



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 179 768**

② Número de solicitud: 200100618

⑤ Int. Cl.7: **C12N 9/18**  
C12N 9/20  
C12N 9/16  
D21C 9/08  
D21C 11/00  
//(C12N 9/18  
C12R 1:645)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **16.03.2001**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **16.01.2003**

Fecha de la concesión: **17.03.2004**

⑭ Fecha de anuncio de la concesión: **16.04.2004**

⑮ Fecha de publicación del folleto de la patente:  
**16.04.2004**

⑰ Titular/es: **CONSEJO SUPERIOR DE  
INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS  
c/ Serrano, nº117  
28006 Madrid, ES**

⑱ Inventor/es: **Calero Rueda, Olga;  
Gutiérrez Suárez, Ana;  
Del Río Andrade, José Carlos;  
Muñoz Martín, María Carmen;  
Plou Gasca, Francisco José;  
Martínez Ferrer, Ángel Tomás y  
Martínez Hernández, María Jesús**

⑲ Agente: **No consta**

⑳ Título: **Esterasa, procedimiento de obtención y su utilización para el control enzimático de los depósitos de brea (pitch) formados durante la fabricación de pasta de papel.**

㉑ Resumen:

Esterasa, procedimiento de obtención y su utilización para el control enzimático de los depósitos de brea (pitch) formados durante la fabricación de pasta de papel.

Esterasa de interés comercial secretada por el hongo *Ophiostoma piceae*, procedimiento de obtención de la enzima, y su utilización para el control de los depósitos de brea ("pitch") durante la 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 tributirina y oleato y linoleato de colesterol, siendo capaz de reducir las concentraciones de diferentes ésteres de esteroides y triglicéridos durante el tratamiento de líquidos de proceso de la fabricación de pastas de eucalipto y pino, así como al actuar directamente sobre la pasta obtenida. Ambos tipos de compuestos son responsables de la formación de depósitos de "pitch" en pastas y maquinaria causando importantes pérdidas económicas durante la fabricación de pasta y papel.

ES 2 179 768 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

## DESCRIPCION

Esterasa, procedimiento de obtención y su utilización para el control enzimático de los depósitos de brea (pitch) formados durante la fabricación de pasta de papel.

5 **Sector de la técnica**

La invención va dirigida al sector industrial de producción de pasta de papel, para empresas que utilizan madera tanto de frondosas como de coníferas como materia prima. Utilizando la invención descrita es posible i) hidrolizar los ésteres de esteroides y triglicéridos procedentes de la fracción extraíble de la madera, ii) disminuir los problemas de depósitos en las pastas de papel causados por estos compuestos; y iii) reducir los costos en los procesos industriales de fabricación de pasta y papel. Respecto al segundo punto, con el tratamiento enzimático se disminuye la concentración de ésteres de ácidos grasos en las pastas y líquidos de proceso lo que reduce en un aumento en la calidad del producto final al reducirse el nivel de depósitos. Respecto al tercero, este tratamiento puede reducir el número de interrupciones por depósitos de "pitch" (en castellano brea o betún) en los procesos industriales de fabricación de pasta y papel, con el consiguiente ahorro de tiempo y energía.

**Estado de la técnica**

20 La fabricación de pastas de papel mediante tecnologías no contaminantes ha traído consigo nuevos problemas en la producción y blanqueo de la pasta. Entre estos problemas ocupa un lugar importante la formación de depósitos que reducen la calidad del producto final, e incluso obligan a la realización de paradas técnicas en las máquinas, produciendo graves pérdidas en este sector industrial (Hillis et al., 1989. Effect of extractives on pulping. In: Natural products of woody plants. 11, Ed: Rowe, J. W., Berlin, 880-920). A los depósitos oscuros que se producen durante el proceso de fabricación de la pasta y el papel causados por componentes de la fracción extraíble de la madera se les denomina depósitos de "pitch" (en castellano brea o betún). A menudo otros productos, p.ej. restos de gomas procedentes de la maquinaria y/o diferentes aditivos presentes en las aguas de proceso, se incorporan también a dichos depósitos donde las breas actúan como aglomerantes.

Los componentes de la fracción extraíble de la madera (obtenida utilizando tolueno-etanol, diclorometano o acetona) implicados en la formación de depósitos de "pitch" son generalmente de naturaleza lipofílica (solubles en cloroformo o hexano) e incluyen grasas, ceras, alcoholes grasos, ácidos grasos, terpenos, esteroides y ésteres de esteroides (Hillis, 1962. Wood extractives. Ed: Academic Press, London). La problemática de la formación de depósitos de "pitch" en la fabricación de pasta de coníferas se ha estudiado mucho en los últimos años debido al uso mayoritario de este tipo de madera en los principales países productores de pasta (USA, Canadá y los países nórdicos de la UE). Entre los procedimientos tradicionales ensayados para el control del "pitch" se encuentran: el descortezado de la madera, el almacenamiento a la intemperie de troncos o astillas y la adición a las pastas y/o líquidos de proceso de agentes que limiten la deposición del "pitch" (Allen, 1980. Mechanisms and control of pitch deposition in newsprint mills. Tappi J., 63: 81-87; Allen, 1988. Pitch control during production of aspen Kraft pulp. Pulp Paper Can., 89: 87-91). Sin embargo, tales métodos no han sido suficientes para eliminar los problemas de deposición de "pitch" en la pasta de papel.

45 Como alternativa a los métodos químicos, en los últimos años, se han desarrollado para el control de "pitch" métodos biológicos que se basan en el uso de microorganismos o sus enzimas. En la actualidad existen preparados comerciales para inocular la madera con microorganismos (Farrell et al., 1993. Cartapip<sup>TM</sup>: A Biopulping Product for Control of Pitch and Resin Acid Problems in Pulp Mills. J. Biotechnol., 30: 115-122; Chen et al., 1994. Wood extractives and pitch problems: Analysis and partial removal by biological treatment. Appita, 47: 463-466) y complejos enzimáticos comerciales con actividad lipasa para tratar las pastas. Entre las lipasas estudiadas cabe destacar los estudios realizados con la lipasa recombinante (expresada en *Aspergillus oryzae*) producida por Novozymes (anteriormente Novo Nordisk) y comercializada con el nombre de Resinasa A<sup>®</sup>, y las lipasas de *Candida rugosa* y *Candida cylindraceae*. Los resultados obtenidos tratando pasta mecánica de madera de pino con estas lipasas ponen de manifiesto que se hidrolizan los triglicéridos, que se han identificado como los principales responsables de los depósitos de "pitch" en estas maderas (Fujita et al., 1992. Recent advances in enzymic pitch control. Tappi J., 75: 117-122; Fischer et al., 1992. Adsorption of lipase on pulp fibers during biological pitch control in paper industry. Enzyme Microb. Technol., 14: 470-473). En la actualidad existen tres patentes internacionales que describen la posibilidad de utilizar lipasas para reducir los problemas de pitch en la industria de pasta y papel. En la primera, WO9207138, se describe la reducción de algunos componentes resínicos de las maderas, principalmente los triglicéridos, al añadir diferentes dosis de lipasas en la etapa reductora de fabricación de pastas termomecánicas. En la segunda, WO9213130, se describe

la utilización de una lipasa en el proceso de fabricación de pasta que resiste temperaturas alrededor de 70°C. En la tercera, US 5,256,252, se describe un método para el control de pitch con lipasa y polímeros catiónicos que captan los ácidos grasos liberados por las enzimas.

5 Sin embargo, a pesar de que los problemas de “pitch” se pueden disminuir en las pastas de coníferas, que contienen en sus extractos cantidades importantes de triglicéridos (Fengel et al., 1984. Wood: Chemistry, ultrastructure, reactions. Ed: De Gruyter, Berlin; Rowe, 1989. Natural Products of Woody Plants. I and II. Chemicals Extraneous to the Lignocellulosic Cell Wall. Ed: Springer-Verlag, Berlin), el tratamiento con estas enzimas no es efectivo para evitar los problemas de “pitch” en las pastas de dife-  
10 rentes frondosas y, en particular, en las pastas kraft de *Eucalyptus globulus* (una especie muy utilizada por la industria papelera en España y Portugal) y otras especies del mismo género.

En los últimos años, las investigaciones llevadas a cabo para caracterizar los extraíbles de la madera de eucalipto han puesto de manifiesto que los triglicéridos constituyen una fracción pequeña en los extraíbles de la madera de *Eucalyptus globulus*, en los que se han detectado principalmente compuestos de tipo esteroles y ésteres de esteroides responsables de los depósitos de “pitch” de la pasta kraft (del Río et al., 1998. Characterization of organic deposits produced in the Kraft pulping of *Eucalyptus globulus* wood. J.Chromatogr., 823: 457-465; Gutiérrez et al., 1999. Chemical composition of lipophilic extractives from *Eucalyptus globulus* Labill. wood. Holzforschung, 53: 481-486). Estos compuestos permanecen en la pasta TCF (totalmente libre de cloro) después de la cocción y el blanqueo (del Río et al., 2000. Analysis of pitch deposits produced in Kraft pulp mills using a totally chlorine free bleaching sequence. J. Chromatogr. A, 874: 235-245). Otras especies de frondosas, como el *Populus tremuloides* muy utilizado para la fabricación de pasta de papel en América del Norte, también contienen cantidades significativas de esteroides libres y esterificados que dan lugar a problemas de “pitch” (Serreqi et al., 2000. Identification and quantification of important sterol esters in aspen wood. J. Am. Oil Chem. Soc., 77: 413-418). Por otra parte, estos compuestos también forman parte de los extraíbles de la madera de coníferas con contenidos importantes en algunas de ellas, como es el caso de la madera de *Picea abies* (Claassen et al., 2000; Serreqi et al., 2000; Serreqi et al., 2000. Identification and quantification of important sterol esters in aspen wood. J. Am. Oil Chem. Soc., 77: 413-418) Los ésteres de esteroides son problemáticos por su resistencia a la hidrólisis química durante la cocción kraft (comparados con los triglicéridos que son eliminados en forma de sales de ácidos grasos), pero también dan lugar a problemas de “pitch” durante la fabricación de pastas mecánicas a partir de maderas con alto contenido en estos compuestos. Recientemente se ha descrito que existen hongos capaces de degradar selectivamente (para evitar pérdidas en el rendimiento de la fabricación de pasta), los compuestos problemáticos en la fracción extraíble de la madera de *Eucalyptus globulus* (Gutiérrez et al., 1999. Fungal degradation of lipophilic extractives in *Eucalyptus globulus* wood. Appl. Environ. Microbiol., 65: 1367-1371; Martínez et al., 1999. Fungal screening for biological removal of extractives from *Eucalyptus globulus* Labill. wood. Can. J. Bot., 77: 1513-1522) y de *Pinus sylvestris* (Martínez-Iñigo et al., 1999. Biodegradability of extractives in sapwood and heartwood from Scots pine by sapstain and white-rot fungi. Holzforschung, 53: 247-252). Este hecho ha desencadenado la búsqueda de nuevas enzimas que puedan utilizarse para reducir los problemas que causan estos compuestos.  
40

En la actualidad existen dos patentes que mencionan la posibilidad de utilizar enzimas de tipo esteroles para eliminar ésteres de esteroides durante la fabricación de pasta de papel. En la primera, WO9423052, se purifica una enzima de *Pseudomonas fragi* y se sugiere la posibilidad de utilizarla en la hidrólisis de compuestos lipofílicos presentes en pasta de papel, aunque no se describen las condiciones en que las pastas deberían tratarse, ni los resultados tras tratar la pasta con estas enzimas. En la segunda, WO0053843, se comprueba la efectividad de algunos crudos enzimáticos de hongos y bacterias en la degradación de ésteres de esteroides en el tratamiento de un líquido de proceso de pasta termomecánica de madera de *Picea abies* y se indica la posibilidad de utilizar estos crudos en combinación con la lipasa comercial Resinasa A (que como se mencionó anteriormente, se limita a hidrolizar glicéridos) en los procesos de fabricación de pasta de papel. En esta patente se menciona la posibilidad de que los crudos enzimáticos de hongos y bacterias puedan tener además de actividad esteroles esterasa, actividad lipasa, hemicelulasa, pectinasa y ligninasa, aunque no se realiza ningún ensayo para comprobar si existen estas actividades.  
55

### Breve descripción de la invención

El objeto de la presente invención es una esterasa fúngica que combina propiedades catalíticas de lipasas (EC 3.1.1.3 de. Enzyme Nomenclature, Academic Press 1992 ISBN:0-12-227165-3) que hidroliza ésteres de esteroides tales como ésteres de sitosterol, colesterol stigmastanol, fucosterol, cicloartenol, 24-metilencicloartenol y citrostadienol con ácidos grasos, en particular oleico y linoleico, así como glicéridos de ácidos grasos, en particular oleico y linoleico. Preferentemente, la esterasa aplicada es producida por  
60

hongos ascomicetos productores del llamado “azulado” de la madera, específicamente por hongos del género *Ophiostoma* y más en particular por la especie *Ophiostoma piceae*. Una de las posibles esterases tiene la secuencia N-terminal que se incluye en la presente descripción (SEC. ID. N°: 1), es una glicoproteína con un 8% de carbohidratos unidos por enlaces N-glicosídicos y tiene una masa molecular estimada por electroforesis en condiciones desnaturalizantes de 56,5 kDa. En la Colección Española de Cultivos Tipo se encuentra depositada una capa de dicha esterasa (CECT 20416). Constituye igualmente un objeto de la presente invención la esterasa recombinante codificada por el gen de la esterasa de *Ophiostoma piceae* CECT 20416.

La esterasa puede ser obtenida a partir de cultivos líquidos del hongo de *Ophiostoma piceae* que pueden incluir un compuesto lipídico como inductor, y posteriormente puede ser purificada mediante cromatografía de interacción hidrofóbica.

La esterasa recombinante codificada por el gen de la esterasa de *Ophiostoma piceae*, se obtiene por un procedimiento 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* (SEC. ID. N°: 1) y secuencias internas de dicha proteína y DNA o cDNA del mismo hongo como molde; 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.

La esterasa objeto de la presente invención se aplica al control enzimático de los depósitos de brea (pitch) formados durante los procesos de fabricación de pasta de papel en los que la madera utilizada como materia prima es madera de frondosas (angiospermas leñosas), en particular de especies de eucalipto, chopo, álamo o abedul y más en particular de *Eucalyptus globulus*, *Eucalyptus camaldulensis*, *Eucalyptus grandis*, *Populus tremula*, *Populus tremuloides*, *Betula pendula* o *Betula tremula*.

Asimismo puede aplicarse el procedimiento de la invención cuando la madera utilizada es madera de coníferas (gimnospermas leñosas), en particular de especies de pino o picea y más en particular de *Pinus sylvestris*, *Pinus taeda*, *Pinus contorta*, *Pinus virginiana*, o *Picea abies*.

El procedimiento es aplicable cuando la pasta de papel se fabrica mediante los diversos procedimientos de pulpeo de la madera: mecánicos, químicos (específicamente los denominados cocción kraft o cocción al sulfito), o combinaciones de los mismos. Es asimismo válido para los diversos métodos de blanqueado: ECF (libres de cloro elemental), TCF (totalmente libres de cloro).

Las esterases se aplican 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. La concentración de las esterases utilizadas está comprendida entre 0,05 - 50 U/g de pasta, preferentemente entre 0,1 - 5 U/g de pasta, más preferentemente entre 0,1 - 1 U/g de pasta consiguiéndose una hidrólisis de hasta el 95% de los ésteres de esteroides presentes y de hasta un 70% de los triglicéridos presentes.

Cuando el procedimiento se aplica a los líquidos de proceso procedentes de la cocción, el lavado de la pasta o el blanqueo de la misma se hace igualmente 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. La concentración de las esterases utilizadas está comprendida entre 0,050 - 50 U/l de líquido 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 consiguiéndose una hidrólisis de hasta el 95% de los ésteres de esteroides presentes y de hasta un 70% de los triglicéridos presentes.

### Descripción de las figuras

Fig. 1. Producción de esterasa de *Ophiostoma piceae*. Evolución de proteínas, sustancia reductoras (S.R.) y actividad enzimática utilizando como sustratos p-nitrofenil butirato (pNPB), p-nitrofenil palmitato (pNPP) y colesteril oleato (COL).

Fig. 2. Purificación de la actividad esterasa de *Ophiostoma piceae*. Perfil cromatográfico del crudo enzimático de *Ophiostoma piceae*, obtenido por ultrafiltración, en la columna de interacción hidrofóbica “Hip-Trap Octyl Sepharose” (TM Pharmacia).

Fig. 3. Hidrólisis enzimática de extraíbles lipofílicos de madera de eucalipto. A) Cromatografía de gases

de la fracción soluble en cloroformo de los extraíbles de *Eucalyptus globulus* tratada durante 3 h con esterasa de *Ophiostoma piceae* hervida (control). B) Análisis de esta fracción tras 3 h de incubación con la enzima nativa.

5 Fig. 4. *Hidrólisis enzimática de extraíbles lipofílicos de madera de pino*. A) Cromatografía de gases de la fracción soluble en cloroformo de los extraíbles de *Pinus sylvestris* tratada durante 3 h con esterasa de *Ophiostoma piceae* hervida (control). B) Análisis de esta fracción tras 3 h de incubación con la enzima nativa.

10 Fig. 5. *Hidrólisis enzimática de los compuestos lipofílicos presentes en pasta termomecánica de madera de Picea abies* A) Cromatografía de gases de la fracción soluble en cloroformo de los extraíbles de la pasta de *Picea abies* tratada durante 3 h con esterasa de *Ophiostoma piceae* hervida (control). B) Análisis de esta fracción tras 3 h de incubación con la enzima nativa.

15 **Descripción detallada de la invención**

Los estudios para el desarrollo de la presente invención se iniciaron con la búsqueda de hongos que produjeran enzimas lipolíticas involucradas en la degradación de compuestos responsable de la formación de depósitos de “pitch” (brea) en pastas de papel, especialmente de frondosas donde hasta el momento no se había descrito ninguna enzima efectiva.

Los trabajos comenzaron con un “screening” de hongos productores de lipasas/esterasas. Los hongos estudiados (Tabla I), un total de 28 especies pertenecientes a las divisiones Ascomycota y Basidiomycota y al grupo de los denominados hongos imperfectos o deuteromicetos, procedían de las colecciones de cultivos del Centro de Investigaciones Biológicas del CSIC (IJFM) en Madrid y del Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS) en Baam (Países bajos). A estos hongos se añadieron 2 cepas del ascomiceto *Ophiostoma piliferum* comercializadas por Clariant como Cartapip<sup>®</sup> 58 y 57 La capacidad de estos hongos para producir enzimas lipolíticas fue investigada tal como se describe en el apartado siguiente.

30 TABLA I

*Relación de cepas fúngicas empleadas. CBS = Centraalbureau voor Schimmelcultures; IJFM=Instituto Jaime Ferrán de Microbiología (Colección del CIB); MSD=Merck Sharp & Dhome*

	Familia	Colección IJFM	Origen
<i>Basidiomicetos</i>			
40	<i>Bjerkandera adusta</i>	Coriolaceae	A581 CBS 595.78
	<i>Coniophora puteana</i>	Coniophoraceae	A676 carpóforo (ENCE -Pontevedra)
	<i>Crepidotus variabilis</i>	Crepidotaceae	A675 carpóforo (Viascón-Pontevedra)
	<i>Dichomitus squalens</i>	Polyporaceae	A631 MSD3-92
45	<i>Funalia trogii</i>	Coriolaceae	A615 Dra. Alconada
	<i>Ganoderma australe</i>	Ganodermataceae	A130 carpóforo (Chiloe -Chile)
	<i>Melanotus hepatochrous</i>	Strophariaceae	A673 carpóforo (ENCE-Pontevedra)
	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Meruliaceae	A547 CBS 481.73
	<i>Phlebia chrysocrea</i>	Meruliaceae	A469 carpóforo (Futroneo -Chile)
50	<i>Phlebia radiata</i>	Meruliaceae	A588 CBS 184.83
	<i>Pleurotus eryngii</i>	Lentinaceae	A169 CBS 613.91
	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Lentinaceae	A579 CBS 411.71
	<i>Pleurotus pulmonarius</i>	Lentinaceae	A578 CBS 507.85
55	<i>Phellinus torulosus</i>	Hymenochaetaceae	A630 MSD3-152
	<i>Schizophyllum commune</i>	Schizophyllaceae	A360 carpóforo (Quemchi-Chile)
	<i>Trametes versicolor</i>	Coriolaceae	A136 carpóforo (Exeter -Inglaterra)

TABLA I (Continuación)

	Familia	Colección IJFM	Origen
5	<i>Ascomycetos</i>		
	<i>Nectria coccinea</i>	Hypocreaceae	A669 carpóforo (ENCE -Pontevedra)
10	<i>Ophiostoma microsporum</i>	<i>Ophiostomataceae</i>	A645 CBS 412.77
	<i>Ophiostoma megalobrunneum</i>	<i>Ophiostomataceae</i>	A644 CBS 560.83
	<i>Ophiostoma piceae</i>	<i>Ophiostomataceae</i>	A237 Dr. Butin (Alemania)
	<i>Ophiostoma piliferum</i>	<i>Ophiostomataceae</i>	A638 Cartapip 58/S
	<i>Ophiostoma piliferum</i>	<i>Ophiostomataceae</i>	A639 Cartapip 97
15	<i>Ophiostoma valdivianum</i>	<i>Ophiostomataceae</i>	A641 CBS 454.83
	<i>Deuteromicetos</i>		
	<i>Alternaria</i> sp.	Pleosporaceae*	A672 astillas eucalipto (ENCE-Pontevedra)
20	<i>Fusarium oxysporum</i>	Hypocreaceae*	A685 Dr. Tello
	<i>Geotrichum candidum</i>	Dipodascaceae*	A640 CBS 820.71
	<i>Kirramyces eucalypti</i>	-	A671 Carpóforo (ENCE-Pontevedra)
25	<i>Periconia igniaria</i>	-	A668 astillas eucalipto (ENCE-Pontevedra)

\* teleomorfo en la familia citada.

#### Búsqueda de hongos con actividad esterasa

30 En una primera etapa se seleccionaron hongos productores de esterasa en un ensayo en placas de Petri con agar-Tween 80 y calcio, basándonos en un método descrito por Nuero *et al.* (Nuero *et al.*, 1994. Detection of lipase activity on ultrathin layers isoelectric focusing gels. Anal. Biochem., 222: 503-505). Los hongos que hidrolizan el Tween 80 (oleato de polioxietilen sorbitano), crecen y, en presencia de Ca<sup>2+</sup>, forman oleato cálcico que precipita formando un halo alrededor de la colonia. Los hongos 35 productores de halos en placas de agar-Tween 80 (Tabla II), se cultivaron en medio líquido con glucosa y tartrato amónico (Guillén *et al.*, 1992. Substrate specificity and properties of the aryl-alcohol oxidase from the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. Eur. J. Biochem., 209: 603-611), suplementado con 0,5 % de peptona y añadiendo al cuarto día de incubación 0,5 % de aceite de oliva, con el fin de inducir las 40 actividades enzimáticas objeto de este estudio. En este caso la actividad esterasa se determinó utilizando p-nitrofenil butirato (pNPB) (Plou *et al.*, 1998. Analysis of tween 80 as an esterase/lipase substrate for lipolytic activity assay. Biotechnol. Tech., 12: 183-186) y p-nitrofenil palmitato (pNPP) (Hoshino *et al.*, 1992. Purification and some characteristics of extracellular lipase from *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini*. Biosci. Biotechnol. Biochem., 660-664). Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad 45 de enzima capaz de liberar 1 mol de p-nitrofenol en un minuto.

50 Entre todos los hongos estudiados solo los del género *Ophiostoma* (*Ophiostoma piceae*, *Ophiostoma piliferum* y *Ophiostoma valdivianum*) y *Fusarium* (*Fusarium oxysporum*) produjeron una enzima capaz de hidrolizar pNPB y pNPP en medio líquido.

60 Para detectar si estos hongos tenían enzimas capaces de hidrolizar los ésteres de esteroides implicados en la formación de depósitos de "pitch", se buscó actividad esteroles-esterasa en los cultivos utilizando colesteril oleato. Esta actividad enzimática se determinó utilizando 1 mM colesteril oleato en Tris-HCl 25 mM, pH 7, estabilizado con 0,2 % de deoxicolato sódico y 1 % de goma arábiga (en las mismas condiciones 55 que el pNPP). La reacción se llevó a cabo a 37°C y se paro hirviendo 5 min. El colesterol libre formado en la reacción se determinó a, 405 nm por el método enzimático comercializado por Boehringer. Este ensayo puso de manifiesto que de los 4 hongos citados anteriormente sólo *Ophiostoma piceae* presentaba actividad apreciable sobre ésteres de esteroides. La Fig. 1 muestra la evolución de las actividades enzimáticas, así como de las proteínas y sustancias reductoras, en los cultivos de *Ophiostoma piceae*.

TABLA II

*Detección de actividad lipasa en placas de agar-Tween 80: formación de un halo alrededor de la colonia*

	Halo
5	
	<i>Basidiomicetos</i>
	<i>Bjerkandera adusta</i> +
10	<i>Coniophora puteana</i> -
	<i>Crepidotus variabilis</i> -
	<i>Dichomitus squalens</i> -
	<i>Ganoderma australe</i> +
	<i>Melanotus hepatochrous</i> -
15	<i>Phanerochaete chrysosporium</i> -
	<i>Phlebia chrysocrea</i> -
	<i>Phlebia radiata</i> -
	<i>Pleurotus eryngii</i> +
20	<i>Pleurotus ostreatus</i> +
	<i>Pleurotus pulmonarius</i> -
	<i>Phellinus torulosus</i> -
	<i>Schizophyllum commune</i> -
25	<i>Trametes versicolor</i> +
	<i>Ascomicetos</i>
	<i>Nectria coccinea</i> +
	<i>Ophiostoma microsporum</i> -
30	<i>Ophiostoma melanobrunneum</i> -
	<i>Ophiostoma piceae</i> +
	<i>Ophiostoma piliferum</i> +
	<i>Ophiostoma piliferum</i> +
35	<i>Ophiostoma valdivianum</i> +
	<i>Deuteromicetos</i>
	<i>Alternaria</i> sp. +
	<i>Fusarium oxysporum</i> +
40	<i>Geotrichum candidum</i> +
	<i>Kirramyces eucalypti</i> -
	<i>Periconia igniaria</i> +

45 *Producción y purificación de la esterasa de Ophiostoma piceae*

Entre todos los hongos estudiados, *Ophiostoma piceae* fue seleccionado para llevar a cabo este estudio por: i) los altos niveles de actividad esterasa producida en medio líquido detectada utilizando como sustratos pNPP y pNPB; y ii) su actividad sobre colesteril oleato, un sustrato utilizado para detectar la actividad esterol-esterasa, que podría estar implicada en la degradación de los ésteres de esteroides presentes en los extraíbles de eucalipto y otras maderas y en los depósitos que se encuentran en las pastas. Este hongo se encuentra en la colección del Centro de Investigaciones Biológicas, en la colección "Instituto Jaime Ferrán de Microbiología" (IJFM) identificado con el n° A237 y en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) identificado con el n° 20416 (fecha de depósito 1-03-2001).

55 La producción de la enzima se estudio en presencia de 0, 0,25, 0,5, 1 y 2 % de aceite de oliva (añadido a los 4 días de incubación). Los niveles de actividad fueron mayores en presencia de 0,5 % de aceite de oliva, no incrementándose a concentraciones mayores. El crudo enzimático para purificar la esterasa se obtuvo en el medio con 0,5 % de aceite de oliva a los 12 días de incubación. El micelio se separó por centrifugación y, el líquido de cultivo se concentró por ultrafiltración, utilizando una membrana de 5000 Da (Filtrón). La actividad durante el proceso de purificación se analizó utilizando pNPB como sustrato.

60 El líquido ultrafiltrado se equilibró con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  2 M y se aplicó a un cartucho de interacción

## ES 2 179 768 B1

hidrofóbica (Hip-Trap Octyl Sepharose, de Pharmacia), equilibrada con la misma concentración de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  en Tris-HCl 25 mM, pH 7. Las proteínas retenidas se eluyeron con un gradiente lineal decreciente de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (2-0 M) en 30 min, a un flujo de 1 ml/min. Las proteínas mas hidrófobas, que todavía quedaban retenidas, se eluyeron con 0,1% de Tritón X-100 en el mismo tampón. En estas condiciones se obtuvo un único pico con actividad esterasa, que eluía con el Tritón (Fig. 2).

La Tabla III resume el proceso utilizado para purificar la esterasa de *Ophiostoma piceae*. Se obtuvo la enzima pura. con un rendimiento del 69%, después de la ultrafiltración y un solo paso cromatográfico.

TABLA III

*Proceso de purificación de la esterasa de Ophiostoma piceae*. La actividad enzimática durante el proceso de purificación se determinó utilizando como sustrato pNPB

	Actividad U	Proteínas mg	Rendimiento %	Actividad específica U/mg	Grado de purificación
Líquido	5000	97,5	100	51,3	1,0
Ultrafiltrado	4150	52,8	83	78,6	1,5
Octyl-Sepharose	3450	28,5	69	121,1	2,4

*Características físico-químicas de la esterasa de Ophiostoma piceae*

El peso molecular de esta proteína fue estimado por SDS/PAGE en 56,5 kDa y el pI en 3,3. La enzima es una glicoproteína. con un 8% de carbohidratos unidos por el enlaces N-glicosídicos. La secuencia N-terminal de la esterasa de *Ophiostoma piceae* es: TTVNVKYPEGEVVG. La Tabla IV muestra la comparación de las propiedades de esta enzima con otras lipasas purificadas de *Ophiostoma piceae* y *Ophiostoma piliferum*. Como podemos ver, la enzima purificada en este trabajo presenta el peso molecular y la secuencia N-terminal semejante a dos isoenzimas descritas como lipasas de *Ophiostoma piliferum* (Brush et al., 1999. Purification and characterization of extracellular lipases from *Ophiostoma piliferum*. Bioorgan. Med. Chem., 7: 2131-2138) y es muy diferente de una lipasa caracterizada de *Ophiostoma piceae* (Gao et al., 1998. Properties and substrate specificities of an extracellular lipase purified from *Ophiostoma piceae*. World J. Microbiol. Biotechnol., 14: 421-429).

El efecto del pH en la velocidad inicial de la hidrólisis de pNPB, en tampón acetato y fosfato 50 mM, reveló que la esterasa de *Ophiostoma piceae* caracterizada en este trabajo, presentaba su mayor actividad entre pH 6 y pH 8 a temperatura ambiente, mantenía un 80% de actividad a los tres días de incubación entre pH 4 y pH 6,5 y era estable a pH 6 durante 12 horas entre 4 y 30°C.

TABLA IV

*Propiedades de distintas esterases/lipasas caracterizadas en hongos del género Ophiostoma*

	Pm Da	pI	Carbohidrato (%)	Secuencia N-terminal
Esterasa <i>O. piceae</i>	56.5	3.3	8	TTVNVKYPEGEVVG
Lipasa <i>O. piceae</i>	35	4.1	10	TTDIDALAFFTAW <sup>1</sup>
Lipasa <i>O. piliferum I</i>	60	3.8	8	TTVDVDYPEGKVTG <sup>2</sup>
Lipasa <i>O. piliferum II</i>	52	3.6	0	TTVDVDYPEG <sup>2</sup>

<sup>1</sup> (Gao et al., 1998. Properties and substrate specificities of an extracellular lipase purified from *Ophiostoma piceae*. World J. Microbiol. Biotechnol., 14: 421-429).

<sup>2</sup> (Gao et al., 1998. Properties and substrate specificities of an extracellular lipase purified from *Ophiostoma piceae*. World J. Microbiol., Biotechnol., 14: 421-429).



*Especificidad de sustrato*

Generalmente, para la determinación de la actividad esterasa o lipasa es necesario emulsionar los distintos ésteres mediante el empleo de agentes tensioactivos. Por esta razón las constantes cinéticas aparentes, constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) y la velocidad máxima ( $V_{max}$ ), se han estudiado en el presente trabajo utilizando distintos sustratos y las mismas condiciones de reacción. Estas incluyen 1% polioxoetilen-10-tridecil eter en el caso de las reacciones con ésteres de p-nitrofenol, y 10% de polioxoetilen-10-tridecil eter y NaCl 0,15 M en el caso de la trioleína, tributirina y ésteres de colesterol. De esta forma el tamaño de las micelas es siempre el mismo y se puede comparar la afinidad de la enzima frente a los diferentes sustratos. Las constantes cinéticas de esta esterasa frente a pNPB y pNPP se estimaron valorando el p-nitrofenol liberado (método descrito anteriormente) y frente a los diferentes ésteres de colesterol y la tributirina y trioleína se estimaron en un pH-estado, valorando los ácidos grasos liberados con NaOH 50 mM a 25°C. En este caso una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima que libera 1 mol de ácido graso por minuto a 25°C.

La representación de la velocidad de reacción frente a la concentración de sustrato dio en todos los casos curvas de saturación del tipo Michaelis-Menten. Las constantes eméticas de la esterasa de *Ophiostoma piceae* se muestran en la Tabla V. En esta tabla podemos ver que la esterasa tiene una afinidad comparable por el pNPB y el pNPP, aunque la velocidad máxima aparente fue mayor con el sustrato de cadena mas larga. Otras lipasas/esterasas presentan mayor afinidad por sustratos de cadena mas corta (Druet et al., 1992. Purification and characterization of the extracellular and cell-bound lipases from a *Penicillium cyclopium* variety. Appl. Microbiol. Biotechnol., 37: 745-749; Plou et al., 1997. Kinetic and enantioselective behaviour of isoenzymes A and B from *Candida rugosa* lipase in the hydrolysis of lipids and esters. Biocatal. Biotransform., 15: 75-89). En este sentido, recientemente se ha descrito mayor hidrólisis de ésteres de p-nitrofenol con ácidos grasos de cadena corta por una lipasa de *Ophiostoma piliferum*, aunque este estudio se realizó utilizando en todos los casos la misma concentración de sustrato (2,5 mM éster de p-nitrofenol, 2% tritón in 50 mM PIPES, pH 6,9) (Brush et al., 1999. Purification and characterization of extracellular lipases from *Ophiostoma piliferum*. Bioorgan. Med. Chem., 7: 2131-2138). Sin embargo, la influencia positiva de ácidos grasos de cadena más larga también se ha descrito en una lipasa de *Ophiostoma piceae* (Gao et al., 1998. Properties and substrate specificities of an extracellular lipase purified from *Ophiostoma piceae*. World J. Microbiol. Biotechnol., 14: 421-429), aunque en este estudio no se determinó la afinidad de la enzima, sino sólo la velocidad de hidrólisis de distintos ésteres de esteroides a la misma concentración de sustrato (0.75 mM de éster de esteroles, 5% dimetilsulfóxido, 0,4% tritón X-100, 0,2% goma arábiga y tampón acetato 50 mM, pH 5,4). Como se ha comentado antes, esta lipasa de *Ophiostoma piceae* tiene distinto peso molecular, pI y N-terminal que la enzima caracterizada en este trabajo.

En el caso de los triglicéridos y los ésteres de colesterol, la presencia de ácidos grasos de cadena larga también incrementa la afinidad por el sustrato y la velocidad de la reacción. Cabe destacar que la especificidad de esta esterasa de *Ophiostoma piceae* por la trioleína es 3370 veces mayor que por la tributirina, indicando la preferencia de la enzima por sustratos muy hidrofóbicos. Aunque la posibilidad de hidrolizar ésteres de esteroides ya se había detectado en las lipasas de *Ophiostoma piceae* (Gao et al., 1998. Properties and substrate specificities of an extracellular lipase purified from *Ophiostoma piceae*. World J. Microbiol. Biotechnol., 14: 421-429) y *Ophiostoma piliferum* (Brush et al., 1999. Purification and characterization of extracellular lipases from *Ophiostoma piliferum*. Bioorgan. Med. Chem., 7: 2131-2138), es la primera vez que se hace un estudio de especificidad sobre estos sustratos. Además la nueva esterasa de *Ophiostoma piceae* hidroliza mas rápidamente los ésteres de colesterol que las otras lipasas.

TABLA V

Constantes cinéticas de la esterasa de *Ophiostoma piceae*: Constantes cinéticas aparentes de esta enzima frente a p-nitrofenol ésteres, triglicéridos y colesterol ésteres

		$^{app}K_m$	$^{app}K_{cat}$	$K_{cat}/K_m$	
		mM	sg <sup>-1</sup>	sg <sup>-1</sup> mM <sup>-1</sup>	
5					
10	pNPB	C4:0	0,33	45	137
	pNPP	C16:1	0,33	69	210
	Tributirina	C4:0	5,87	42	7
	Trioleina	C18:1	0,01	174	23818
15	Colesteril butirato	C4:0	1,54	12	7
	Colesteril palmitato	C16:0	0,13	14	101
	Colesteril estearato	C18:0	0,05	7	156
	Colesteril oleato	C18:1	0,09	53	616
20	Colesteril linoleato	C18:2	0,08	91	1092

Según los resultados obtenidos en el estudio de especificidad, y a pesar de que esta esterasa de *Ophiostoma piceae* tiene una afinidad por la trioleina y tributirina similar a otras lipasas comerciales (EC 3.1.1.3), esta enzima también muestra afinidad sobre los ésteres de esteroides, no detectada en las lipasas, por lo pensamos que debe incluirse en el grupo de las esterasas de esteroides (EC 3.1.1.13). Por último comentar que la mayor eficacia de esta esterasa sobre los ésteres de esteroides es sobre los formados con el ácido oleico y linoleico, que representan la fracción mayoritaria de los ésteres de esteroides en la fracción extraíble de madera de eucalipto (20 y 62 % respectivamente) (Gutiérrez et al., 1999. Chemical composition of lipophilic extractives from *Eucalyptus globulus* Labill. wood. *Holzforschung*, 53: 481-486). Esta propiedad resulta de gran interés, tal como se puede observar en los ejemplos 1 y 2 por su posible aplicación en sector papelerero, en el que los depósitos de estos compuestos producen grandes pérdidas económicas.

### Modo de realización de la invención

#### 35 Ejemplo 1

##### *Tratamiento enzimático de líquidos de proceso: Fabricación de pasta de eucalipto*

Para comprobar la efectividad de la esterasa de *Ophiostoma piceae* en el tratamiento de los líquidos de proceso durante la fabricación de pasta de eucalipto se estudió la transformación de una suspensión acuosa de la fracción lipofílica de los extraíbles de la madera de *Eucalyptus globulus* (líquido de proceso sintético). Esta fracción rica en ésteres de esteroides involucrados en la formación de depósitos de "pitch" (del Río et al., 1998. Characterization of organic deposits produced in the Kraft pulping of *Eucalyptus globulus* wood. *J. Chromatogr.*, 823: 457-465; Gutiérrez et al., 1998. Analysis of lipophilic extractives from wood and pitch deposits by solid-phase extraction and gas chromatography. *J. Chromatogr.*, 823: 449-455) se obtuvo tras extraer la madera de *Eucalyptus globulus* en Soxhlet con acetona durante 6 h, y secar el extracto en estufa de aireación a 60°C. La fracción soluble en cloroformo de estos extraíbles de eucalipto (500 µg), donde se encuentran los compuestos lipofílicos responsables de los depósitos de "pitch", se suspendió en tampón Tris-ClH 25 mM, pH 7, conteniendo 0.186% desoxicolato sódico y 0.09% goma arábiga, y se incubó durante 3 horas a temperatura ambiente con 185 mU de la esterasa de *Ophiostoma piceae*. Simultáneamente se realizaron controles con enzima hervida. Tras el tratamiento enzimático los compuestos lipofílicos se extrajeron con cloroformo y analizaron en un cromatógrafo Hewlett Packard HP 5890 equipado con un detector de llama y una columna capilar de sílice de 5 m x 0,25 mm y 0,1 µm de espesor de película (DH5-HT de J & W Scientific), utilizando helio como gas portador. La temperatura del inyector y del detector fue 300°C y 350°C respectivamente. El horno se programó de 100°C (1 min) a 350°C (3 min) a 15°C /min. Los esteroides libres y esterificados se cuantificaron utilizando una curva de calibración realizada con mezclas de sitosterol y colesteril oleato (los coeficientes de correlación fueron mayores del 99 %).

60 Los análisis de las muestras por cromatografía de gases ponen de manifiesto que la esterasa de *Ophiostoma piceae* hidroliza los ésteres de esteroides presentes en los líquidos de proceso de la producción de pasta de eucalipto procedentes de la fracción lipofílica de los extraíbles de la madera (Fig 3). Estos compuestos

están involucrados en los depósitos de “pitch” durante el pulpeo de estas maderas. La cuantificación de la eficacia de estos tratamientos mostró una disminución del contenido en ésteres de esteroles del 71 %.

### Ejemplo 2

5

*Tratamiento enzimático de líquidos de proceso: Fabricación de pasta de pino*

Con el fin de comprobar la eficacia de la esterasa de *Ophiostoma piceae* en el tratamiento de los líquidos de proceso durante la fabricación de pasta de pino se trató una suspensión acuosa de la fracción lipofílica de los extraíbles de *Pinus sylvestris* (líquido de proceso sintético) con la esterasa de *Ophiostoma piceae*. Los extraíbles de *Pinus sylvestris* (Claassen et al., 2000, Rapid analysis of apolar low molecular weight constituents in wood using high pressure liquid chromatography with evaporative light scattering detection. *Phytochem. Analysis*, 11: 251-256) fueron obtenidos según se indica en el ejemplo 1. También en este caso se trataron 500 µg de la fracción soluble en cloroformo con 185 mU de actividad esterasa durante 3 h en las condiciones descritas en el ejemplo 1.

10  
15

Los análisis por cromatografía de gases de los tratamientos de la fracción extraíble de pino con la esterasa de *Ophiostoma piceae* (Fig 4) ponen de manifiesto que la enzima hidroliza los triglicéridos presentes en los líquidos de proceso durante la fabricación de pasta mecánica de madera de pino. Estos compuestos son mayoritarios en los extraíbles del pino y causan depósitos de pitch. La cuantificación de estos tratamientos mostró una disminución de un 43 % en los triglicéridos y un 20 % en los ésteres de esteroides (a pesar de que estos últimos son una fracción minoritaria en los extractos).

20

### Ejemplo 3

25

*Tratamiento enzimático de pastas: Fabricación de pasta termomecánica de Picea abies*

La eficacia de la esterasa de *Ophiostoma piceae* en la degradación de triglicéridos y ésteres de esteroides presentes en pastas, se llevó a cabo utilizando pasta termomecánicas de *Picea abies*, cuyo contenido en triglicéridos y ésteres de esteroides representa el 30 % y 20 % respectivamente de la fracción extraíble (Sjöström, 1992). 10 g de pasta seca se trataron durante 3h con 10 U de la esterasa en un volumen de 200 ml de tampón fosfato pH 6, 10 mM y 0.05 % desoxicolato sódico. Simultáneamente se realizaron controles con enzima hervida. La pasta tratada enzimáticamente se liofilizó y se extrajo en Soxhlet con acetona durante 6 h. La fracción extraíble se secó y los compuestos solubles en cloroformo se analizaron por cromatografía de gases y se cuantificaron tal como se indica en los ejemplos 1 y 2.

30  
35

Los análisis de las muestras por cromatografía de gases (Fig 5) ponen de manifiesto que la esterasa de *Ophiostoma piceae* hidroliza tanto los triglicéridos como los ésteres de esteroides presentes en la pasta de picea. La cuantificación de estos tratamientos mostró una disminución del 87 % de triglicéridos y del 46 % de los ésteres de esteroides.

40

45

50

55

60

## REIVINDICACIONES

1. Esterasa fúngica que combina propiedades catalíticas de lipasas (EC 3.1.1.3) y esteroles estererasas (EC 3.1.1.13) **caracterizada** porque los esteres de esteroides que hidroliza son esteres de sitosterol, colesterol, stigmastanol, fucosterol, cicloartenol, 24-metilcicloartenol y citrostadienol con ácidos grasos, en particular oleico y linoleico, y los glicéridos que hidroliza son glicéridos de ácidos grasos, en particular oleico y linoleico.
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*.
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 SEC. ID. N°: 1.
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 desnaturalizantes de 56,5 kDa.
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 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 la reivindicación 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.
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* (SEC. ID. N°: 1) y secuencias internas de dicha proteína y DNA o cDNA del mismo hongo como molde; 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.
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).
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.
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*.
14. 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 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*.

## ES 2 179 768 B1

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*.

5 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.

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.

10 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.

15 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.

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).

20 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).

25 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.

30 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.

35 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 entre 3,5-6,5 por un tiempo entre 10 minutos y 24 horas, preferentemente entre 1 y 6 horas.

40 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, preferentemente entre 0,1-5 U/g de pasta, más preferentemente entre 0,1-1 U/g de pasta.

45 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 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.

50

55

60

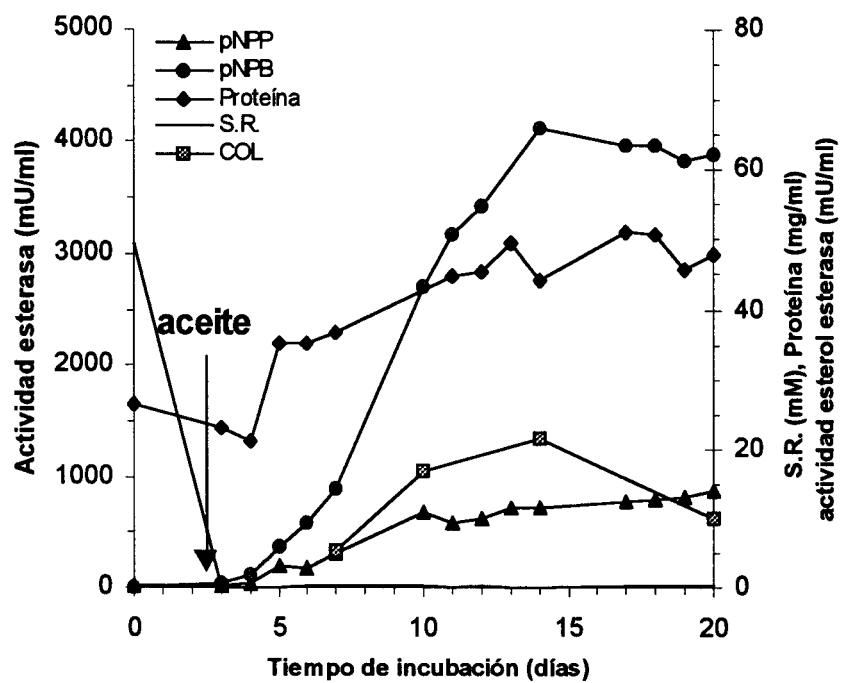


Figura 1

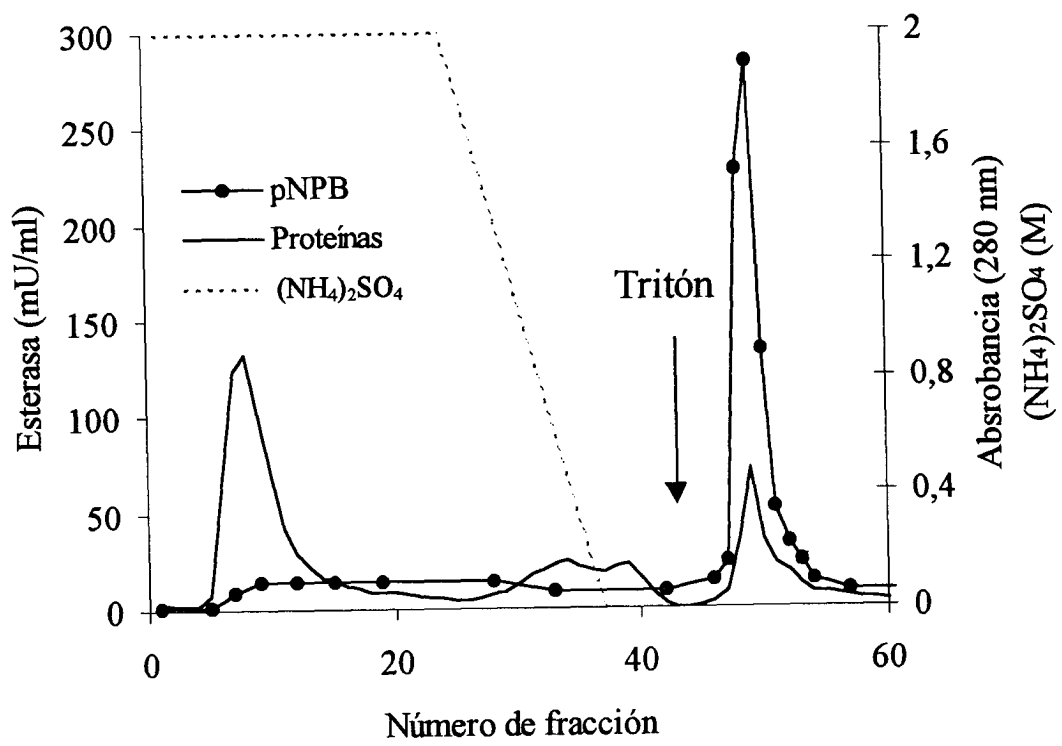


Figura 2

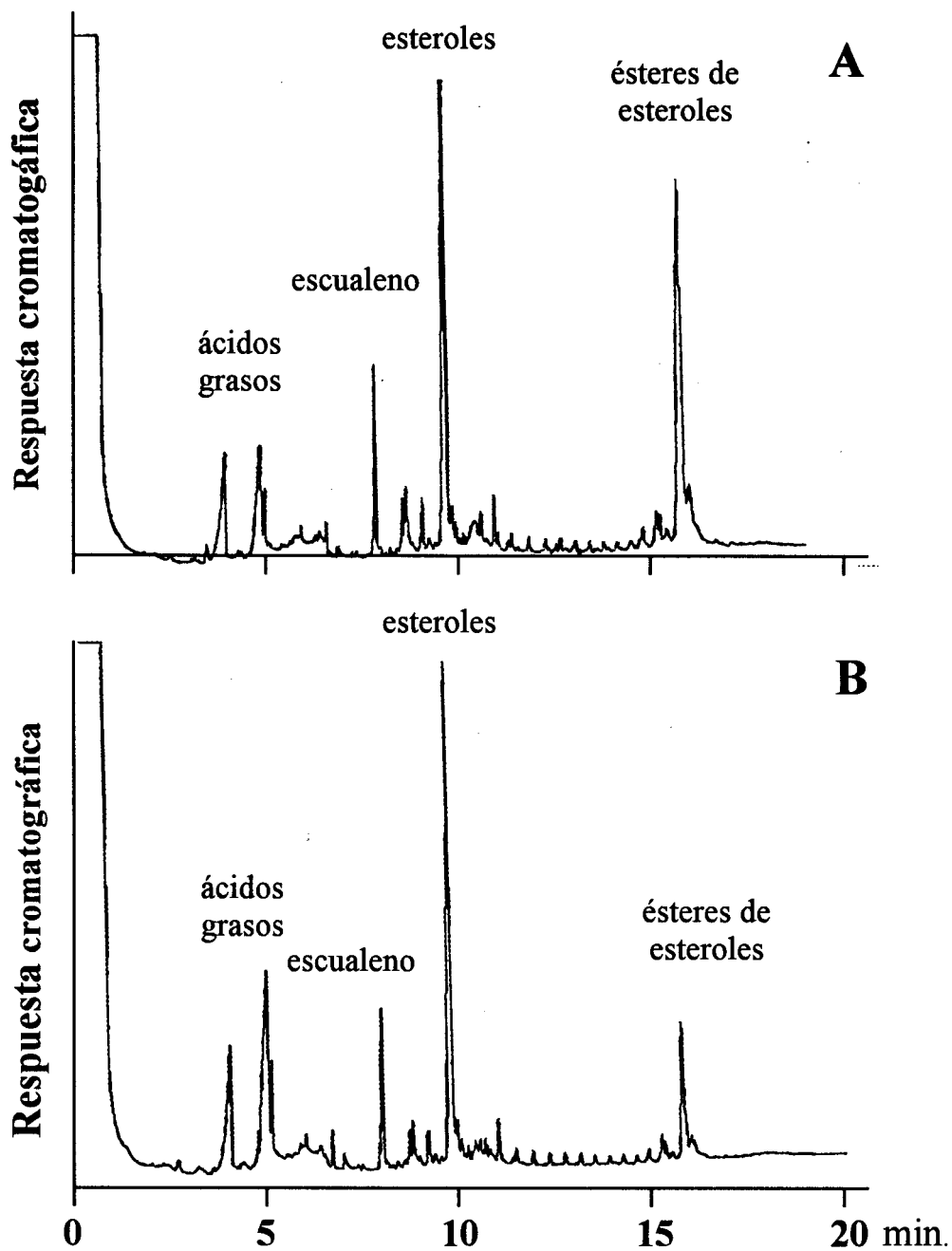


Figura 3



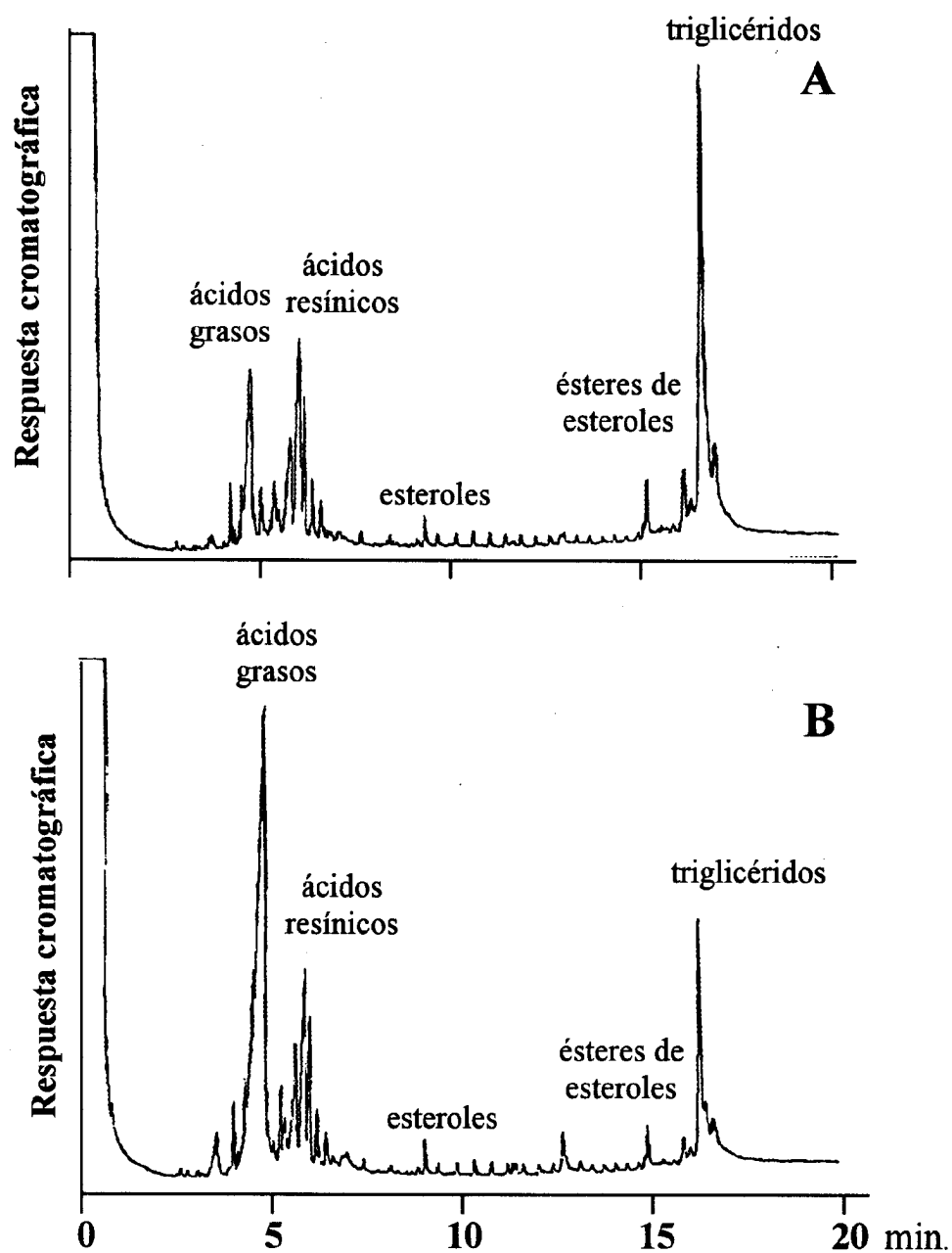


Figura 4

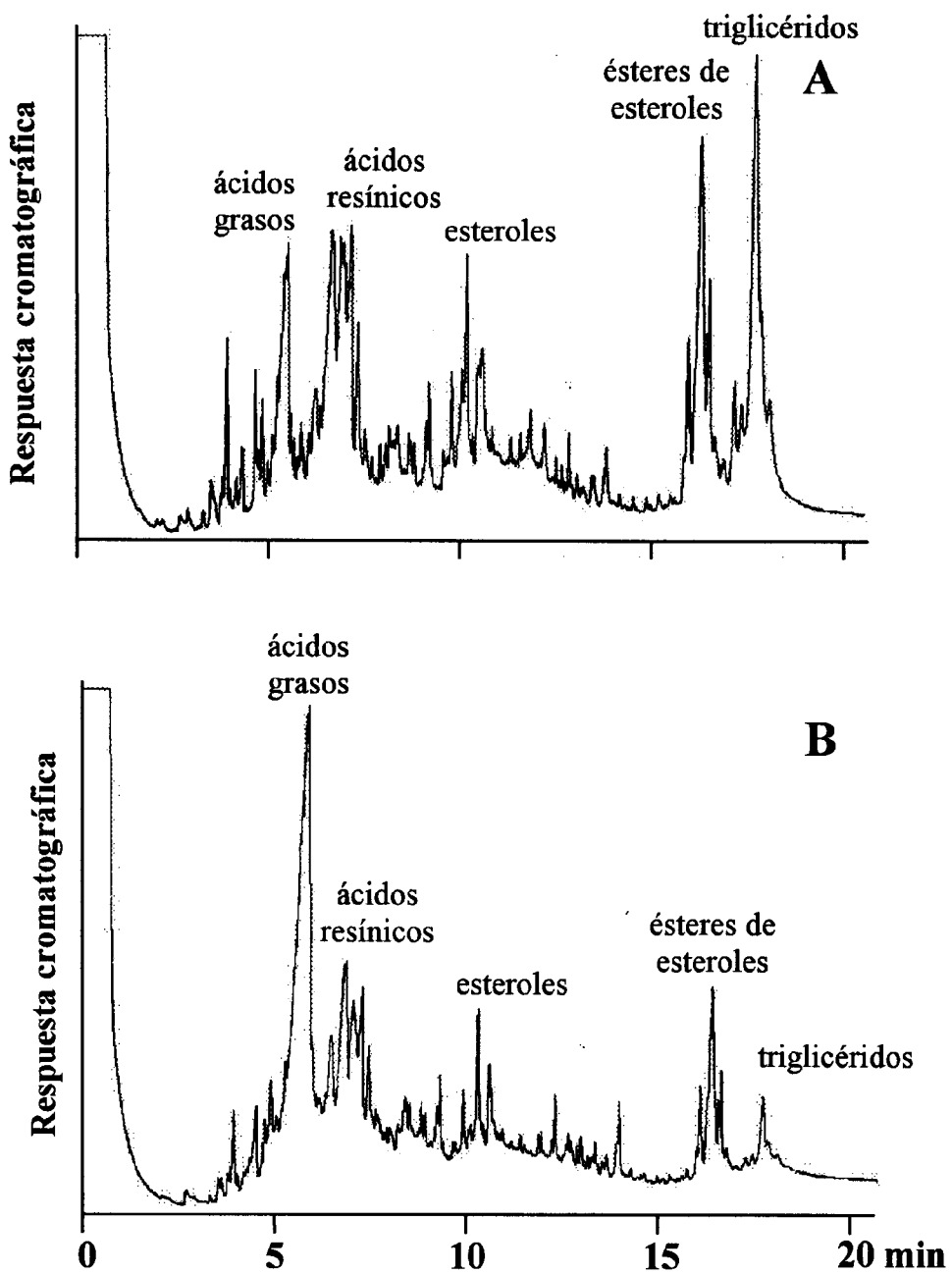


Figura 5

# ES 2 179 768 B1

## LISTAS DE SECUENCIAS

<110> Consejo Superior de Investigaciones Científicas

5 <120> Esterasa, procedimiento de obtención y su utilización para el control enzimático de los depósitos de brea (pitch) formados durante la fabricación de pasta de papel.

<130> esterasa

10 <140> 200100618

<141> 2001-03-16

<160> 1

15

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 14

20

<212> PRT

<213> Ophiostoma sp.

<400> 1

25 Thr Thr Val Asn Val Lys Tyr Pro Glu Gly Glu Val Val Gly  
1 5 10

30

35

40

45

50

55

60



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 179 768

② Nº de solicitud: 200100618

③ Fecha de presentación de la solicitud: 16.03.2001

④ Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ **Int. Cl.7:** C12N 9/18, 9/20, 9/16, D21C 9/08, 11/00 // (C12N 9/18, C12R 1:645)

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	CALERO-RUEDA, O. et al. Control biológico del pitch: Caracterización de una lipasa de <i>Ophiostoma piceae</i> . En: XVII Congreso Nacional de Microbiología. Sociedad Española de Microbiología. Granada, 17-21 de Septiembre de 1999. Editado por Grupo Editorial Universitario. Dpto. Microbiología. Universidad de Granada, 1999. ISBN: 84-95276-09-7, página 510.	1-27
A	WO 0053843 A1 (VALTION TEKNILLIEN TUTKIMUSKESKUS) 14.09.2000, todo el documento.	1-27
A	GAO, Y. & BREUIL, C. Proprieties and substrate specificities of an extracellular lipase purified from <i>Ophiostoma piceae</i> . World Journal of Microbiology and Biotechnology, 1998, Vol. 14, páginas 421-429.	1-27
A	WO 9423052 A1 (NOVO NORDISK A/S) 13.10.1994, todo el documento.	
A	WO 9310224 A1 (NOVO NORDISK A/S) 27.05.1993, todo el documento.	
A	GUTIÉRREZ et al. Fungal degradation of lipophilic extractives in <i>Eucalyptus globulus</i> wood. Applied and Environmental Microbiology, 1999, Vol. 65, páginas 1367-1371.	

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

#### El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe	Examinador	Página
16.12.2002	A. Polo Díez	1/1