



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 267 205**

51 Int. Cl.:
D06M 16/00 (2006.01)
C12N 9/42 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA

T5

96 Número de solicitud europea: **98964010 .7**
96 Fecha de presentación : **17.12.1998**
97 Número de publicación de la solicitud: **1047827**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.11.2000**

54 Título: **Biopolido continuo de tejidos que contienen celulosa.**

30 Prioridad: **19.12.1997 US 68274 P**

45 Fecha de publicación de la mención y de la traducción de patente europea: **01.03.2007**

45 Fecha de la publicación de la mención de la patente europea modificada BOPI: **25.02.2011**

45 Fecha de publicación de la traducción de patente europea modificada: **25.02.2011**

73 Titular/es: **NOVOZYMES NORTH AMERICA, Inc.**
77 Perry Chapel Church Road
Franklinton, North Carolina 27525, US

72 Inventor/es: **Liu, Jiying y**
Condon, Brian

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

ES 2 267 205 T5

DESCRIPCIÓN

Biopulido continuo de tejidos que contienen celulosa.

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a métodos para tratar tejidos que contienen celulosa para conseguir un mejor tacto del tejido, apariencia y resistencia al frisado, particularmente usando procesos de biopulido continuos o semicontinuos.

10 Antecedentes de la invención

Muchos de los tejidos que contienen celulosa recién fabricados tienen un tacto que es más bien duro y rígido a menos que éstos sean tratados con componentes de acabado. Además, la superficie del tejido no tiene apariencia homogénea debido a pequeñas fibras rizadas que sobresalen de su superficie. Además, después de un periodo relativamente corto de uso, aparece un frisado en la superficie del tejido, dándole un aspecto sin atractivo y gastado. Por estas razones, uno de los objetivos principales de la industria textil es mejorar el tacto, apariencia y resistencia al frisado del tejido. No obstante, sólo se ha conseguido un éxito parcial.

Se puede obtener un alto grado de suavidad y alisado del tejido usando hilos finos, es decir, con un denier bajo, en el momento del tejido. No obstante, el coste resultante es alto cuando la salida del telar se reduce proporcionalmente con respecto al diámetro del hilo de la trama.

Una vía menos cara de asegurar un tacto del tejido suave y liso es impregnar el tejido acabado con un agente suavizante, normalmente un compuesto tensioactivo, catiónico, a veces a base de silicona. No obstante, este tratamiento no elimina el frisado ni los rizos. Además, el tejido queda con un tacto algo grasiento y no es resistente al lavado y su absorberencia de la humedad es con frecuencia considerablemente reducida.

Un método químico es entrecruzar las fibras para reducir la fibrilación (Nicolai *et al.*, 1996, *Textile Res. J.* 66(9) 575-580). No obstante, este método causa una reducción en la tenacidad de la fibra.

Otro método conocido para obtener un tejido suave y liso consiste en tratar los tejidos celulósicos con celulasas. Véase, Bazin *et al.*, "Enzymatic Bio-Polishing of Cellulosic Fabric", presentado en el 58º Congreso de la Asociación de químicos e Industria Textil en Mulhouse, Francia (Octubre 25, 1991) y Asferg *et al.*, "Softening and polishing of cotton fabrics by cellulase treatment", *ITB Dyeing/Printing/Finishing* (Febrero 1990). El tratamiento con celulasa de la superficie del tejido mejora la calidad del tejido en cuanto al tacto, apariencia y resistencia al frisado. Los efectos más importantes son menos rizos y frisado, brillo/lustre aumentado, tacto del tejido mejorado, suavidad duradera aumentada, y absorberencia de agua mejorada. A estos efectos se les hace referencia como efectos de biopulido. Las condiciones particulares que son utilizadas son importantes para determinar los resultados del tratamiento.

Muchos procesos requieren exponer el tejido a agitación mecánica para obtener resultados del biopulido satisfactorios. Véase, por ejemplo, WO 9320278; Cavaco-Paulo *et al.* (1994, *Biocatalysis* 10:353-360); y Cavaco-Paulo *et al.* (1996, *Textile Res. J.* 66:287-294). No obstante, bajo algunas condiciones, se observa también una pérdida de peso y una pérdida de resistencia significantes.

Unos métodos actuales de biopulido con celulasa son principalmente los procesos discontinuos. Los procesos continuos o semicontinuos normales tales como pad-steamer/J-box no se usan porque no proporcionan una acción mecánica elevada y usan sólo volúmenes pequeños de solución y por ello resultan en un biopulido insuficiente y/o desigual. Por ejemplo, un biopulido no uniforme puede resultar del uso de un complejo de celulasa, en parte porque las celulasas diferentes presentan afinidades diferentes a la celulosa y por lo tanto se unen diferencialmente por el tejido.

WO 96/17994 concierne un método para obtener un textil celulósico con tendencia reducida al frisado que usa una celulasa capaz de realizar una hidrólisis parcial de la superficie de la fibra.

Así, en la técnica hay una necesidad de métodos de biopulido eficaces que puedan ser usados en los procesos continuos o semicontinuos convencionales.

Resumen de la invención

La presente invención proporciona un método para tratar un tejido con celulosa según la reivindicación 1. Preferiblemente, el método adicionalmente comprende, después de la fase (a), la eliminación del tejido contactado por el dominio de la solución a granel. En las formas de realización preferidas, el tejido es puesto en contacto con la solución a granel durante menos de aproximadamente 5 minutos, más preferiblemente, durante menos de aproximadamente 1 minuto.

En las formas de realización preferidas, los métodos de la invención suponen una mejora en la nota de frisado de al menos aproximadamente 0.25; más preferiblemente, al menos aproximadamente 0.5; simultáneamente y en la que dicho tejido tratad exhibe al menos una propiedad de biopulido mejorada seleccionada del grupo 20 que consiste en: nota de frisado, tacto, y apariencia, relativo a y más preferiblemente, al menos aproximadamente 1.0.

ES 2 267 205 T5

Las celulasas son preferiblemente enzimas que presentan actividad celulasa termoestable. Normalmente, la solución a granel contiene menos de aproximadamente 200 CMCU/ml de actividad celulasa, preferiblemente menos de aproximadamente 100 CMCU/ml, y más preferiblemente, menos de aproximadamente 50 CMCU/ml.

5 En otros aspectos, la invención proporciona métodos de biopulido y coloración combinados, o de biopulido y descrudado combinados. En estas formas de realización, la solución acuosa con la cual el tejido es puesto en contacto contiene, además de la celulasa, otros componentes apropiados tales como, p. ej., tintes y compuestos auxiliares.

Descripción detallada de la invención

10

La presente invención proporciona métodos de biopulido que realzan la calidad de los tejidos celulósicos.

15 El biopulido según se utiliza en este caso se refiere a un tratamiento que está dirigido a mejorar las propiedades siguientes: tacto del tejido, apariencia, y resistencia al frisado. Los métodos permiten una acción uniforme por la (las) celulasa(s) en el tejido y resultan en mejoras apreciables en una o más de estas propiedades, mientras que se minimiza la pérdida de peso del tejido y/o la resistencia del tejido y se obvia la necesidad de agitación mecánica. La presente invención minimiza la pérdida de celulasa de la solución acuosa por medio de la adsorción al tejido, y de ese modo permite el uso de un equipamiento convencional en la industria textil continuo. Los métodos de la invención pueden también ser combinados con procesos tales como la preparación química alcalina, la coloración del tejido, la impresión, y el acabado, de ese modo ofreciendo una flexibilidad aumentada en la producción textil. Además, el uso simultáneo de otras enzimas, tales como, p. ej., la lipasa, la proteasa, las hemicelulasas, y/o las pectinasas, permite la eliminación simultánea de materiales celulósicos y no celulósicos. Finalmente, los métodos de la invención pueden reducir la formación de pelusas durante una posterior costura y lavado doméstico de tejidos tratados según la invención.

25 Los tejidos celulósicos según se utilizan en este caso comprenden tanto estructuras tejidas como de punto hechas de fibras celulósicas, incluyendo, sin limitación, algodón, lino, ramio, cáñamo, yute, rayón/viscosa, Tencel/liocel, o sus mezclas, al igual que tejidos de mezclas de fibras celulósicas y otras fibras naturales y/o artificiales tales como, p. ej., lana, seda, poliéster, nilón, y similares.

30 Un aparato continuo según se utiliza en este caso se refiere, sin limitación, a un equipamiento convencional tal como, p. ej., cajas de lavado de pad-steamer o cajas de pad-J, donde el tejido es humedecido por contacto con una solución a granel, y, una vez pasada a través de ésta, ya no está en contacto directo con la solución a granel. Este se distingue del equipamiento en el que el tejido está en contacto continuo con una solución a granel en todo el tratamiento (métodos discontinuos batch). En un aparato discontinuo, la proporción líquido:tejido (peso de la solución usada por peso de tejido) es generalmente superior a aproximadamente el 400%, en comparación con una absorción de humedad (peso de solución absorbida por peso de tejido) de entre aproximadamente 50% y aproximadamente 150% en un aparato continuo. Será entendido que la presente invención comprende el uso de cualquier configuración o aparato donde el tejido está sólo expuesto a la solución a granel durante un periodo breve con respecto al tiempo de tratamiento total, con o sin fulardado para eliminar la solución en exceso del tejido.

40

“Temperatura elevada” según se utiliza en este caso se refiere a temperaturas por encima de aproximadamente 70°C, y más preferiblemente por encima de aproximadamente 90°C.

Celulasas

45

En la práctica de la presente invención, un tejido celulósico es puesto en contacto con la celulasa que carece de un dominio de unión a la celulosa funcional. Una celulasa o enzima celololítica es una enzima que hidroliza celulosa, incluyendo, sin limitación, la 1,4- β -D-glucan celobiohidrolasa (EC 3.2.1.91), endo- β -1,4-D-glucan-4-glucanohidrolasa (EC 3.2.1.4), y β -glucosidasa (EC 3.2.1.21). La actividad enzimática de la celulosa (expresada como unidades de endoglucanasa o CMCU) está normalmente determinada incubando una enzima con carboximetilcelulosa (CMC) a pH 7.5 durante 20 min, tras lo cual la formación de azúcares de reducción es determinada usando la reacción de ácido p-hidroxibenzoico-hidrazida (PHBAH) (Lever, 1972, Anal. Biochem. 47:273-279, con la modificación consistente en la adición de 5 g de tartrato potásico de sodio además de 1.5 g de PHBAH).

55 El uso de enzimas con una afinidad más alta a la celulosa es desventajoso en un aparato continuo, puesto que resulta en (a) adsorción no uniforme de la enzima al tejido y (b) pérdida de la enzima de la solución a granel por adsorción al tejido.

60 La celulasa carece de un dominio de unión a la celulosa funcional (CBD), bien intrínsecamente o bien después de la modificación de la secuencia de la celulasa. Los CBDs son secuencias peptídicas que confieren una unión de alta afinidad a celulosa, incluyendo, sin limitación, las secuencias definidas por Peter Tomme *et al.* en “Cellulose-Binding Domains: Classification and Properties” en *Enzymatic Degradation of Insoluble Carbohydrates*. John N. Saddler y Michael H. Penner (Eds.), ACS Symposium Series. No. 618, 1996. Tomme *et al.* clasificaron más de 120 dominios de unión a la celulosa en diez familias (designadas I-X), e identificaron los CBDs en varias enzimas tales como celulasas, xilanasas, mananasas, arabinofuranosidasas, acetil esterases y quitinasas, así como en proteínas de unión a polisacáridos no hidrolíticas.

65

Según la invención, un tejido que ha sido puesto en contacto con una celulosa carente de un dominio de unión a la celulosa funcional es también expuesto a altas temperaturas. En consecuencia, las celulasas usadas en la práctica de la invención son preferiblemente termoestables, es decir, presentan una actividad enzimática de la celulosa óptima a una temperatura de al menos 65°C, más preferiblemente al menos aproximadamente 75°C y más preferiblemente al menos aproximadamente 85°C. Cualquier celulosa carente de un CBD funcional puede ser usada en la práctica de la invención, siempre que exhiba al menos aproximadamente el 20% de su actividad enzimática máxima a unas temperaturas por encima de aproximadamente 65°C. Preferiblemente, la celulosa muestra al menos aproximadamente el 50% de su actividad máxima a una temperatura de aproximadamente 65°C.

Ejemplos no limitativos de las celulasas útiles en la práctica de la presente invención incluyen la celulasa de *Pyrococcus* cuya secuencia está representada en la SEC ID NO:1 y la celulasa de *Dicryoglossus* cuya secuencia está representada en la SEC ID NO:2. Otras celulasas adecuadas incluyen, sin limitación, las celulasas derivadas de las celulasas termofílicas siguientes, que han sido modificadas en caso de necesidad de manera que carezcan de un CBD funcional: β -glucosidasa de *Pyrococcus furiosus* (Kengen *et al.*, 1993, *Eur. J. Biochem.* 213:305); exoglucanasa de *Thermotoga sp.* (Ruttersmith *et al.*, 1991, *Chem. J.* 277:887); celulasas de *Thermotoga maritima* (Bronnenmeier *et al.*, 1995, *Appl. Environ. Microbiol.* 61:1399; *Microbiology* 142:2532,1996); β -glucosidasa de *Thermotoga maritima* (Gabelsberger *et al.*, 1993, *FEMS Microbiol. Lett.* 109:131); endoglucanasa B de *Thermotoga neapolitana* (Bok *et al.*, 1994, ACS Symp. Ser. 566: 54); endoglucanasa de Arqueobacterias (WO 97/44361); endoglucanasa de *Acidothermus cellulolyticus* (WO 96/02551); celulasa de *Rhodothermus marinus* (Hreggvidsson *et al.*, 1996, *Environ. Microbiol.* 62:3047); y una exocelulasa/endocelulasa de *Caldocellum saccharolyticum* (Saul, *Nuc. Acids Res.* 17:439, 1989).

Las celulasas pueden ser obtenidas a partir de su célula de origen o de un organismo recombinante que ha sido programado para sintetizar la celulasa de un gen heterólogo. Preferiblemente, las celulasas son enzimas monocompuestas, es decir, son polipéptidos individuales con una actividad enzimática definida que no están sintetizados como parte de un complejo multicomponente que presenta múltiples actividades enzimáticas. Las celulasas pueden ser recuperadas por procedimientos convencionales incluyendo, pero sin limitarse a, centrifugación, filtración, secado por pulverización, evaporación, o precipitación. Según se utiliza en este caso, celulasa “purificada” o “aislada” es una celulasa que ha sido tratada para eliminar material sin celulasa derivado de la célula en la que se sintetizó que podría interferir con su actividad enzimática. Si la celulasa es segregada en el medio de cultivo, la purificación puede comprender la separación del medio de cultivo de la biomasa por centrifugación, filtración, o precipitación, usando métodos convencionales. De forma alternativa, la celulasa puede ser liberada de la célula huésped por ruptura celular y separación de la biomasa. En algunos casos, una purificación adicional puede ser conseguida por los métodos de purificación de proteínas convencionales, incluyendo, sin limitación, la precipitación de sulfato amónico; extracción ácida o caotrópica; intercambio iónico, filtro molecular, y cromatografía hidrofóbica, incluyendo FPLC y HPLC; isoelectroenfoque preparatorio; y electroforesis en gel de poliacrilamida preparatoria. De forma alternativa, la purificación puede conseguirse usando la cromatografía de afinidad, incluyendo la cromatografía por inmovilización. Por ejemplo, las celulasas híbridas recombinantes pueden ser usadas con una secuencia de aminoácidos adicional que sirve como una afinidad “tag”, que facilita la purificación usando una matriz de fase sólida apropiada.

Otros componentes

En algunas formas de realización de la invención, la solución a granel que contiene la celulasa carente de un CBD funcional también comprende otros componentes, incluyendo sin limitación otras enzimas, al igual que uno o más de tensioactivos, blanqueadores, agentes antiespumantes, sistemas constructores, y similares, que realzan el proceso de biopulido y/o proporcionan efectos superiores relacionados con, p. ej., la teñibilidad y/o la humectabilidad. La solución acuosa puede también contener agentes colorantes.

Unas enzimas adecuadas para el uso en la presente invención incluyen sin limitación:

Enzimas que digieren la pectina: las enzimas que digieren la pectina adecuadas (algunas de ellas identificadas por sus números de clasificación enzimática conforme a las recomendaciones (1992) de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBBM)) incluyen, sin limitación, las enzimas degradadoras de la pectina tales como la pectato liasa, la pectina liasa, la pectina metilesterasa, la poligalacturonasa (3.2.1.15), y la ramnogalacturonasa (WO 92/19728).

Hemicelulasas: las hemicelulasas adecuadas incluyen sin limitación la endo-arabinanasa (3.2.1.99, Rombouts *et al.*, *Carb. Polymers* 9:25,1988), arabinofuranosidasa, endo- β -1,4-galactanasa, endo-xilanasa (3.2.1.8), mananasa, y xiloglucanasa.

Amilasas: las amilasas adecuadas incluyen α -amilasas (α -1,4 glucan-4-glucanohidrolasa, EC 3.2.1.1), incluyendo, sin limitación, las α -amilasas de *Bacillus* (que en el contexto presente se denominan “ α -amilasas tipo Termamyl”), incluyendo la α -amilasa de *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*, y *B. stearothermophilus*. Las α -amilasas comercialmente disponibles tipo Termamyl de *B. licheniformis* son Optitherm[®] y Takatherm[®] (disponibles por Solvay), Maxamyl[®] (disponibles por Gist-brocades/Genencor), Spezym AA[®] (disponible por Genencor), y Keistase[®] (disponible por Daiwa). Las α -amilasas distintas del tipo Termamyl incluyen, sin limitación, elementos de la familia de α -amilasa tipo Fungamyl.

ES 2 267 205 T5

Proteasas: las proteasas adecuadas incluyen las de origen animal, vegetal o microbiano, preferiblemente de origen microbiano. La proteasa puede ser una serina proteasa o una metaloproteinasas, preferiblemente una proteasa alcalina microbiana o una proteasa tipo tripsina. Ejemplos de proteasas incluyen aminopeptidasas, incluyendo la prolil aminopeptidasa (3.4.11.5), X-pro aminopeptidasa (3.4.11.9), leucil-aminopeptidasa bacteriana (3.4.11.10), aminopeptidasa termofílica (3.4.11.12), lisil aminopeptidasa (3.4.11.15), triptofanil aminopeptidasa (3.4.11.17), y metionil aminopeptidasa (3.4.11.18); serina endopeptidasas, incluyendo la quimotripsina (3.4.21.1), tripsina (3.4.21.4), cucumisina (3.4.21.25), braquiurina (3.4.21.32), cerevisina (3.4.21.48) y subtilisina (3.4.21.62); cisteína endopeptidasas, incluyendo papaína (3.4.22.2), ficaína (3.4.22.3), quimopapaína (3.4.22.6), asclepaína (3.4.22.7), actinidaína (3.4.22.14), caricaína (3.4.22.30) y ananaína (3.4.22.31); endopeptidasas aspárticas, incluyendo pepsina A (3.4.23.1), aspergillopepsina I (3.4.23.18), penicillopepsina (3.4.23.20) y sacaropepsina (3.4.23.25); y metaloendopeptidasas, incluida la Bacilolisina (3.4.24.28).

Ejemplos no limitativos de subtilisinas incluyen subtilisina BPN[®], subtilisina amilosacárica, subtilisina 168, subtilisina mesentericopeptidasa, subtilisina Carlsberg, subtilisina DY, subtilisina 309, subtilisina 147, termitasa, aqualisina, proteasa PB92 de *Bacillus*, proteinasa K, proteasa TW7, y proteasa TW3.

Las proteasas comercialmente disponibles incluyen Alcalase[™], Savinase[™], Primase[™], Duralase[™], Esperase[™], y Kannase[™] (Novo Nordisk A/S), Maxatase[™], Maxacal[™], Maxapem[™], Properase[™], Purafect[™], Purafect OxP[™], FN2[™], y FN3[™] (Genencor International Inc.).

También se contemplan para el uso en la presente invención las variantes de la proteasa, tales como las descritas en EP 130.756 (Genentech), EP 214.435 (Henkel), WO 87/04461 (Amgen), WO 87/05050 (Genex), EP 251.446 (Genencor), EP 260.105 (Genencor), Thomas *et al.*, (1985), Nature 318:375-376, Thomas *et al.*, (1987), J. Mol. Biol., 193, pp. 803-813, Russel *et al.*, (1987), Nature 328:496-500, WO 88/08028 (Genex), WO 88/08033 (Amgen), WO 89/06279 (Novo Nordisk A/S), WO 91/00345 (Novo Nordisk A/S), EP 525 610 (Solvay) y WO 94/02618 (Gist-Brocades N.V.).

La actividad de las proteasas puede ser determinada como se describe en "Methods of Enzymatic Analysis", tercera edición, 1984, Verlag Chemie, Weinheim, vol. 5.

Lipasas: las lipasas adecuadas (también denominadas hidrolasas del éster carboxílico) incluyen aquellas de origen bacteriano o micótico, incluyendo las triacilglicerol lipasas (3.1.1.3) y fosfolipasa A2. (3.1.1.4.). Las lipasas para el uso en la presente invención incluyen, sin limitación, lipasas de *Humicola* (sinónimo de *Thermomyces*), tal como de *H. lanuginosa* (*T. lanuginosus*) como se describe en EP 258 068 y EP 305 216 o de *H. insolens* como se describe en WO 96/13580; una lipasa de *Pseudomonas*, tal como de *P. alcaligenes* o *P. pseudoalcaligenes* (EP 218 272), *P. cepacia* (EP 331 376), *P. stutzeri* (GB 1.372.034), *P. fluorescens*, *Pseudomonas sp.* cepa SD 705 (WO 95/06720 y WO 96/27002), *P. wisconsinensis* (WO 96/12012); una lipasa de *Bacillus*, así como de *B. subtilis* (Dartois *et al.*, *Biochem. Biophys. Acta*, 1131: 253-360, 1993), *B. stearothermophilus* (JP 64/744992) o *B. pumilus* (WO 91/16422). Otros ejemplos son variantes de lipasa tales como las descritas en WO 92/05249, WO 94/01541, EP 407 225, EP 260 105, WO 95/35381, WO 96/00292, WO 95/30744, WO 94/25578, WO 95/14783, WO 95/22615, WO 97/04079 y WO 97/07202. Las enzimas de lipasa preferidas comercialmente disponibles incluyen Lipolase[™] y Lipolase Ultra[™], Lipozyme[™], Palatase[™], Novozym[™]435, y Lecitase[™] (todas disponibles por novo Nordisk A/S). La actividad de la lipasa puede ser determinada como se describe en "Methods of Enzymatic Analysis", tercera edición, 1984, Verlag Chemie, Weinheim, vol. 4.

Preferiblemente, las enzimas son derivadas de microorganismos alcalofílicos y/o presentan actividad enzimática a temperaturas elevadas. Las enzimas pueden ser aisladas de su célula de origen o pueden ser producidas de forma recombinante, y pueden ser modificadas químicamente o genéticamente. Normalmente, las enzimas son incorporadas en la solución acuosa a un nivel desde aproximadamente 0,0001% hasta aproximadamente 1% de proteína enzimática en peso de la composición, más preferiblemente desde aproximadamente 0,001% hasta aproximadamente 0,5% y más preferiblemente de 0,01% a 0,2%. Será entendido que la cantidad de unidades de actividad enzimática para cada enzima adicional para usar en los métodos de la presente invención junto con una celulasa particular puede ser fácilmente determinada usando ensayos convencionales.

Agentes tensioactivos adecuados para el uso en la práctica de la presente invención incluyen, sin limitación, tensioactivos no iónicos (Patente estadounidense n.º. 4.565.647); aniónicos; catiónicos; y bipolares (Patente estadounidense n.º. 3.929.678); que están normalmente presentes en una concentración de entre aproximadamente 0,002% hasta aproximadamente 3% en peso, preferiblemente desde aproximadamente 0,02% hasta aproximadamente 2% en peso. Los agentes tensioactivos aniónicos incluyen, sin limitación, alquilbencenosulfonato lineal, α -olefinsulfonato, alquil sulfato (sulfato de alcohol graso), alcohol etoxisulfato, alcanosulfonato secundario, metil éster de alfa-sulfo ácido graso, ácido alquil o alqueniilsuccínico, y jabón. Agentes tensioactivos no iónicos incluyen, sin limitación, alcohol etoxilato, nonilfenol etoxilato, alquilpoliglicósido, alquildimetilaminaóxido, monoetanolamida de ácido graso etoxilada, monoetanolamida de ácido graso, polihidroxi alquil amida de ácido graso, y derivados N-acilo, N-alquilo de glucosamina ("glucamidas").

Los sistemas constructores incluyen, sin limitación, aluminosilicatos, silicatos, policarboxilatos y ácidos grasos, agentes quelantes tales como tetraacetato de etilendiamina, aminopolifosfonatos, particularmente etilendiamina de ácido tetrametileno fosfónico, y dietilentriamina de ácido pentametileno fosfónico, que se incluyen a una concentración

ES 2 267 205 T5

de entre aproximadamente 5% a 80% en peso, preferiblemente entre aproximadamente 5% y aproximadamente 30% en peso.

5 Los sistemas blanqueadores pueden comprender un agente oxidante tal como peróxido de hidrógeno, perborato, peracetato, o percarbonato, que puede ser combinado con un activador del blanqueamiento formador de perácido tal como tetraacetililenodiamina o nonanoiloxibencenosulfonato. De forma alternativa, el sistema blanqueador puede comprender peroxiácidos, p. ej., del tipo amida, imida, o sulfona.

10 Los agentes antiespumantes incluyen sin limitación siliconas (Patente estadounidense n°. 3.933.672; DC-544 (Dow Corning), que están normalmente incluidos a una concentración de entre aproximadamente 0,01% y aproximadamente 1% en peso.

15 Las composiciones pueden también contener agentes de suspensión de la suciedad, agentes de liberación de la suciedad, abrillantadores ópticos, abrasivos, y/o bactericidas, como los conocidos de forma convencional en la técnica.

20 Los agentes colorantes incluyen, sin limitación, los tintes descritos en Shores (ed.), Cellulosic Dyeing, 1995 (Society of Dyers and Colorists, Alden Press, Oxford).

20 *Métodos de biopulido*

La presente invención proporciona métodos para biopulir el tejido que comprende (a) la puesta en contacto de un tejido celulósico, en un aparato continuo, con una solución acuosa comprendiendo al menos una celulasa que carece de un dominio de unión a la celulosa funcional y (b) el sometimiento del tejido contactado a una temperatura elevada. 25 La fase de puesta en contacto conlleva la exposición del tejido durante un tiempo relativamente breve (normalmente, durante menos de 5 min) a una solución a granel conteniendo la enzima, tras lo cual el tejido puede ser fulardado para eliminar la solución en exceso. Esto resulta en una absorción de humedad (expresada como peso de solución: peso de tejido x 100) de entre aproximadamente el 50 y aproximadamente el 200%, preferiblemente entre aproximadamente el 50 y aproximadamente el 130%. Las fases de puesta en contacto y sometimiento pueden ser realizadas simultáneamente (es decir, poniendo en contacto el tejido con la solución a granel mientras que se calienta) o consecutivamente (es decir, primero poniendo en contacto el tejido con la solución a granel; opcionalmente eliminando la solución en exceso; y, posteriormente, sometiendo el tejido húmedo a temperatura elevada). 30

35 Para conseguir un biopulido eficaz, la concentración de enzima en la solución acuosa (CMCU/ml), la temperatura a la que el tejido es sometido, y el período de incubación total, variará, dependiendo de:

- (i) la naturaleza del tejido;
- (ii) la celulasa particular usada;
- 40 (iii) el pH de la solución;
- (iv) el tiempo durante el cual el tejido es contactado con la solución a granel; y
- 45 (v) la presencia de otros componentes en la solución acuosa.

La determinación de la concentración enzimática adecuada para ser usada, al igual que la optimización de otras variables, puede ser conseguida usando sólo una experimentación rutinaria estableciendo una matriz de condiciones y evaluando los puntos diferentes en la matriz. Por ejemplo, se pueden variar la concentración enzimática, la temperatura a la que la puesta en contacto se produce, y el tiempo de contacto, tras lo cual la resultante fibra o tela es evaluada en cuanto a (a) las propiedades de biopulido, el tacto del tejido, la apariencia, y la resistencia al frisado, y, opcionalmente, (b) la pérdida potencial en resistencia y/o peso del tejido. 50

55 El tacto y apariencia del tejido son evaluados por una prueba de panel, usando una puntuación de 1-3 (de peor a mejor).

El frisado puede ser medido usando cualquier método convencional, tal como, p. ej., según el protocolo de la American Society for Testing and Materials ASTM D 4970-89, usando un probador de abrasión y frisado Martindale (James H. Heal & Co, Reino Unido). En este método, el frisado es evaluado visualmente en una escala de 1 a 5, en la que 1 significa un frisado severo y 5 significa ningún frisado. 60

La resistencia del tejido es medida usando cualquier método convencional, tal como, p. ej., según el protocolo ASTM D 3786-87, usando un probador Mullen Burst (Model C, B.F. Perkins, Chicopee MA).

65 En la práctica de la invención, las condiciones son seleccionadas donde propiedades de biopulido, particularmente el frisado, muestra mejoras sobre controles no tratados, pero donde la pérdida de resistencia del tejido es mínima. Preferiblemente, un aumento de la nota de frisado de al menos aproximadamente 0.25 es observado, más preferiblemente al menos aproximadamente 0.5, y más preferiblemente al menos aproximadamente 1.0. Preferiblemente, la pérdida de

ES 2 267 205 T5

resistencia del tejido es inferior a aproximadamente el 20%, más preferiblemente inferior aproximadamente al 10%, y más preferiblemente inferior aproximadamente al 5%.

Normalmente, la solución a granel contiene una celulosa carente de un CBD funcional a una concentración inferior a aproximadamente 200 CMCU/ml, más preferiblemente inferior a aproximadamente 100 CMCU/ml, y más preferiblemente inferior a aproximadamente 50 CMCU/ml; a una temperatura de al menos aproximadamente 70°C, preferiblemente al menos aproximadamente 75°C, y más preferiblemente al menos aproximadamente 85°C; y a un pH de entre aproximadamente 4 y 12, preferiblemente entre aproximadamente 5 y 10, y más preferiblemente entre aproximadamente 7 y 10.

Métodos combinatorios: la presente invención también comprende métodos combinatorios donde el biopulido se realiza simultáneamente con descrudado y/o coloración. En estas formas de realización, la solución a granel acuosa también contiene otros componentes, incluyendo sin limitación las enzimas descritas aquí, al igual que otros componentes, tales como, p. ej., tintes (incluyendo sin limitación tintes reactivos, tintes directos, tintes al azufre, y tintes a la tina) y auxiliares colorantes. Véase Shore (ed.), *Cellulosic Dyeing*, 1995 (Society of Dyers and Colorists, Alden Press, Oxford). El tejido contactado es luego sometido a una temperatura elevada, que resulta en una coloración simultánea o descrudado y biopulido.

Los ejemplos siguientes están previstos como ilustraciones no limitativas de la presente invención.

Ejemplo 1

Biopulido usando la celulosa de Dictyoglomus

El siguiente experimento fue realizado para evaluar la capacidad de biopulido de la celulosa de *Dictyoglomus* en un aparato continuo.

Métodos

El tejido usado fue Knitted Fabric 460 (Test Fabrics Inc.), que es 100% algodón entrelazado blanqueado. El tejido fue cortado en piezas de 20 x 30 cm con un peso de aproximadamente 12.5 g cada una. El peso de cada muestra fue determinado después del acondicionamiento durante al menos 24 horas a $65 \pm 2\%$ de humedad relativa y $21 \pm 2^\circ\text{C}$ ($70 \pm 3^\circ\text{F}$).

La celulosa comprendía el dominio catalítico de celulosa de *Dictyoglomus* (cuya secuencia está mostrada en la SEC ID NO:2) que fue formulada en 15 mM de fosfato sódico. El pH y la concentración enzimática fueron tal y como se muestra en la Tabla 1 más abajo.

Las muestras fueron puestas en contacto con soluciones enzimáticas durante menos de 45 segundos y luego fular-dadas a través de un fulard, tras lo cual éstas fueron pesadas y colgadas inmediatamente en un Mathis a vapor (tipo PSA-HTF) (Werner Mathis USA Inc. Concord, NC). El porcentaje de solución en el tejido (% absorción de humedad) y proporción de actividad celulosa para el tejido están mostrados en la Tabla 1. Las muestras de tejido fueron tratadas a 90°C y el 100% de humedad relativa durante 90 minutos. Todas las muestras fueron luego transferidas y enjuagadas en agua desionizada durante al menos 5 minutos, tras lo cual fueron secadas al aire. Finalmente, las muestras fueron acondicionadas a $65 \pm 2\%$ de humedad relativa y $21 \pm 2^\circ\text{C}$ ($70 \pm 3^\circ\text{F}$) de temperatura durante al menos 24 horas antes de la evaluación.

La resistencia del tejido fue medida en un probador modelo C de Mullen Burst según ASTM D3786-87: Método de ensayo estándar para la determinación de la resistencia hidráulica al estallido de textiles tejidos y no tejidos - Método de ensayo de diafragma de resistencia al estallido. Los resultados se presentan como el promedio de al menos 8 mediciones. La nota de frisado fue medida según ASTM D 4970-89: Método de ensayo estándar para la determinación de la resistencia al frisado y otros cambios en la superficie relacionados de textiles (Método de ensayo bajo presión de Martindale). Después de 500 revoluciones, se evaluó el frisado en el tejido visualmente contra una escala estándar de 1 a 5, donde 1 indica un frisado muy severo y 5 no indica ningún frisado. Los resultados se presentan como el promedio de al menos dos mediciones.

Resultados

Los resultados están mostrados en la tabla 1 abajo y en la figura 1. Al aumentar la concentración enzimática, se observó un aumento correspondiente en la nota de frisado. El aumento en la resistencia al frisado es superior a pH 8.1 que a pH 6.0. En las condiciones indicadas de concentración enzimática y pH, el método de la invención resulta en una pérdida de resistencia del tejido mínima (pérdida inferior al 5% a pH 6.0 y pérdida no detectable a pH 8.1). Un frisado constante en la superficie también indicaba que el tejido había sido expuesto uniformemente a la celulosa.

Estos resultados demuestran que el biopulido del tejido de algodón con la celulosa de *Dictyoglomus* mejora la resistencia al frisado del tejido sin una pérdida de resistencia significativamente detectable.

TABLA 1

#	Solución pH	Solución de celulasa (CMCU/ml)	Absorción de humedad (% p/p)	Actividad celulasa (CMCU/g tejido)	Pérdida de resistencia (%)	Nota de frisado (500 rev)
1	6	0	125	0	0	1.5
3	6	4.8	130	6.2	2.4	2
5	6	9.7	137	13.3	3.5	2.5
2	8.1	0	128	0	0	2
4	8.1	4.8	131	6.3	0	2.75
6	8.1	9.7	137	13.3	0	3

Ejemplo 2

Biopulido usando celulasa de Pyrococcus

El siguiente experimento fue realizado para evaluar la capacidad de biopulido de la celulasa de *Dictyoglomus* en un aparato continuo.

El biopulido se efectuó esencialmente como se describe en el ejemplo 1, con la excepción de que el tampón usado consistió en 9.53 g de tetraborato de sodio decahidrato disuelto en 2.5 l de agua desionizada y ajustado a pH 9.2, y la celulasa fue derivada de *Pyrococcus* (cuya secuencia está representada en la SEC ID NO: 1).

Métodos

Las muestras fueron fulardadas y tratadas como se describe en el ejemplo 1. La absorción de humedad del tejido fue del 94%. El tejido fue tratado durante 90 min a pH 9.2, 90°C, y humedad relativa al 100%. Los procedimientos de aclarado, secado, evaluación fueron iguales a los del Ejemplo 1 excepto porque la nota de frisado fue evaluada después de 125 revoluciones.

Resultados

Ninguna pérdida de resistencia estadísticamente significativa fue detectada en ninguna de las muestras tratadas con celulasa al compararse con controles que no fueron expuestos a enzimas. En cambio, la nota de frisado aumenta conforme aumenta la actividad enzimática (Figura 2). Estos resultados indicaron que las celulastas de *Pyrococcus* son útiles para el biopulido, mientras que provocan una pequeña pérdida de resistencia del tejido en un aparato Pad Steamer. También se consiguió una mejor apariencia y tacto del tejido.

Ejemplo 3

Tratamientos combinatorios

Los experimentos siguientes fueron realizados para evaluar los métodos de la presente invención durante el descrudado y biopulido combinados.

Métodos

El tejido usado fue Fabric 4600, que es 100% tejido de algodón sin lavar ni blanquear. La preparación del tejido y el tampón fueron iguales a los que se describe en el Ejemplo 2 arriba.

La solución a granel contenía: (a) la celulasa de *Pyrococcus* descrita en el Ejemplo 2 arriba, a una concentración de 6.12 CMCU/ml y 4.9 CMCU/g de tejido; y (b) la pectato liasa termoestable a una concentración de 1.93 mv-mol/ml/min. Las muestras fueron fulardadas y tratadas como se describe en el Ejemplo 1. La absorción de humedad

ES 2 267 205 T5

del tejido fue del 80%. Las condiciones de tratamiento fueron pH 9.2, 90°C, humedad relativa (RH) al 100%, y el tratamiento duró 90 min.

Los procedimientos de aclarado, secado, evaluación son los mismos que los que se describe en el ejemplo 1 arriba. La velocidad de humedecimiento fue evaluada según el método de prueba de AATCC. Una gota de agua de una bureta de 1 cm de alto fue permitida caer sobre la superficie tensa de una muestra de tejido. El tiempo para la desaparición del agua de la superficie del tejido fue registrado como tiempo de humedecimiento. Ocho mediciones en cada muestra fueron realizadas y promediadas.

Resultados

Resistencia al frisado del tejido mejorada después del tratamiento con celulasa o bien del tratamiento combinado con celulasa y pectinasa (Tabla 2). Además, el promedio de tiempo de humedecimiento también disminuyó significativamente con respecto a los controles tratados sin enzima (tabla 3). Estos resultados indicaron que los métodos de la invención pueden ser usados para el biopulido y descrudado combinados.

TABLA 2

Nota de frisado (125 rev.)	
sin enzima	2
Celulasa	2.5
Pectinasa	2
Cel+ Pect.	2.5

TABLA 3

Tiempo de humedecimiento (segundo)										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Promedio
sin enzima	7	50	115	249	>300	>300	>300	>300	>300	>300
Celulasa	64	40	40	46	164	124	214	182		109
Pectinasa	61	70	65	64	94	96	95	64	104	79
Cel+ Pect.	37	40	39	30	28	22	28	28		32

Referencias citadas en la descripción

Esta lista de referencias citada por el solicitante ha sido recopilada exclusivamente para la información del lector. No forma parte del documento de patente europea. La misma ha sido confeccionada con la mayor diligencia; la OEP sin embargo no asume responsabilidad alguna por eventuales errores u omisiones.

Documentos de Patente citados en la descripción

- WO 9320278 A [0007]
- WO 9617994 A [0009]
- WO 9744361 A [0024]

ES 2 267 205 T5

- WO 9602551 A [0024]
- WO 9219728 A [0028]
- 5 • EP 130756 A, Genentech [0034]
- EP 214435 A, Henkel [0034]
- WO 8704461 A, Amgen [0034]
- 10 • WO 8705050 A, Genex [0034]
- EP 251446 A, Genencor [0034]
- 15 • EP 260105 A, Genencor [0034] [0036]
- WO 8808028 A, Genex [0034]
- WO 8808033 A, Amgen [0034]
- 20 • WO 8906279 A, Nove Nordisk A/S [0034]
- WO 9100345 A, Nove Nordisk A/S [0034]
- 25 • EP 525610 A, Solvay [0034]
- WO 9402618 A, Gist-Brocades N.V. [0034]
- EP 258068 A [0036]
- 30 • EP 305216 A [0036]
- WO 9613580 A [0036]
- 35 • EP 218272 A [0036]

Bibliografía distinta de Patentes citada en la descripción

- 40 • **Nicolai et al.** *Textile Res. J.*, 1996, vol. 66 (9), 575-580 [0005]
- **Bazin et al.** Enzymatic Bio-Polishing of Cellulosic Fabric. 58th Congress of the Association of Chemists and the Textile Industry in Mulhouse, 25 October 1991 [0006]
- 45 • **Asferg et al.** Softening and polishing of cotton fabrics by cellulase treatment. *ITB Dyeing/Printing/Finishing*, February 1990 [0006]
- **Cavaco-Paulo et al.** *Biocatalysis*, 1994, vol. 10, 353-360 [0007]
- **Cavaco-Paulo et al.** *Textile Res. J.*, 1996, vol. 66, 287-294 [0007]
- 50 • **Lever.** *Anal. Biochem.*, 1972, vol. 47, 273-279 [0020]
- **Kengen et al.** *Eur. J. Biochem.*, 1993, vol. 213, 305 [0024]
- 55 • **Ruttersmith et al.** *Biochem. J.*, 1991, vol. 277, 887 [0024]
- **Bronnenmeier et al.** *Appl. Environ. Microbiol.*, 1995, vol. 61, 1399 [0024]
- EP 331376 A [0036]
- 60 • GB 1372034 A [0036]
- WO 9506720 A [0036]
- 65 • WO 9627002 A [0036]
- WO 9612012 A [0036]

ES 2 267 205 T5

- JP 64744992 B [0036]
- WO 9116422 A [0036]
- 5 • WO 9205249 A [0036]
- WO 9401541 A [0036]
- EP 407225 A [0036]
- 10 • WO 9535381 A [0036]
- WO 9600292 A [0036]
- 15 • WO 9530744 A [0036]
- WO 9425578 A [0036]
- WO 9514783 A [0036]
- 20 • WO 9522615 A [0036]
- WO 9704079 A [0036]
- 25 • WO 9707202 A [0036]
- US 4565647 A [0038]
- US 3929678 A [0038]
- 30 • US 3933672 A [0041]
- *Microbiology*, 1996, vol. 142, 2532 [0024]
- 35 • **Gabelsberger et al.** *FEMS Microbiol. Lett.*, 1993, vol. 109, 131 [0024]
- **Bok et al.** *ACS Symp. Ser.*, 1994, vol. 566, 54 [0024]
- **Hreggvidsson et al.** *Environ. Microbiol.*, 1996, vol. 62, 3047 [0024]
- 40 • **Saul.** *Nuc. Acids Res.*, 1989, vol. 17, 439 [0024]
- **Thomas et al.** *Nature*, 1985, vol. 318, 375-376 [0034]
- 45 • **Thomas et al.** *J. Mol. Biol.*, 1987, vol. 193, 803-813 [0034]
- **Russel et al.** *Nature*, 1987, vol. 328, 496-500 [0034]
- *Methods of Enzymatic Analysis. Verlag Chemie*, 1984, vol. 5 [0035]
- 50 • **Dartois et al.** *Biochem. Biophys. Acta*, 1993, vol. 1131, 253-360 [0036]
- *Methods of Enzymatic Analysis. Verlag Chemie*, 1984, vol. 4 [0036]
- 55 • *Cellulosic Dyeing.. Alden Press*, 1995 [0043]

60

65

ES 2 267 205 T5

REIVINDICACIONES

1. Método de biopulido de un tejido que contiene celulosa en un proceso continuo, dicho método comprendiendo

5 (a) la puesta en contacto del tejido con una solución a granel acuosa con un pH entre 4 y 12 que comprende una celulosa, donde dicha celulosa carece de un dominio de unión a la celulosa funcional, y

(b) el sometimiento del tejido contactado a una temperatura superior a 70°C,

10 donde dichas fases de puesta en contacto y sometimiento ocurren consecutivamente o simultáneamente y donde dicho tejido tratado presenta al menos una propiedad mejorada de biopulido seleccionada del grupo que consiste en: nota de frisado, tacto, y apariencia, respecto a un tejido no tratado.

15 2. Método según se define en la reivindicación 1, comprendiendo además, después de la fase (a), la eliminación de dicho tejido contactado de dicha solución a granel.

20 3. Método según se define en la reivindicación 1, donde el tejido con celulosa comprende una fibra celulósica seleccionada del grupo que se compone de algodón, lino, ramio, cáñamo, yute, rayón, liocel, y combinaciones de cualquiera de los anteriores entre sí o con una fibra no celulósica.

4. Método según se define en la reivindicación 1, donde la celulosa es una enzima monocomponente.

25 5. Método según se define en la reivindicación 1, donde la solución a granel contiene menos de 200 CMCU/ml de actividad celulasa.

6. Método según se define en la reivindicación 1, donde el pH de la solución acuosa es entre 5 y 10.

30 7. Método según se define en la reivindicación 1, donde dicha solución a granel adicional comprende una enzima seleccionada del grupo que consiste en proteasas, lipasas, amilasas, enzimas que digieren pectina, y hemicelulasas.

8. Método según se define en la reivindicación 1, donde dicha solución a granel adicional comprende un colorante y/o un compuesto colorante auxiliar y donde dicho método resulta en la coloración de dicho tejido.

35

40

45

50

55

60

65

FIG. 1

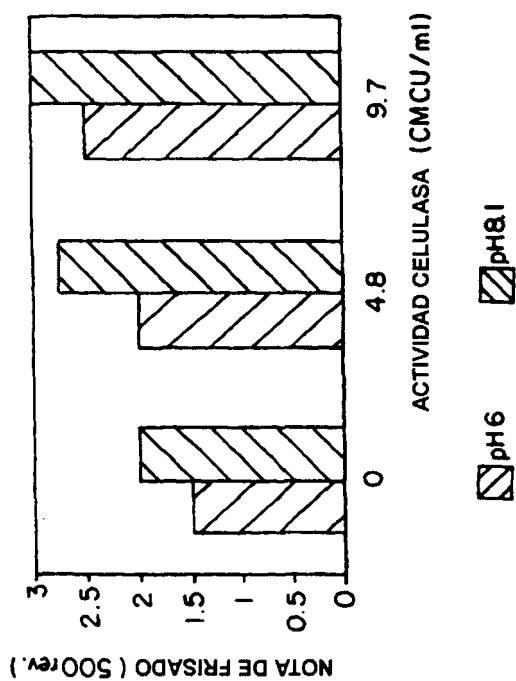
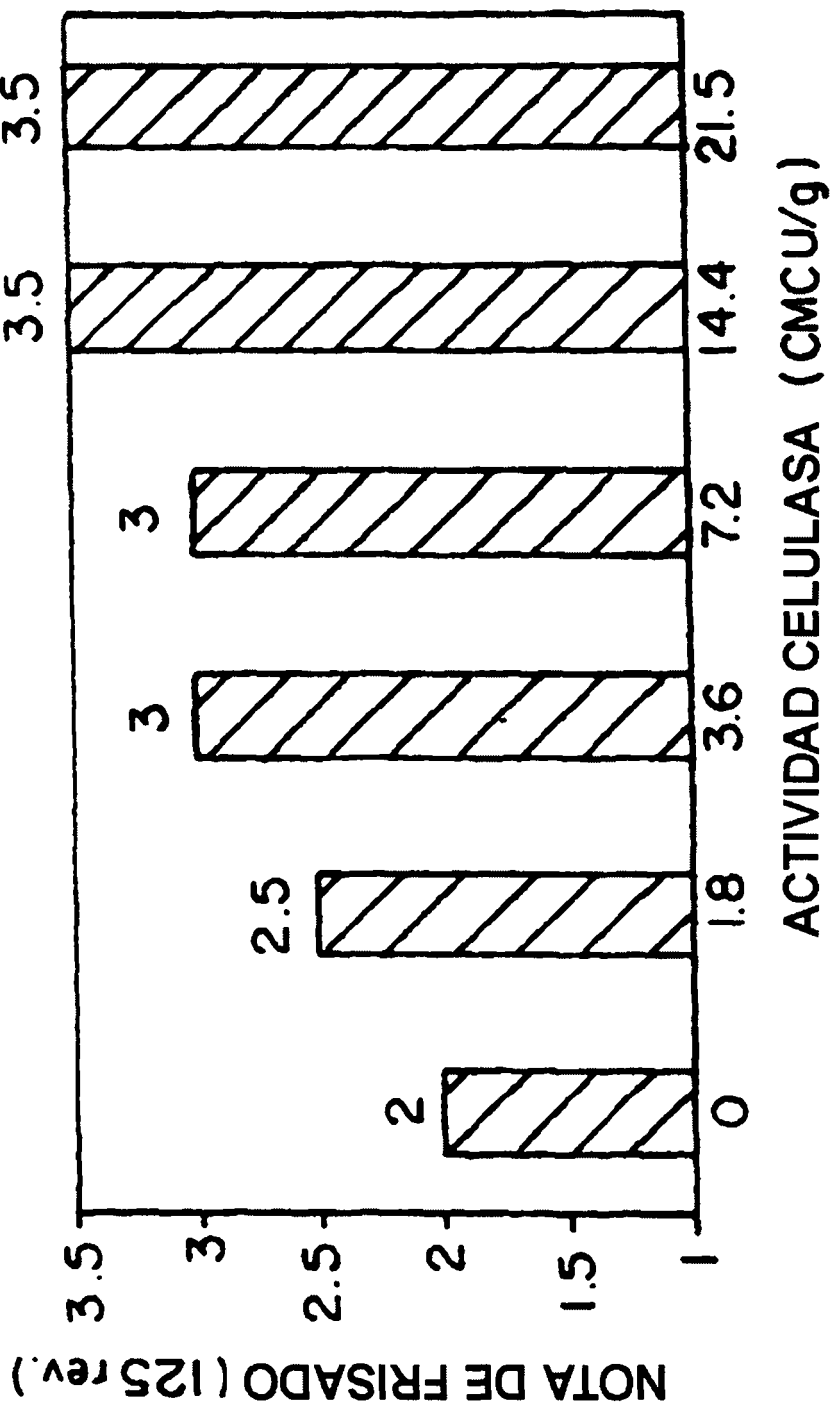


FIG. 2



ES 2 267 205 T5

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Liu, Jiyin
Condon, Brian

5

<120> Biopulido continuo de tejidos que contienen celulosa con celulasas termoflicas

<130> 5464.204-WO

10

<150> 60/068,274

<151> 1997-12-19

15

<160> 2

<170> FastSEQ para versión 3.0 de Windows

20

<210> 1

<211> 319

<212> PRT

<213> *Escherichia coli*

25

<400> 1

30

```

Met Ser Lys Lys Lys Phe Val Ile Val Ser Ile Leu Thr Ile Leu Leu
 1      5      10      15
Val Gln Ala Ile Tyr Phe Val Glu Lys Tyr His Thr Ser Glu Asp Lys
      20      25      30
Ser Thr Ser Asn Thr Ser Ser Thr Pro Pro Gln Thr Thr Leu Ser Thr
      35      40      45
Thr Lys Val Leu Lys Ile Arg Tyr Pro Asp Asp Gly Glu Trp Pro Gly
 50      55      60
Ala Pro Ile Asp Lys Asp Gly Asp Gly Asn Pro Glu Phe Tyr Ile Glu
 65      70      75      80
Ile Asn Leu Trp Asn Ile Leu Asn Ala Thr Gly Phe Ala Glu Met Thr
      85      90      95
Tyr Asn Leu Thr Ser Gly Val Leu His Tyr Val Gln Gln Leu Asp Asn
 100      105      110
Ile Val Leu Arg Asp Arg Ser Asn Trp Val His Gly Tyr Pro Glu Ile
      115      120      125
Phe Tyr Gly Asn Lys Pro Trp Asn Ala Asn Tyr Ala Thr Asp Gly Pro
 130      135      140
Ile Pro Leu Pro Ser Lys Val Ser Asn Leu Thr Asp Phe Tyr Leu Thr
 145      150      155      160
Ile Ser Tyr Lys Leu Glu Pro Lys Asn Gly Leu Pro Ile Asn Phe Ala
      165      170      175
Ile Glu Ser Trp Leu Thr Arg Glu Ala Trp Arg Thr Thr Gly Ile Asn
 180      185      190
Ser Asp Glu Gln Glu Val Met Ile Trp Ile Tyr Tyr Asp Gly Leu Gln
 195      200      205
Pro Ala Gly Ser Lys Val Lys Glu Ile Val Val Pro Ile Ile Val Asn
 210      215      220
Gly Thr Pro Val Asn Ala Thr Phe Glu Val Trp Lys Ala Asn Ile Gly
 225      230      235      240
Trp Glu Tyr Val Ala Phe Arg Ile Lys Thr Pro Ile Lys Glu Gly Thr
      245      250      255
Val Thr Ile Pro Tyr Gly Ala Phe Ile Ser Val Ala Ala Asn Ile Ser
 260      265      270
Ser Leu Pro Asn Tyr Thr Glu Leu Tyr Leu Glu Asp Val Glu Ile Gly
 275      280      285
Thr Glu Phe Gly Thr Pro Ser Thr Thr Ser Ala His Leu Glu Trp Trp
 290      295      300
Ile Thr Asn Ile Thr Leu Thr Pro Leu Asp Arg Pro Leu Ile Ser
 305      310      315

```

65

ES 2 267 205 T5

<210> 2

<211> 288

<212> PRT

5 <213> *Dictyoglomus sp.*

<400> 2

10 Met Lys Lys Ser Leu Leu Ser Leu Ile Leu Ile Leu Leu Leu Ile Thr
1 Leu Ser Phe Ser Gln Thr Pro Lys Tyr Lys Asp Ala Phe Ile Leu Lys
20 Ala Pro Ser Ser Gly Asp Val Thr Thr Lys Asn Leu Pro Leu Thr Leu
35 Glu Leu Asn Phe Trp Asn Ile Ala Asn Tyr Glu Gly Asn Thr Trp Met
50 Ala Phe Tyr Lys Glu Glu Asp Thr Val Glu Tyr Tyr Ala Asp Ile Lys
65 Asn Ile Val Leu Lys Asp Lys Asn Ser Trp Val His Gly Tyr Pro Glu
80 Val Tyr Tyr Gly Tyr Lys Pro Trp Ala Gly His Gly Asn Ser Ile Glu
95 Lys Leu Ala Leu Pro Lys Lys Val Ser Glu Phe Pro Asp Val Leu Phe
110 Asn Leu Lys Tyr Asn Ile Trp Tyr Glu Lys Asn Leu Pro Ile Asn Phe
125 Ala Met Glu Thr Trp Ile Thr Lys Glu Pro Tyr Gln Lys Thr Val Thr
140 Ser Gly Asp Ile Glu Met Met Val Trp Leu Tyr Ala Asn Arg Leu Ser
155 Pro Ala Gly Arg Lys Val Gly Glu Val Lys Ile Pro Ile Ile Leu Asn
170 Gly Asn Gln Lys Asp Ile Ile Trp Glu Val Tyr Leu Ser Pro Met Ser
185 Trp Asp Tyr Val Ala Tyr Lys Ser Lys Glu Asn Ile Leu Gln Gly Gln
200 Val Lys Ile Pro Ile Asn Glu Phe Leu Lys His Leu Arg Thr Ile Leu
215 Ala Asn Asn Pro Ser Arg Ile Thr Pro Glu Lys Phe Asp Gln Met Tyr
230 Val Thr Val Trp Glu Ile Gly Thr Glu Phe Gly Asp Pro Tyr Thr Thr
245 Glu Ala Lys Phe Gly Trp Thr Phe Ser Asn Phe Asp Ile Glu Leu Lys
260 275 280 285

45

50

55

60

65