

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional(43) Fecha de publicación internacional
26 de Septiembre de 2002 (26.09.2002)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 02/075045 A1(51) Clasificación Internacional de Patentes⁷: D21C 9/08,
11/00, C12N 9/18, 9/20 // (C12N 9/18, C12R 1:645)

(21) Número de la solicitud internacional: PCT/ES02/00120

(22) Fecha de presentación internacional:
14 de Marzo de 2002 (14.03.2002)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P200100618 16 de Marzo de 2001 (16.03.2001) ES(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US):
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS [ES/ES]; C/Serrano, 117, E-28006
Madrid (ES).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): CALERO
RUEDA, Olga [ES/ES]; Centro Inv. Biológicas, Consejo
Superior De Investigaciones Científicas, C/Velázquez,
144, E-28006 Madrid (ES). GUTIERREZ SUAREZ,
Ana [ES/ES]; Insto. Recur. Natur. y Agrobiol. Sevilla,
Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Apartado
1052 Estafeta-Puerto, E-41080 Sevilla (ES). DEL RIO
ANDRADE, José Carlos [ES/ES]; Insto. Recur. Natur.
y Agrobiol. Sevilla, Consejo Superior de Investigaciones
Científicas, Apartado 1052 Estafeta-puerto, E-41080Sevilla (ES). MUÑOZ MARTÍN, María del Carmen
[ES/ES]; Centro Inv. Biológicas, Consejo Superior de
Investigaciones Científicas, C/Velázquez, 144, E-28006
Madrid (ES). PLOU GASCA, Francisco José [ES/ES];
Insto. Catalisis y Petroleoquímica, Consejo Superior de
Investigaciones Científicas, Csic. Campus de Cantoblanco,
E-28049 Madrid (ES). MARTÍNEZ FERRER, Angel
Tomás [ES/ES]; Centro Inv. Biológicas, Consejo Superior
de Investigaciones Científicas, C/Velázquez, 144, E-28006
Madrid (ES). MARTÍNEZ HERNÁNDEZ, María Jesús
[ES/ES]; Centro Inv. Biológicas, Consejo Superior de
Investigaciones Científicas, C/Velázquez, 144, E-28006
Madrid (ES).(74) Mandatario: REPRESA SÁNCHEZ, Domingo; Oficina
de Transferencia de Tecnología, Consejo Superior de Inves-
tigaciones Científicas, C/Serrano, 113 - 2 Planta, E-28006
Madrid (ES).(81) Estados designados (nacional): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,
MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU,
SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.(84) Estados designados (regional): patente ARIPO (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), patente
euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
patente europea (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR,
GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), patente OAPI

[Continúa en la página siguiente]

(54) Title: METHOD FOR THE ENZYMATIC CONTROL OF PITCH DEPOSITS FORMED DURING PAPER PULP PRODUCTION USING AN ESTERASE THAT HYDROLYSES TRIGLYCERIDES AND STEROL ESTERS

(54) Título: PROCEDIMIENTO PARA EL CONTROL ENZIMÁTICO DE LOS DEPÓSITOS DE BREA (PITCH) FORMADOS DURANTE LA FABRICACIÓN DE PASTA DE PAPEL UTILIZANDO UNA ESTERASA QUE HIDROLIZA TANTO TRIGLICÉRIDOS COMO ÉSTERES DE ESTEROLES

WO 02/075045 A1

(57) Abstract: The invention relates to the selection of a mushroom, *Ophiostoma piceae*, which secretes a commercial esterase. The invention also relates to the production and characterisation of the enzyme and the application tests carried out on synthetic process liquids and pulps representative of paper pulp production processes using hardwood and softwood. The results obtained demonstrate that the novel enzyme possesses great affinity and activity in relation to cholesterol linoleate, oleate, tributyrin and triolein, said enzyme being able to reduce the concentrations of sterol esters and triglycerides during the treatment of process liquids from the production of eucalyptus and pine pulps respectively.(57) Resumen: Se describe la selección de un hongo, *Ophiostoma piceae*, que secreta una esterasa de interés comercial, la producción y caracterización de la enzima, y los ensayos de aplicación sobre líquidos de proceso sintéticos y pastas representativas de los procesos de producción de pasta de papel a partir de maderas de frondosas y coníferas. Los resultados obtenidos muestran que la nueva enzima posee elevada afinidad y actividad sobre trioleína y tributirina y oleato y linoleato de colesterol, siendo capaz de reducir las concentraciones de ésteres de esteroides y triglicéridos durante el tratamiento de líquidos de proceso de la fabricación de pastas de eucalipto y pino respectivamente.

WO 02/075045 A1



(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE,
SN, TD, TG).

Fecha de publicación de las reivindicaciones modificadas:

13 de Marzo de 2003

Publicada:

- *con informe de búsqueda internacional*
- *con reivindicaciones modificadas*

Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase la sección "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" que aparece al principio de cada número regular de la Gaceta del PCT.

REIVINDICACIONES MODIFICADAS

[recibidas por la oficina Internacional el 20 de septiembre de 2002 (20.09.2002);
reivindicaciones 1-25 reemplazadas por les reivindicaciones 1-27 modificadas (4 páginas)]

- 1.- Esterasa fúngica que combina propiedades catalíticas de lipasas (EC 3.1.1.3) y esterol esterasas (EC 3.1.1.13) caracterizada porque los esteres de esteroides que
5 hidroliza son esteres de sitosterol, colesterol, stigmastanol, fucosterol, cicloartenol, 24-metilencicloartenol y citrostadienol con ácidos grasos, en particular oleico y linoleico, y los glicéridos que hidroliza son triglicéridos, diglicéridos y monoglicéridos de ácidos grasos, en particular oleico y linoleico.
- 10 2.- Esterasa según la reivindicación 1, caracterizada porque es producida por hongos ascomicetos productores del llamado "azulado" de la madera.
- 3.- Esterasa según la reivindicaciones 1 y 2, caracterizada porque es producida por hongos del género *Ophiostoma*.
- 15 4.- Esterasa según la reivindicaciones 1-3, caracterizada porque la esterasa aplicada es producida por la especie *Ophiostoma piceae*.
- 5.- Esterasa según la reivindicaciones 1-4, caracterizada porque la secuencia N-terminal es la SEQ.ID.NO 1.
- 20 6.- Esterasa según las reivindicaciones 1-5, caracterizada porque es una glicoproteína con un 8% de carbohidratos unidos por enlaces N-glicosídicos y una masa molecular estimada por electroforesis en condiciones desnaturizantes de 56,5 kDa.
- 25 7.- Esterasa según la reivindicación 1-6, caracterizada porque es producida por la cepa CECT 20416 de *Ophiostoma piceae*.
- 8.- Esterasa según las reivindicaciones 1-7 caracterizada por ser una esterasa
30 recombinante codificada por el gen de la esterasa de *Ophiostoma picea* CECT 20416.

- 9.- Procedimiento para la obtención de la esterasa de *Ophiostoma piceae* CECT 20416 según las reivindicaciones 1-7, caracterizado por la producción de la enzima en cultivo líquido del hongo, que puede incluir un compuesto lipídico como inductor; y su posterior purificación mediante cromatografía de interacción hidrofóbica.
- 5
- 10.- Procedimiento para la obtención de la esterasa recombinante según la reivindicación 8 que incluye: i) La amplificación por PCR (reacción de polimerasa en cadena) de una sonda utilizando como iniciadores oligonucleótidos que codifican la secuencia N-terminal de la esterasa purificada de *Ophiostoma piceae* (SEQ.ID.NO 1) y secuencias internas de dicha proteína y DNA o cDNA del mismo hongo como molde; 10 ii) la utilización de dicha sonda para realizar el "screening" de una librería de cDNA de *Ophiostoma piceae*; iii) la clonación del gen que codifica la enzima en un vector adecuado; y iv) su expresión heteróloga en alguno de los organismos usados para la producción industrial de enzimas.
- 15
- 11.- Utilización de una esterasa según las reivindicaciones 1-8, para el control de los depósitos de brea (pitch) formados durante la fabricación de pasta de papel caracterizada porque la madera utilizada como materia prima para la fabricación de pasta de papel es madera de frondosas (angiospermas leñosas).
- 20
- 12.- Utilización de la esterasa según la reivindicación 11, caracterizada porque la madera utilizada como materia prima para la fabricación de pasta de papel es madera de especies de eucalipto, chopo, álamo, o abedul.
- 25
- 13.- Utilización de la esterasa según las reivindicación 12, caracterizada porque la madera utilizada como materia prima para la fabricación de pasta de papel pertenece a las especies *Eucalyptus globulus*, *Eucalyptus camaldulensis*, *Eucalyptus grandis*, *Populus tremula*, *Populus tremuloides*, *Betula pendula* o *Betula tremula*.
- 30
- 14.- Utilización de la esterasa según las reivindicación 11, caracterizada porque la madera utilizada como materia prima para la fabricación de pasta de papel es madera de coníferas (gimnospermas leñosas).

15.- Utilización de la esterasa según la reivindicación 14, caracterizada porque la madera utilizada como materia prima para la fabricación de pasta de papel es madera de especies de *Pinus* o *Picea*.

5

16.- Utilización de la esterasa según las reivindicación 15, caracterizada porque la madera utilizada como materia prima para la fabricación de pasta de papel pertenece a las especies *Pinus sylvestris*, *Pinus taeda*, *Pinus contorta*, *Pinus virginiana*, o *Picea abies*.

10

17.- Utilización de la esterasa según las reivindicaciones 11-16, caracterizada porque la pasta de papel se fabrica mediante los procedimientos de pulpeo de la madera denominados mecánicos.

15

18.- Utilización de la esterasa según las reivindicaciones 11-16, caracterizada porque la pasta de papel se fabrica mediante los procedimientos de pulpeo de la madera denominados químicos.

20

19.- Utilización de la esterasa según las reivindicación 18, caracterizada porque la pasta de papel se fabrica mediante los procedimientos de pulpeo químicos denominados cocción kraft o cocción al sulfito.

25

20.- Utilización de la esterasa según las reivindicaciones 11-16, caracterizada porque la pasta de papel se fabrica mediante una combinación de los procedimientos de pulpeo de la madera denominados mecánicos y químicos.

30

21.- Utilización de la esterasa según las reivindicaciones 18-20 caracterizada porque la pasta de papel se blanquea por los procedimientos denominados ECF (libres de cloro elemental).

- 22.- Utilización de la esterasa según las reivindicaciones 18-20, caracterizada porque la pasta de papel se blanquea por los procedimientos denominados TCF (totalmente libres de cloro).
- 5 23.- Utilización de la esterasa según las reivindicaciones 13, 19, 21 y 22 caracterizada porque el control enzimático de los depósitos de "pitch" se aplica durante la fabricación de pasta kraft de madera de *Eucalyptus globulus* blanqueada mediante procedimientos ECF o TCF.
- 10 24.- Utilización de la esterasa según las reivindicaciones 11-23, caracterizada porque la esterasa utilizada para el control enzimático del "pitch" se aplica a la pasta tras la cocción, durante el blanqueo o al término de éste a una temperatura comprendida entre 4°C y 60°C y un pH entre 3,5 y 8, preferentemente entre 3,5 y 6,5 por un tiempo entre 10 minutos y 24 horas, preferentemente entre 1 y 6 horas.
- 15 25.- Utilización de la esterasa según las reivindicaciones 11-23, caracterizada porque la esterasa utilizada para el control enzimático del "pitch" se aplica a los líquidos de proceso procedentes de la cocción, el lavado de la pasta, o el blanqueo de la misma a una temperatura comprendida entre 4°C y 60°C y un pH entre 3,5 y 8, preferentemente
20 entre 3,5-6,5 por un tiempo entre 10 minutos y 24 horas, preferentemente entre 1 y 6 horas.
- 26.- Utilización de la esterasa según la reivindicación 24, caracterizada porque la concentración de la esterasa utilizada está comprendida entre 0,05 – 50 U/g de pasta,
25 preferentemente entre 0,1- 5 U/g de pasta, más preferentemente entre 0,1- 1 U/g de pasta.
- 27.- Utilización de la esterasa según la reivindicación 25, caracterizada porque la concentración de la esterasa utilizada está comprendida entre 0,050 – 50 U/l de líquido
30 de proceso, preferentemente entre 0,1-5 U/l de líquido de proceso, más preferentemente entre 0,1-1 U/l de líquido de proceso.