO
(vi) FONTE ORIGINAL
(A) ORGANISMO: fusarium oxysporum
(B) ESTIRPE : DSM 2672
25 (ix) CARACTERÍSTICA
(A) NOME/CHAVE : CDS
(B) LOCALIZAÇÃO : 97..1224

30 DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ.ID.Nº 3:

GAATTCGCGG CCGTCATTC ACTTCATTCA TTCTTTAGAA TTACATACAC TCTCTTTCAA 60

AACAGTCACT CTTTAACAA AACAACTTTT GCAACA ATG CGA TCT TAC ACT CTT 114

35 Met Arg Ser Tyr Thr Leu
1 5

Handwritten signature
 01 MAR 1993

65555

1	CTC GGC CTG GGC GGC CCT CTC GCC GTG AGT GCT GCT TCT GGA AGC GGT	162
	Leu Ala Leu Ala Gly Pro Leu Ala Val Ser Ala Ala Ser Gly Ser Gly	
	10 15 20	
5	CAC TCT ACT CGA TAC TGG GAT TGC TGC AAG CCT TCT TGC TCT TGG AGC	210
	His Ser Thr Arg Tyr Trp Asp Cys Cys Lys Pro Ser Cys ser Trp Ser	
	25 30 35	
10	GGA AAG GCT GCT GTC AAC GCC CCT GCT TTA ACT TGT GAT AAG AAC GAC	258
	Gly Lys ala Ala Val Asn Ala Pro ala Leu Thr Cys Asp Lys Asn Asp	
	40 45 50	
15	AAC CCC ATT TCC AAC ACC AAT GCT GTC AAC GGT TGT GAG GGT GGT GGT	306
	Asn Pro Ile Ser Asn Thr Asn Ala Val Asn Gly Cys Glu Gly Gly Gly	
	55 60 65 70	
20	TCT GCT TAT GCT TGC ACC AAC TAC TCT CCC TGG GCT GTC AAC GAT GAG	354
	Ser Ala Tyr Ala Cys Thr Asn Tyr Ser Pro Trp Ala Val Asn Asp Glu	
	75 80 85	
25	CTT GCC TAC GGT TTC GCT GCT ACC AAG ATC TCC GGT GGC TCC GAG GCC	402
	Leu Ala Tyr Gly Phe Ala Ala Thr Lys Ile Ser Gly Gly Ser Glu Ala	
	90 95 100	
30	AGC TGG TGC TGT GCT TGC TAT GCT TTG ACC TTC ACC ACT GGC CCC GTC	450
	Ser Trp Cys Cys Ala Cys Tyr Ala Leu Thr Phe Thr Thr Gly Pro Val	
	105 110 115	
35	AAG GGC AAG AAG ATG ATC GTC CAG TCC ACC AAC ACT GGA GGT GAT CTC	498
	Lys Gly Lys Lys Met Ile Val Gln Ser Thr Asn Thr Gly Gly Asp Leu	
	120 125 130	

Mod. 71 - 20.000 ex. - 90/08

66 MAR 1993

1	GGC GAC AAC CAC TTC GAT CTC ATG ATG CCC GGC GGT GGT GTC GGT ATC Gly Asp Asn His Phe Asp Leu Met Met Pro Gly Gly Gly Val Gly Ile 135 140 145 150	546
5	TTC GAC GGC TGC ACC TCT GAG TTC GGC AAG GCT CTC GGC GGT GCC CAG Phe Asp Gly Cys Thr Ser Glu Phe Gly Lys Ala Leu Gly Gly Ala Gln 155 160 165	594
	TAC GGC GGT ATC TCC TCC CGA AGC GAA TGT GAT AGC TAC CCC GAG CTT Tyr Gly Gly Ile Ser Ser Arg Ser Glu Cys Asp Ser Tyr Pro Glu Leu 170 175 180	642
	CTC AAG GAC GGT TGC CAC TGG CGA TTC GAC TGG TTC GAG AAC GCC GAC Leu Lys Asp Gly Cys His Trp Arg Phe Asp Trp Phe Glu Asn Ala Asp 185 190 195	690
10	AAC CCT GAC TTC ACC TTT GAG CAG GTT CAG TGC CCC AAG GCT CTC CTC Asn Pro Asp Phe Thr Phe Glu Gln Val Gln Cys Pro Lys Ala Leu Leu 200 205 210	738
	GAC ATC AGT GGA TGC AAG CGT GAT GAC GAC TCC AGC TTC CCT GCC TTC Asp Ile Ser Gly Cys Lys Arg Asp Asp Asp Ser Ser Phe Pro Ala Phe 215 220 225 230	786
15	AAG GTT GAT ACC TCG GCC AGC AAG CCC CAG CCC TCC AGC TCC GCT AAG Lys Val Asp Thr Ser Ala Ser Lys Pro Gln Pro Ser Ser Ser Ala Lys 235 240 245	834
	AAG ACC ACC TCC GCT GCT GCT GCC GCT CAG CCC CAG AAG ACC AAG GAT Lys Thr Thr Ser Ala Ala Ala Ala Gln Pro Gln Lys Thr Lys Asp 250 255 260	882
20	TCC GCT CCT GTT GTC CAG AAG TCC TCC ACC AAG CCT GCC GCT CAG CCC Ser Ala Pro Val Val Gln Lys Ser Ser Thr Lys Pro Ala Ala Gln Pro 265 270 275	930
	GAG CCT ACT AAG CCC GCC GAC AAG CCC CAG ACC GAC AAG CCT GTC GCC Glu Pro Thr Lys Pro Ala Asp Lys Pro Gln Thr Asp Lys Pro Val Ala 280 285 290	978
	ACC AAG CCT GCT GCT ACC AAG CCC GTC CAA CCT GTC AAC AAG CCC AAG Thr Lys Pro Ala Ala Thr Lys Pro Val Gln Pro Val Asn Lys Pro Lys 295 300 305 310	1026
25	ACA ACC CAG AAG GTC CGT GGA ACC AAA ACC CGA GGA AGC TGC CCG GCC Thr Thr Gln Lys Val Arg Gly Thr Lys Thr Arg Gly Ser Cys Pro Ala 315 320 325	1074
	AAG ACT GAC GCT ACC GCC AAG GCC TCC GTT GTC CCT GCT TAT TAC CAG Lys Thr Asp Ala Thr Ala Lys Ala Ser Val Val Pro Ala Tyr Tyr Gln 330 335 340	1122
30	TGT GGT GGT TCC AAG TCC GCT TAT CCC AAC GGC AAC CTC GCT TGC GCT Cys Gly Gly Ser Lys Ser Ala Tyr Pro Asn Gly Asn Leu Ala Cys Ala 345 350 355	1170
	ACT GGA AGC AAG TGT GTC AAG CAG AAC GAG TAC TAC TCC CAG TGT GTC Thr Gly Ser Lys Cys Val Lys Gln Asn Glu Tyr Tyr Ser Gln Cys Val 360 365 370	1218
35		

06 MAR 1993

623435

1 CCG AAC TAAA GGTAG ATCCATCGGT TGTGGAAGAG ACTATGCBTC TCAGAAGGGA 1274
 PRO ASN
 575

5 TCGTCGCATG ACCAGGCTTG TCATTGTATA GCATGBCATC CTGGACCAAG TGTTCGACCC 1334
 TTGTTGTACA TACTATATCT TCATTGTATA TATTTAGACA CATAGATAGC CTCTTGTCAG 1394
 CGACAACTGG CACAAAABA CTTGGCAGGC TTGTTCAATA TTGACACAGT TTCCTCCATA 1454
 AAAAAAATAA AAAAAAAA 1475

10

INFORMAÇÃO PARA A SEQ.ID Nº 4

- (1) CARACTERÍSTICAS DA SEQUENCIA
- (A) COMPRIMENTO : 376 aminoácidos
- (B) TIPO : aminoácidos
- (C) TOPOLOGIA : linear
- (11) TIPO DE MOLECULA : proteína

15

DESCRIÇÃO DA SEQUENCIA: SEQ.ID.Nº 4:

SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:4:

20 Met Arg Ser Tyr Thr Leu Leu Ala Leu Ala Gly Pro Leu Ala Val Ser
 1 5 10 15

Ala Ala Ser Gly Ser Gly His Ser Thr Arg Tyr Trp Asp Cys Cys Lys
 20 25 30

Pro Ser Cys Ser Trp Ser Gly Lys Ala Ala Val Asn Ala Pro Ala Leu
 35 40 45

25 Thr Cys Asp Lys Asn Asp Asn Pro Ile Ser Asn Thr Asn Ala Val Asn
 50 55 60

Gly Cys Glu Gly Gly Gly Ser Ala Tyr Ala Cys Thr Asn Tyr Ser Pro
 65 70 75 80

Trp Ala Val Asn Asp Glu Leu Ala Tyr Gly Phe Ala Ala Thr Lys Ile
 85 90 95

30 Ser Gly Gly Ser Glu Ala Ser Trp Cys Cys Ala Cys Tyr Ala Leu Thr
 100 105 110

Phe Thr Thr Gly Pro Val Lys Gly Lys Lys Met Ile Val Gln Ser Thr
 115 120 125

Asn Thr Gly Gly Asp Leu Gly Asp Asn His Phe Asp Leu Met Met Pro
 130 135 140

35 Gly Gly Gly Val Gly Ile Phe Asp Gly Cys Thr Ser Glu Phe Gly Lys
 145 150 155 160

65555

Handwritten signature
10 MAR 1993

1	Ala Leu Gly Gly Ala Gln Tyr Gly Gly Ile Ser Ser Arg Ser Glu Cys	165	170	175
5	Asp Ser Tyr Pro Glu Leu Leu Lys Asp Gly Cys His Trp Arg Phe Asp	180	185	190
	Trp Phe Glu Asn Ala Asp Asn Pro Asp Phe Thr Phe Glu Gln Val Gln	195	200	205
10	Cys Pro Lys Ala Leu Leu Asp Ile Ser Gly Cys Lys Arg Asp Asp Asp	210	215	220
	Ser Ser Phe Pro Ala Phe Lys Val Asp Thr Ser Ala Ser Lys Pro Gln	225	230	235
15	Pro Ser Ser Ser Ala Lys Lys Thr Thr Ser Ala Ala Ala Ala Ala Gln	245	250	255
20	Pro Gln Lys Thr Lys Asp Ser Ala Pro Val Val Gln Lys Ser Ser Thr	260	265	270
	Lys Pro Ala Ala Gln Pro Glu Pro Thr Lys Pro Ala Asp Lys Pro Gln	275	280	285
25	Thr Asp Lys Pro Val Ala Thr Lys Pro Ala Ala Thr Lys Pro Val Gln	290	295	300
30	Pro Val Asn Lys Pro Lys Thr Thr Gln Lys Val Arg Gly Thr Lys Thr	305	310	315
	Arg Gly Ser Cys Pro Ala Lys Thr Asp Ala Thr Ala Lys Ala Ser Val	325	330	335
35				

Mod. 71 - 20,000 ex. - 90/08

65555

1

Val Pro Ala Tyr Tyr Gln Cys Gly Gly Ser Lys Ser Ala Tyr Pro Asn
340 345 350

5

Gly Asn Leu Ala Cys Ala Thr Gly Ser Lys Cys Val Lys Gln Asn Glu
355 360 365

10

Tyr Tyr Ser Gln Cys Val Pro Asn
370 375

Lisboa, 10. MAR 1993

15

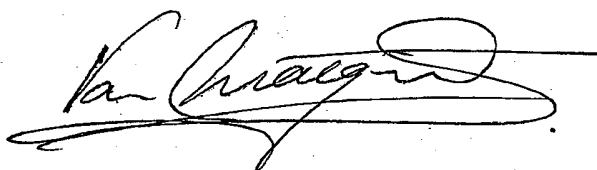
Por THE PROCTER & GAMBLE COMPANY

20

25

30

35



47

VASCO MARQUES LEME
Agente Oficial
da Propriedade Industrial
Serviço-Arco da Conceição, 3, 1.º-1100 LISBOA

REIVINDICAÇÕES

12. - Composição inibidora da transferência de corante constituída por

- um enzima que apresenta uma actividade de peroxidase,
- um peróxido de hidrogénio ou um precursor de peróxido de hidrogénio, ou um sistema enzimático capaz de gerar peróxido de hidrogénio,
- um substrato oxidável adicional, e
- uma celulase, caracterizado por essa celulase fornecer pelo menos 10% de remoção da carboximetil celulose imobilizada, radioactivamente marcada de acordo com o método C14CMC a $25 \times 10^{-6}\%$ em peso da proteína da celulose na solução de ensaio.

22.- Composição inibidora da transferência de corante, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada por a celulase ser essencialmente constituída por um componente homogêneo de endoglucanase, que é imunoreactivo com um anticorpo criado contra uma celulase cerca de 43 kD, altamente purificada, derivada do Humicola insolens, DSM 1800, ou que é homólogo dessa endoglucanase 43kD.

3A.- Composição inibidora da transferência de corante, de acordo com a reivindicação 2, caracterizada por o componente endoglucanase da referida celulase ter um ponto iso-eléctrico de cerca de 5,1.

42.- Composição detergente de acordo com as reivindicações 2 ou 3, caracterizada por o referido componente endoglucanase ser produzido por um método que compreende o cultivo de uma célula hospedeira transformada,

10 MAR 1993

1 com um vector de ADN recombinante que transporta uma
sequência de ADN que codifica o referido componente de
5 endoglucanase, bem como sequências de ADN que codificam
funções, que permitem que a expressão da sequência de ADN
codifique o componente de endoglucanase, ou um seu
percursor, num meio de cultura e sob condições que
10 permitem a expressão do componente de endoglucanase ou do
seu percursor e a recuperação do componente de endoglucanase
da cultura.

5a.- Composição inibidora da transferência de
corante de acordo com a reivindicação 1, caracterizada por a
15 celulase ter a sequência de aminoácidos representada na
listagem de sequências junta ID#2, ou ser homóloga a ela,
apresentando actividade de endoglucanase.

6a.- Composição inibidora da transferência de
20 corante de acordo com a reivindicação 3, caracterizada por a
referida celulase poder ser produzida por uma espécie do
género Humicola, por exemplo, Humicola insolens.

7. Composição detergente de acordo com a
25 reivindicação 1, caracterizada por o composto de celulase ser
um enzima de endoglucanase, que tem a sequência de
aminoácidos representada na listagem de sequências junta
ID#4, ou é um seu homólogo que apresenta actividade de
30 endoglucanase.

8a.- Composição detergente de acordo com a
reivindicação 7, caracterizada por o referido enzima de
glucanase ser produzido por uma espécie de Fusarium, por
35 exemplo, Fusarium oxysporum.

10 MAR 1998

1 9a.- Composição detergente de acordo com qualquer
uma das reivindicações 5 a 8, caracterizada por o referido
enzima ser produzido por uma construção de ADN constituindo
5 uma sequência de ADN que codifica o enzima.

10a.- Composição detergente de acordo com a
reivindicação 9, caracterizado por a sequência de ADN ser
conforme representado nas listagens de sequências anexas ID#1
10 ou ID#2.

11a.- Composição detergente de acordo com
qualquer uma das reivindicações 5 a 10, caracterizada por
a referida célula hospedeira ser uma estirpe de um fungo
15 tal como Tricoderma ou Aspergillus, preferivelmente
Aspergillus oryzae ou Aspergillus niger, ou uma célula de
levedura pertencente a uma estirpe de Hansenula ou
Saccharomyces, por exemplo, uma estirpe de Saccharomyces
20 cerevisiae.

12a.- Composição detergente de acordo com
qualquer uma das reivindicações 5 a 10, caracterizada por a
referida célula hospedeira ser uma estirpe de uma bactéria,
25 por exemplo, Bacillus, Streptomyces ou E.coli.

13a.- Composição inibidora da transferência de
corante, de acordo com as reivindicações 1 a 12,
caracterizada por o referido enzima que apresenta actividade
de peroxidase, ser derivado de uma estirpe de Coprinus ou
30 B.purillus.

14a.- Composição inibidora da transferência de
corante de acordo com as reivindicações 1 a 13, caracterizada
35 por o precursor de peroxidase de hidrogénio ser um perborato

02 MAR 1997

1

ou um percarbonato.

5

15A.- Composição inibidora da transferência de corante de acordo com a reivindicação 14, caracterizada por o nível do referido perborato ser a partir de 1 μ M a 10mM da solução de lavagem.

10

16A.- Composição inibidora da transferência de corante de acordo com as reivindicações 1 a 15, caracterizada por o referido substrato oxidável adicional ser seleccionado de entre um ião de metal, um ião de haleto ou um composto orgânico tal como um fenol, por exemplo ácido p-hidro-xicinâmico ou 2,4-diclorofenol ou um sulfonato de fenol.

15

20

17A.- Composição inibidora da transferência de corante de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 16, caracterizada por o referido sistema enzimático capaz de gerar peroxidase de hidrogénio, ser uma oxidase seleccionada do grupo constituído por oxidase de glucose, oxidase de urato, oxidase de galactose, oxidases alcoólicas, oxidases de amina, oxidase de aminoácidos e oxidase de colesterol.

25

30

18A.- Composição inibidora da transferência de corante de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada por ser um detergente, aditivo sob a forma de um granulado não-pulverulento, de um liquido, em particular um liquido estabilizado, ou de um sistema enzimático protegido.

35

19A.- Composição detergente caracterizado por incluir um detergente aditivo de acordo com qualquer uma das

65555

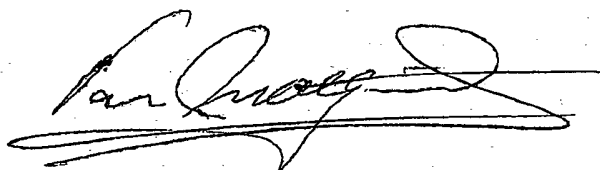
reivindicações 1 a 18.

20a.- Composição detergente de acordo com a reivindicação 19, caracterizado por representar em forma granular, em forma granular compacta, ou em forma líquida.

21a.- Processo para a inibição da transferência de um corante textil de um tecido tingido para outro tecido, quando os referidos tecidos são lavados e/ou enxaguados juntamente numa resolução de lavagem, na qual os referidos tecidos ficam em contacto com uma composição de acordo com as reivindicações 1 a 20, caracterizado por a peroxidase ser utilizada a níveis entre 0,01 e 100 mg/por litro da solução de lavagem, o nível de peróxido de hidrogénio ser entre 0,001 e 5 mM da solução de lavagem o nível absoluto de substrato oxidável adicional ser entre 1 µM a 1mM e sendo a celulase ser adicionada a níveis situados entre 0,005 e 40 mg de proteína do enzima/por litro da solução de lavagem.

Lisboa, 10.MAR.1993

Por THE PROCTER & GAMBLE COMPANY



5
VASCO MARQUES LEITE
Agente Oficial
de Propriedade Industrial
Carmo-Arco de Concelção, 3, 1.º-1100 LISBOA