

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 200 070**

51 Int. Cl.:

C11D 3/386 (2006.01)

D06M 16/00 (2006.01)

C12N 9/42 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA

T5

96 Número de solicitud europea: **96928351 .4**

96 Fecha de presentación: **03.09.1996**

97 Número de publicación de la solicitud: **0850295**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **01.07.1998**

54 Título: **Prevención de la coloración retroactiva en el lavado a la piedra**

30 Prioridad:
08.09.1995 DK 99395

45 Fecha de publicación de la mención y de la
traducción de patente europea: **01.03.2004**

45 Fecha de la publicación de la mención de la
patente europea modificada BOPI: **27.03.2012**

45 Fecha de publicación de la traducción de patente
europea modificada: **27.03.2012**

73 Titular/es:
**NOVOZYMES A/S
KROGSHØJVEJ 36
2880 BAGSVAERD, DK**

72 Inventor/es:
**ONISHI, Masahiro;
FICH, Merete;
TOFT, Annette, Hanne y
SCHÜLEIN, Martin**

74 Agente/Representante:
Tomas Gil, Tesifonte Enrique

ES 2 200 070 T5

DESCRIPCIÓN

Prevención de la coloración retroactiva en el lavado a la piedra

CAMPO TÉCNICO

[001] Esta invención se refiere a un método para provocar una variación localizada de la densidad del color en la superficie de un tejido celulósico teñido, y a una composición para dicho método.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] En la fabricación de prendas hechas de tejidos celulósicos teñidos, p. ej., vaqueros hechos a partir de denim teñido de azul índigo, es común el tratamiento del denim para proporcionar un estilo de "lavado a la piedra" (abrasión del color localizada en la superficie del denim). Esto se puede conseguir agitando el denim en un medio acuoso que contiene un agente de abrasión mecánica, como la piedra pómez, una celulasa abrasiva o una combinación de ambas. Es preferible realizar el proceso con un pH prácticamente neutro, de modo que se prefiere utilizar una celulasa con una alta actividad para esta gama de pH. En el pasado, las preparaciones de celulasa se producían generalmente mediante el cultivo de microorganismos de origen natural, y dichas preparaciones contenían de forma invariable una mezcla de muchos componentes diferentes de celulasa. En la patente US 4,832,864 (de Ecolab) se describe un proceso que utiliza una preparación de mezcla de celulasa de este tipo.

[0003] Los rápidos avances en las técnicas del ADN recombinante han hecho posible la producción de enzimas monocomponentes con un rendimiento elevado y, en consecuencia, los procesos que utilizan celulasas monocomponentes han adquirido un mayor interés. Así, las patentes WO 91/17243 y WO 95/09225 (Novo Nordisk) describen un proceso que utiliza una endoglucanasa monocomponente denominada EG V con un peso molecular de ~43 kD, derivada de la cepa *Humicola insolens* DSM 1800, con una actividad óptima en un pH prácticamente neutro. La patente WO 94/21801 (Genencor) describe la utilización en el "lavado a la piedra" de una celulasa monocomponente denominada EG III derivada de la *Trichoderma longibrachiatum*, conocida por tener un pH óptimo entre 5.5 y 6.0, y por mantener una actividad significativa con un pH alcalino. La patente WO 95/16782 (Genencor International) sugiere la utilización de otras celulasas monocomponentes derivadas de la *Trichoderma* en el "lavado a la piedra", pero estas celulasas son ácidas y no presentan prácticamente actividad alguna con un pH neutro.

[0004] Un problema general en los métodos conocidos como "lavado a la piedra" es la coloración retroactiva, es decir, un fenómeno mediante el cual el tinte ya eliminado por abrasión se deposita sobre algunas partes del tejido o la prenda de manera que iguala la variación deseada de densidad del color o decolora cualquier zona de la prenda teñida en un color claro.

EXPOSICIÓN DE LA INVENCION

[0005] Se ha descubierto que, sorprendentemente, la adición de un tipo determinado de celulasa (a partir de ahora denominada primer componente) reduce la coloración retroactiva. La celulasa en cuestión no tiene un efecto abrasivo significativo en sí mismo.

[0006] En consecuencia, la invención proporciona un método para provocar una variación localizada de la densidad del color en la superficie de un tejido celulósico teñido según la reivindicación 1.

DEFINICIONES

[0007] En esta especificación junto con las reivindicaciones, son de aplicación las siguientes definiciones:

[0008] El término "celulasa" se refiere a un enzima que contribuye a la hidrólisis de la celulosa, como una celobiohidrolasa (según la nomenclatura de las enzimas: *Enzyme Nomenclature* E.C. 3.2.1.91), una endoglucanasa (en adelante denominada con la abreviatura "EG", E.C. 3.2.1.4), o una β -glucosidasa (E.C. 3.2.1.21).

[0009] Las celulasas están clasificadas por familias basándose en las similitudes de las secuencias de aminoácidos según el sistema de clasificación descrito en Henrissat, B. et al.: *Biochem. J.*, (1991), 280, p. 309-16, y Henrissat, B. et al.: *Biochem. J.*, (1993), 293, p.781-788.

[0010] Las celulasas empleadas en esta invención son preferiblemente monocomponentes, es decir, el medio acuoso empleado en la invención debería estar libre de otros componentes de celulasas distintos de los especificados. Las enzimas monocomponentes pueden ser preparadas de forma económica mediante tecnología de ADN recombinante, es decir, se pueden producir mediante la clonación de una secuencia de ADN codificadora del monocomponente, transformando posteriormente la célula huésped apropiada con la secuencia de ADN y expresando el componente en la célula huésped.

[0011] En consecuencia, la secuencia de ADN que codifica una celulasa útil puede ser aislada mediante un método general que implica:

- clonación de un banco de ADN en vectores adecuados, p. ej. a partir de uno de los microorganismos indicados más adelante en esta especificación,
- transformación de las células huéspedes de levadura adecuadas con estos vectores,

- cultivo de las células huéspedes bajo condiciones adecuadas para expresar cualquier enzima de interés codificada por un clon en el banco de ADN,

- selección de los clones positivos determinando cualquier actividad celulasa de la enzima producida por estos clones, y

5 - aislamiento del ADN codificador de la enzima de estos clones.

[0012] Este método general se describe mejor en la patente WO 94/14953 (Novo Nordisk).

[0013] Una secuencia de ADN que codifica una celulasa útil puede ser aislada, por ejemplo, seleccionando un banco de ADNc del microorganismo en cuestión y seleccionando los clones que expresan la actividad enzimática apropiada (es decir, la actividad celulasa).

10 [0014] De forma alternativa y según unos procedimientos bien conocidos, el ADN que codifica una celulasa útil puede ser aislado convenientemente del ADN de una fuente adecuada, usando sondas sintéticas de oligonucleótidos preparadas en base a una secuencia de ADN conocida.

[0015] Posteriormente, la secuencia de ADN puede ser introducida en un vector de expresión recombinante. Este podrá ser cualquier vector que pueda ser convenientemente sometido a procedimientos de ADN recombinante, y la elección del vector dependerá a menudo de la célula huésped en la que vaya a ser introducido. De esta manera, el vector podrá ser un vector de replicación autónoma, es decir, un vector que existe como una entidad extracromosómica, cuya replicación es independiente de la replicación cromosómica, p. ej. un plásmido. De forma alternativa, el vector podrá ser uno que, al ser introducido en una célula huésped, se integre en el genoma huésped celular y se replique junto con el/los cromosoma(s) en donde haya sido integrado.

20 [0016] En el vector, la secuencia de ADN codificadora de la celulasa debería estar conectada de forma operativa a un promotor y a una secuencia de terminación adecuados. El promotor puede ser cualquier secuencia de ADN que muestre una actividad transcripcional en la célula huésped seleccionada y podrá proceder de genes codificadores de proteínas, ya sean homólogos o heterólogos de la célula huésped. Los procedimientos empleados para enlazar las secuencias de ADN que codifican la celulasa, el promotor y el terminador, respectivamente, y para insertarlos en vectores adecuados son bien conocidos para los expertos en la técnica (ver, por ejemplo, Sambrook et al., *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, NY, 1989).

[0017] La célula huésped transformada con la secuencia de ADN es preferiblemente una célula eucariótica, en particular una célula micótica, como una levadura, o una célula micótica filamentosa. En particular, la célula puede pertenecer a una especie de *Aspergillus* o de *Trichoderma*, más preferiblemente *Aspergillus oryzae* o *Aspergillus niger*. Las células micóticas pueden ser transformadas mediante un proceso que implica la formación de protoplastos y la transformación de los protoplastos, seguida de la regeneración de la membrana celular según un modo conocido *per se*. La utilización del *Aspergillus* como microorganismo huésped se describe en la patente EP 238 023 (Novo Nordisk A/S). La célula huésped también puede ser una célula de levadura, p. ej. una cepa de *Saccharomyces*, en particular *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces kluyveri* o *Saccharomyces uvarum*, una cepa de *Schizosaccharomyces sp.*, como *Schizosaccharomyces Pombe*, una cepa de *Hansenula sp.*, de *Pichia sp.*, de *Yarrowia sp.*, como *Yarrowia lipolytica*, o bien de *Kluyveromices sp.*, como *Kluyveromices lactis*.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Tejido celulósico teñido

40 [0018] El método de la invención puede aplicarse a cualquier tipo de tejido celulósico teñido en el que se desee provocar una variación localizada de la densidad del color en la superficie. Un ejemplo de interés comercial en particular es el denim, en particular el denim teñido de azul índigo para utilizar en vaqueros, etc.

[0019] El tejido puede ser tratado en forma de una tela sin coser o una prenda cosida hecha de este tejido. Es particularmente interesante aplicar el proceso de la invención en una tela o prenda nueva y limpia.

Componente 1

45 [0020] El primer componente es endoglucanasa EG I derivada de *Humicola insolens* DSM 1800. Está presente en una cantidad efectiva para impedir la coloración retroactiva, normalmente entre 0,05 y 5 mg/l (como una proteína enzimática pura), en particular entre 0,1 y 0,5 mg/l; normalmente correspondiendo a una actividad de 10-1000 ECU/l, en particular de 100-1000 ECU/l; o a una actividad de 0,5-100 ECU/g de tejido.

Componente 2

50 [0021] El segundo es endoglucanasa EG V derivada de cepa de *Humicola insolens* DSM 1800. Una forma de realización preferida de la invención comprende un agente abrasivo mecánico.

[0022] Algunos ejemplos de agentes abrasivos mecánicos son la piedra pómez, la perlita expandida por el calor y elementos abrasivos (p. ej. bolas abrasivas).

55 [0023] El segundo componente está presente en una cantidad eficaz para que la abrasión provoque una variación localizada de la densidad del color. Si el segundo componente es una celulasa abrasiva, estará presente

normalmente en una cantidad de 0,05-5 mg/l (en forma de una proteína enzimática pura), particularmente de 0,1-0,5 mg/l; normalmente correspondiendo a una actividad de 10-1000 ECU/l, particularmente de 100-1000 ECU/l; o una actividad de 0,1-100 ECU/g de tejido, particularmente de 0,5-10 ECU/g.

Condiciones del método

- 5 [0024] El método de la invención puede llevarse a cabo bajo condiciones convencionales en una máquina de lavado usada de forma convencional para el lavado a la piedra (p. ej. una lavadora-extractora). Unas condiciones típicas son una temperatura de entre 40 y 60°C y una proporción tejido : solución entre 1:3 y 1:20 durante 15 minutos a 2 horas. De forma opcional, se pueden emplear aditivos convencionales, p. ej. un tampón, un agente tensioactivo (aniónico y/o no iónico) y/o un polímero (tal como PVP, poliacrilato y poliacrilamida).

10 Ensayo de la actividad celulasa

[0025] La endo-actividad de la celulasa se determina por la reducción de la viscosidad de la CMC (celulosa carboximetilica) en un viscosímetro de vibración. Una ECU (unidad de endo-celulasa) es la cantidad de actividad que causa una reducción de la viscosidad diez veces menor cuando se incuba con 1 ml de una solución de 34,0 g/l de CMC (nombre comercial Aqualon 7LFD) en un tampón de fosfato 0,1 M (pH 7.5), a 40°C durante 30 minutos.

15 Ensayo de la hidrólisis de PNP-Cel

[0026] La capacidad de una celulasa para hidrolizar la p-nitrofenil-b-1,4-celobiosida (PNP-Cel) se determina por la detección directa por cinética estable del color amarillo del producto de p-nitrofenol (PNP) por absorción a 405 nm. Las condiciones del ensayo son 37°C, pH 7.5 (tampón de fosfato 0,1 M). El nivel de hidrólisis (en micromoles de PNP por minuto) es comparado con la actividad celulasa (ECU) y el resultado se expresa en micromoles de PNP por minuto por ECU.

20

EJEMPLOS

Ejemplo 1

[0027] Se trató un denim teñido de azul índigo junto con muestras de algodón blanco usando varias combinaciones de celulasa, de la manera siguiente:

pH	7 (tampón de fosfato en agua corriente)
Temperatura	55°C
Equipamiento	Launderómetro (recipientes de 150 ml)
Componente 1	EG I derivada de <i>Humicola insolens</i> DSM 1800 0-2,3 ECU/ml como se indica más abajo
Componente 2	EG V derivada de <i>Humicola insolens</i> DSM 1800 0 ó 0,27 ECU/ml
Denim	5 g/ recipiente
Algodón blanco	2 muestras/ recipiente
Duración	2 horas

- 25 [0028] Después del tratamiento, la fibra de algodón fue recogida y medida como una expresión de la acción abrasiva de la(s) celulasa(s). Se determinó la remisión de las muestras blancas después del tratamiento (D R a 680 nm, en relación a un experimento sin celulasa) y se consideró como una expresión de la coloración retroactiva. Resultados:

	Componente 1 ECU/ml	Componente 2 ECU/ml	Abrasión (mg fibra de algodón)	Reducción de la coloración retroactiva (D R)
Referencia	0	0	-	0
	0	0,27	33	-3,8
Invención	0,115	0,27	42	-0,7
	0,23	0,27	36	3,0
	1,15	0,27	38	8,2
	2,3	0,27	62	10,4

[0029] Se obtuvo una buena abrasión con la celulasa del componente 2. La adición de la celulasa del componente 1 redujo significativamente la coloración retroactiva.

Ejemplo 2

[0030] Las siguientes celulasas fueron evaluadas con las mismas condiciones del ejemplo 1:

Componente 1	EG I derivada de <i>Humicola insolens</i> DSM 1800 0; 0,67 o 1,33 ECU/ml
Componente 2	EG I derivada de <i>Humicola insolens</i> DSM 1800, 0,7 ECU/ml

5 [0031] Se evaluó la abrasión midiendo la cantidad de fibra de algodón después de cada tratamiento. Se obtuvo una buena abrasión en cada experimento, con un ligero aumento causado por la adición de EG I.

[0032] Se determinó la inhibición de la coloración retroactiva por el aumento de la absorbancia del filtrado a 680 nm y por el aumento de la remisión del tejido blanco a 420 nm. Los resultados indicaron que se había obtenido esencialmente la misma inhibición de la coloración retroactiva con EG I.

10 LISTADO DE SECUENCIA

[0033]

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

(i) SOLICITANTE:

- (A) NOMBRE: Novo Nordisk A/S
- 15 (B) CALLE: Novo Alle
- (C) CIUDAD: Bagsvaerd
- (E) PAÍS: Dinamarca
- (F) CÓDIGO POSTAL (ZIP): DK-2880
- (G) TELÉFONO: +45-4444-8888
- 20 (H) FAX: +45-4449-3256

(ii) TÍTULO DE LA INVENCION: Prevención de la coloración retroactiva en el lavado a la piedra

(iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 1

(iv) FORMATO INFORMÁTICO:

- (A) TIPO DE MEDIO: disquete
- (B) ORDENADOR: PC IBM Compatible
- (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
- 30 (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, versión #1.30 (EPO)

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID N°: 1:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 35 (A) LONGITUD: 551 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) TIPO DE CADENA::
- (D) TOPOLOGÍA: lineal (ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(vi) FUENTE DE ORIGEN:

(A) ORGANISMO: *Bacillus lautus*

(B) CEPA: NCIMB 40250

5

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID N°: 1:

ES 2 200 070 T5

Ala	Pro	Ala	Val	Pro	Phe	Gly	Gln	Leu	Lys	Val	Gln	Gly	Asn	Gln	Leu
1				5					10					15	
Val	Gly	Gln	Ser	Gly	Gln	Ala	Val	Gln	Leu	Val	Gly	Met	Ser	Ser	His
			20					25					30		
Gly	Leu	Gln	Trp	Tyr	Gly	Asn	Phe	Val	Asn	Lys	Ser	Ser	Leu	Gln	Trp
		35					40					45			
Met	Arg	Asp	Asn	Trp	Gly	Ile	Asn	Val	Phe	Arg	Ala	Ala	Met	Tyr	Thr
	50					55					60				
Ala	Glu	Asp	Gly	Tyr	Ile	Thr	Asp	Pro	Ser	Val	Lys	Asn	Lys	Val	Lys
65					70					75					80
Glu	Ala	Val	Gln	Ala	Ser	Ile	Asp	Leu	Gly	Leu	Tyr	Val	Ile	Ile	Asp
				85					90					95	

ES 2 200 070 T5

Trp His Ile Leu Ser Asp Gly Asn Pro Asn Thr Tyr Lys Ala Gln Ser
 100 105 110
 Lys Ala Phe Phe Gln Glu Met Ala Thr Leu Tyr Gly Asn Thr Pro Asn
 115 120 125
 Val Ile Tyr Glu Ile Ala Asn Glu Pro Asn Gly Asn Val Ser Trp Ala
 130 135 140
 Asp Val Lys Ser Tyr Ala Glu Glu Val Ile Thr Ala Ile Arg Ala Ile
 145 150 155 160
 Asp Pro Asp Gly Val Val Ile Val Gly Ser Pro Thr Trp Ser Gln Asp
 165 170 175
 Ile His Leu Ala Ala Asp Asn Pro Val Ser His Ser Asn Val Met Tyr
 180 185 190
 Ala Leu His Phe Tyr Ser Gly Thr His Gly Gln Phe Leu Arg Asp Arg
 195 200 205
 Ile Thr Tyr Ala Met Asn Lys Gly Ala Ala Ile Phe Val Thr Glu Trp
 210 215 220
 Gly Thr Ser Asp Ala Ser Gly Asn Gly Gly Pro Tyr Phe Pro Gln Ser
 225 230 235 240
 Lys Glu Trp Ile Asp Phe Leu Asn Ala Arg Lys Ile Ser Trp Val Asn
 245 250 255
 Trp Ser Leu Ala Asp Lys Val Glu Thr Ser Ala Ala Leu Met Pro Gly
 260 265 270
 Ala Ser Pro Thr Gly Gly Trp Thr Asp Ala Gln Leu Ser Glu Ser Gly
 275 280 285
 Lys Trp Val Arg Asp Gln Ile Arg Gln Ala Thr Gly Gly Gly Ser Gly
 290 295 300
 Asn Pro Thr Ala Pro Ala Ala Pro Thr Asn Leu Ser Ala Thr Ala Gly
 305 310 315 320
 Asn Ala Gln Val Ser Leu Thr Trp Asn Ala Val Ser Gly Ala Thr Ser
 325 330 335
 Tyr Thr Val Lys Arg Ala Thr Thr Ser Gly Gly Pro Tyr Thr Asn Val
 340 345 350
 Ala Thr Gly Val Thr Ala Thr Ser Tyr Thr Asn Thr Gly Leu Thr Asn
 355 360 365
 Gly Thr Thr Tyr Tyr Tyr Val Val Ser Ala Ser Asn Ser Ala Gly Ser
 370 375 380
 Ser Ala Asn Ser Ala Gln Ala Ser Ala Thr Pro Ala Ser Gly Gly Ala
 385 390 395 400
 Ser Thr Gly Asn Leu Val Val Gln Tyr Lys Val Gly Asp Thr Ser Ala
 405 410 415

ES 2 200 070 T5

Thr	Asp	Asn	Gln	Met	Lys	Pro	Ser	Phe	Asn	Ile	Lys	Asn	Asn	Gly	Thr
			420						425			430			
Thr	Pro	Val	Asn	Leu	Ser	Gly	Leu	Lys	Leu	Arg	Tyr	Tyr	Phe	Thr	Lys
			435						440			445			
Asp	Gly	Thr	Ala	Asp	Met	Ser	Ala	Ser	Phe	Asp	Trp	Ala	Gln	Ile	Gly
			450						455			460			
Ala	Ser	Asn	Val	Ser	Ala	Ala	Phe	Ala	Asn	Phe	Thr	Gly	Ser	Asn	Thr
			465						470			475			
Asp	Thr	Tyr	Val	Glu	Leu	Ser	Phe	Ser	Ala	Gly	Ser	Gly	Ser	Ile	Pro
			485						490			495			
Ala	Gly	Gly	Gln	Thr	Gly	Asp	Ile	Gln	Leu	Arg	Met	Tyr	Lys	Thr	Asp
			500						505			510			
Trp	Ser	Asn	Phe	Asn	Glu	Ala	Asn	Asp	Tyr	Ser	Tyr	Asp	Gly	Ala	Lys
			515						520			525			
Thr	Ala	Tyr	Ala	Asp	Trp	Asn	Arg	Val	Thr	Leu	His	Gln	Asn	Gly	Thr
			530						535			540			
Leu	Val	Trp	Gly	Thr	Thr	Pro									
			545						550						

REIVINDICACIONES

1. Método para formar una variación localizada de la densidad del color en la superficie de un tejido celulósico teñido, que comprende la agitación del tejido en un medio acuoso con un pH en una gama entre 6.5 y 9, y que contiene:
 - 5 un primer componente que es endoglucanasa EG I derivada de cepa de *H. insolens* DSM 1800.
y un segundo componente que es endoglucanasa EG V derivada de cepa de *H. insolens* DSM 1800
donde cada celulasa exhibe al menos un 30 % de su actividad máxima con un pH 7, Y donde esencialmente no hay ninguna celulasa presente distinta al primer y segundo componente especificados.
2. Método según la reivindicación 1 según el cual el tejido es denim teñido de azul índigo.
- 10 3. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que el primer componente está presente en una cantidad de 0,1-0,5 mg/l o en una concentración de 100-1000 ECU/l.
4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-3 en el que el segundo componente comprende adicionalmente un agente abrasivo mecánico.