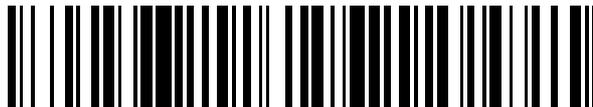


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 464 216**

51 Int. Cl.:

C11D 3/386 (2006.01)

C11D 17/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.11.2009 E 09756878 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.02.2014 EP 2350250**

54 Título: **Sistema de administración para enzima y sustrato coformulados**

30 Prioridad:

03.11.2008 US 110832 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

30.05.2014

73 Titular/es:

**DANISCO US INC. (100.0%)
925 Page Mill Road
Palo Alto, CA 94304, US**

72 Inventor/es:

**BECKER, NATHANIEL T.;
STONER, MICHAEL y
YOON, MEE-YOUNG**

74 Agente/Representante:

RIZZO, Sergio

ES 2 464 216 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Sistema de administración para enzima y sustrato coformulados

PRIORIDAD

5 **[0001]** La presente solicitud reivindica prioridad sobre la solicitud de patente provisional estadounidense nº serie 61/110.832, presentada el 3 de noviembre, 2008.

CAMPO DE LA INVENCIÓN

[0002] La invención hace referencia a formulaciones líquidas para la administración conjunta de enzimas y sustratos en los que al menos se encapsula una enzima en una matriz polimérica.

ANTECEDENTES

10 **[0003]** En sistemas de administración de enzima/sustrato, normalmente surgen dos problemas. El primer problema es que la eficacia óptima depende de mantener la ratio enzima:sustrato apropiada. El segundo problema es que la enzima debe aislarse de forma física de su sustrato hasta que se desee la reacción. Una forma de superar estos problemas es empaquetando la enzima de forma independiente del sustrato y combinándolos en el punto de utilización. Sin embargo, este enfoque es inconveniente, complicado y puede tener como resultado errores de mezcla a la hora de utilizarse. También puede ser costoso puesto que la enzima normalmente debe formularse con sustancias estabilizadoras. Otra forma de superar estos problemas es proporcionando una mezcla de enzima seca y sustrato seco, consiguiendo así el aislamiento físico mientras que se mantiene la ratio enzima-sustrato adecuada. Sin embargo, normalmente se desea o se necesita proporcionar una formulación líquida para usarla en procesos que no están configurados para manejar polvos, gránulos u otros productos sólidos. Se necesita un enfoque alternativo.

15 **[0004]** Sería recomendable un enfoque de coformulación, donde se combine sustrato y enzima en el mismo recipiente. Esto permitiría que un fabricante controlara la ratio enzima:sustrato, lo que da como resultado ahorros en el coste sobre los ingredientes de formulación y proporcionaría un producto simple, práctico y "listo para usar" para el consumidor. En algunos casos, el hecho de combinar la enzima y el sustrato en la misma formulación líquida podría mitigar las preocupaciones de toxicidad (p. ej., se podrían reducir sustancialmente riesgos medioambientales planteados por mediadores de laccasa si se pudieran manejar y transportar en el mismo recipiente como la propia enzima laccasa).

25 **[0005]** Ounichi (patente estadounidense nº 4.898.781) y Aronson (patente estadounidense nº 5.281.355) muestran la encapsulación de enzimas para la colada y aplicaciones del cuidado del hogar donde el producto resultante contiene únicamente una enzima y no contiene un sustrato reactivo. Sería recomendable producir una formulación líquida que contenga tanto la enzima como el sustrato, con la enzima aislada del sustrato reactivo. Entre las aplicaciones en las que una coformulación como tal sería útil se incluyen, sin carácter limitativo, sistemas de blanqueo enzimático, por ejemplo, utilizando una enzima perhidrolasa con un sustrato de éster y sistemas de tinción enzimática, por ejemplo, utilizando una enzima laccasa y un sustrato de tinte precursor.

35 BREVE SUMARIO DE LA INVENCIÓN

[0006] En un aspecto, la invención proporciona un sistema de administración líquida para enzima y sustrato coformulados, en el que el sistema de administración es una composición que contiene una enzima y un sustrato para la enzima, en el que la enzima se encapsula en una matriz polimérica soluble en agua. El sustrato está en una fase líquida sustancialmente no acuosa (es decir, menos de aproximadamente un 5 %, menos de aproximadamente un 1 % o menos de aproximadamente un 0,5 % de agua) en contacto con la matriz polimérica que contiene la enzima, en el que el polímero no es soluble en la fase líquida. La enzima retiene potencial catalítico en la matriz polimérica pero sustancialmente no reacciona con el sustrato en la composición durante al menos 10 días a 25 °C. Tras la adición de agua a la composición, la matriz polimérica se solubiliza, liberando la enzima, permitiendo que tenga lugar la reacción catalítica con el sustrato.

45 **[0007]** En algunas formas de realización, la composición contiene una o más enzimas elegidas de entre proteasas, celulasas, amilasas, pectinasas, perhidrolasas, peroxidasas, oxidasas de carbohidrato, enzimas que oxidan el fenol, cutinasas, lipasas, hemicelulasas, xilanasas, mannanasas, catalasas y laccasas y mezclas de estos. En algunas formas de realización, la composición contiene dos o más enzimas encapsuladas en la misma matriz polimérica. En algunas formas de realización, la composición contiene dos o más enzimas encapsuladas en matrices poliméricas separadas. En algunas formas de realización, la composición contiene dos o más enzimas encapsuladas en la misma matriz polimérica y al menos una enzima encapsulada en una matriz polimérica separada.

[0008] En algunas formas de realización, la composición contiene al menos un surfactante.

[0009] En algunas formas de realización, la matriz polimérica se elige del grupo consistente en alcohol polivinílico, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, polivinilpirrolidona, goma guar y derivados o copolímeros de estos. Un polímero adecuado para usarse en las composiciones presentadas en el presente documento es uno en el que una enzima puede encapsularse y que no es soluble en agua.

[0010] En algunas formas de realización, la matriz polimérica que contiene la enzima se presenta en forma de partículas suspendidas en un líquido sustancialmente no acuoso que contiene el sustrato. En una forma de realización, las partículas se mantienen en suspensión mediante una ayuda de suspensión. En alguna forma de realización, la suspensión líquida está en un recipiente que contiene una cantidad de enzima y sustrato suficiente para un único uso y/o previsto para un único uso (es decir, una dosis única) en una aplicación en la que la reacción enzima/sustrato es útil, donde el recipiente puede abrirse para dispensar el líquido, por ejemplo, mediante la apertura de una tapa o tapón. En algunas formas de realización, la suspensión líquida está en un recipiente resellable que contiene una cantidad de enzima y sustrato suficiente para usarse múltiples veces y/o destinada a usarse múltiples veces (es decir, múltiples dosis) que permite una dispensación repetida de la suspensión mediante la apertura y cierre de la tapa del recipiente, la apertura y cierre de una válvula o puerto dispensador o similar. En algunas formas de realización, la matriz polimérica que contiene la enzima se presenta en forma de un recipiente cerrado, es decir, sellado, tal como un estuche o bolsita, y el sustrato está en un líquido sustancialmente no acuoso dentro del recipiente polimérico.

[0011] El sustrato se solubiliza o dispersa en una fase líquida sustancialmente no acuosa que puede incluir un líquido no acuoso (fluido portador). Entre los ejemplos de fluidos portadores se incluyen, sin carácter limitativo, glicoles, surfactantes no iónicos, alcoholes, poliglicoles, ésteres de acetato o una mezcla de estos. Se puede combinar un sustrato sólido o líquido con uno o más fluidos portadores y se puede ser mezclar con el fluido o fluidos portadores o suspenderse en ellos. En algunas formas de realización, el fluido portador contiene sal o un tampón de pH para crear condiciones adecuadas para una solubilización aumentada del sustrato y/o solubilización reducida del polímero que encapsula. En algunas formas de realización, el fluido portador es un sustrato para la enzima, por ejemplo, un fluido portador de diacetato de propilenglicol puede servir como sustrato para una enzima perhidrolasa encapsulada en una matriz polimérica que es insoluble en diacetato de propilenglicol, p. ej., alcohol polivinílico, metilcelulosa, metilcelulosa de hidroxipropilo, polivinilpirrolidona). En muchas formas de realización, la administración muestra una estabilidad aumentada comparada con un sistema de administración comparable que carece del polímero.

[0012] En una forma de realización, la enzima es una perhidrolasa y el sustrato es un sustrato de éster, tal como, por ejemplo, un éster de acetato, p. ej., diacetato de propilenglicol. En algunas formas de realización, el sustrato de éster es diacetato de propilenglicol y el polímero que comprende la enzima perhidrolasa se presenta en forma de partículas suspendidas en el diacetato de propilenglicol o en forma de un recipiente cerrado que rodea el diacetato de propilenglicol, es decir, el diacetato de propilenglicol está contenido dentro del recipiente polimérico.

[0013] En algunas formas de realización, la enzima es una perhidrolasa, el sustrato es un sustrato de éster, la composición comprende además un compuesto que genera peróxido de hidrógeno, por ejemplo, elegido de entre percarbonato de sodio, perborato de sodio y peróxido de hidrógeno urea y se produce un perácido después de añadir agua a la composición. En algunas formas de realización, el perácido se elige de entre ácido peracético, ácido pernonanoico, ácido perpropiónico, ácido perbutanoico, ácido perpentanoico y ácido perhexanoico. En algunas formas de realización, el sustrato de éster es diacetato de propilenglicol y el compuesto que genera peróxido de hidrógeno se suspende en el diacetato de propilenglicol.

[0014] En algunas formas de realización, la enzima es una enzima perhidrolasa y la composición contiene sustratos para producir monoglicéridos y diglicéridos (p. ej., un donante de acilo y un receptor de alcohol) o un éster de sorbitán (p. ej., un donante de acilo y sorbitán). En algunas formas de realización, la enzima es una enzima perhidrolasa y la composición contiene sustratos para producir un éster fragante, por ejemplo, un éster de bencilo (p. ej., un donante de acilo y un alcohol volátil, por ejemplo, alcohol bencílico).

[0015] En algunas formas de realización, la enzima es una enzima que oxida fenol, tal como una enzima laccasa, y el sustrato es un mediador laccasa, por ejemplo, elegido de 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato), siringamida y siringonitrilo.

[0016] En diferentes aspectos, la invención proporciona una composición para usarse en una aplicación en la que una actividad enzimática es útil, por ejemplo, una composición de detergente, una composición de procesamiento textil o una composición de cuidado personal, en la que la composición contiene una enzima y un sustrato para la enzima, en la que la enzima se encapsula en una matriz polimérica soluble en agua y en la que la matriz polimérica que contiene la enzima está en contacto con una solución líquida sustancialmente no acuosa o suspensión que contiene el sustrato y es insoluble, tal como se describe en el presente documento.

5 **[0017]** En otro aspecto, la invención proporciona un kit que contiene un sistema de administración para enzima y sustrato coformulados como se describe en el presente documento o una composición que contiene el sistema de administración y empaquetamiento. En algunas formas de realización, el kit comprende además instrucciones para usarse en un método, por ejemplo, un método de descontaminación, un método de limpieza, un método de procesamiento de textil o un método de cuidado personal. En algunas formas de realización, el kit comprende además instrucciones para incorporar el sistema de distribución en una composición formulada para usarse en un método en que la actividad catalítica de la enzima sobre el sustrato es útil, por ejemplo, una composición de detergente, una composición de procesamiento textil o una composición de cuidado personal.

10 **[0018]** En otro aspecto, la invención proporciona un método para descontaminar que comprende: (a) la adición de una composición que comprende perhidrolasa como se describe en el presente documento al agua en presencia de una fuente de peróxido de hidrógeno y mezclarlo, generando así una solución de perácido acuosa; y (b) la puesta en contacto de un artículo que comprende un contaminante con la solución, reduciendo así la concentración del contaminante. En algunas formas de realización, el contaminante comprende una toxina elegida de entre toxina botulínica, toxina del ántrax, ricina, toxina escombroide, ciguatoxina, tetradoxina, micotoxinas o una combinación de estas. En algunas formas de realización, el contaminante comprende un patógeno elegido de entre una bacteria, un virus, un hongo, un parásito, un prión o una combinación de estos. En algunas formas de realización, el artículo se elige de una superficie dura, un tejido, un alimento, un pienso, un artículo de ropa, una alfombra, una moqueta, un textil, un instrumento médico y un instrumento de veterinaria. En algunas formas de realización, el agua se esteriliza. En algunas formas de realización, la puesta en contacto del artículo que ha de descontaminarse se lleva a cabo a una alta temperatura.

25 **[0019]** En otro aspecto, la invención proporciona un método para blanquear un textil, que comprende: (a) la adición de una composición que comprende perhidrolasa como se describe en el presente documento al agua en presencia de una fuente de peróxido de hidrógeno y mezclarlo, generando así una solución de perácido acuosa; y (b) la puesta en contacto de un textil con la solución durante un periodo de tiempo y bajo las condiciones adecuadas con el fin de permitir un blanqueamiento medible del textil, produciendo así un textil blanqueado.

[0020] En otro aspecto, la invención proporciona un método para limpiar, que comprende la puesta en contacto de un artículo que comprende una mancha con una composición de detergente como se describe en el presente documento en presencia de agua añadida, en el que al menos una parte de la mancha se elimina.

30 **[0021]** En otro aspecto, la invención proporciona un método para blanquear un textil, que comprende la puesta en contacto de un textil con una composición que contiene una enzima que oxida fenol (p. ej., laccasa) como se describe en el presente documento en presencia de agua añadida durante un periodo de tiempo y bajo las condiciones que permiten un blanqueamiento del textil medible, en el que la composición comprende un mediador que efectúa el blanqueamiento del textil, produciendo así un textil blanqueado.

35 **[0022]** En otro aspecto, la invención proporciona un método para cambiar el color de un textil, que comprende la puesta en contacto del textil con una composición que contiene una enzima que oxida fenol (p. ej., lactasa) como se describe en el presente documento en presencia de agua añadida durante un periodo de tiempo y bajo las condiciones adecuadas con el fin de permitir un cambio de color medible en el textil, en el que la composición comprende un mediador que efectúa un cambio de color en el textil bajo las condiciones usadas, produciendo así un textil con un cambio de color.

40 **[0023]** En otro aspecto, la invención proporciona un método para teñir el cabello, que comprende la puesta en contacto del cabello con una composición que contiene una enzima que oxida fenol (p. ej., laccasa) como se describe en el presente documento en presencia de agua añadida durante un periodo de tiempo y bajo las condiciones adecuadas con el fin de permitir un cambio de color medible en el cabello, en el que la composición comprende un mediador que efectúa un cambio de color en el cabello bajo las condiciones usadas, produciendo así cabello con un cambio de color.

45 **[0024]** En otro aspecto, la invención proporciona un método para el blanqueo y/o deslignificación de papel o pulpa, que comprende la puesta en contacto del papel o pulpa con una composición que contiene una enzima que oxida fenol (p. ej., laccasa) como se describe en el presente documento en presencia de agua añadida durante un periodo de tiempo y bajo las condiciones adecuadas con el fin de permitir un cambio de color y/o contenido de lignina medible en el papel o pulpa, en el que la composición comprende un mediador que efectúa un cambio de color y/o contenido de lignina, produciendo así papel o pulpa con un cambio de color y/o contenido de lignina.

50 **[0025]** En otro aspecto, la invención proporciona un método para la activación enzimática de fibras de madera con el fin de producir compuestos de madera, que comprende la puesta en contacto de la madera con una composición que contiene una enzima que oxida fenol (p. ej., laccasa) como se describe en el presente documento en presencia de agua añadida durante un periodo de tiempo y bajo las condiciones adecuadas con el fin de permitir un cambio medible del rendimiento del compuesto de madera, en el que la composición

comprende un mediador que efectúa el cambio del rendimiento del compuesto de madera, produciendo así madera con un cambio en la unión de fibra de madera.

[0026] En otro aspecto, la invención proporciona un método para tratar aguas residuales, que comprende la puesta en contacto del efluente de aguas residuales con una composición que contiene una enzima que oxida fenol (p. ej., laccasa) como se describe en el presente documento en presencia de agua añadida durante un periodo de tiempo y bajo las condiciones adecuadas con el fin de permitir una disminución medible en la concentración de fenol en las aguas residuales, en el que la composición comprende un mediador que efectúa la disminución en la concentración de fenol, produciendo así aguas residuales con una disminución en el contenido de fenol.

10 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0027]

La fig. 1 representa de forma esquemática reacciones catalizadas mediante una enzima perhidrolasa.

La fig. 2 muestra los resultados del experimento de lixiviación de la enzima con discos de laccasa PVA y mediador de laccasa ABTS, como se describe en el ejemplo 3.

La fig. 3 muestra los resultados del experimento de lixiviación de la enzima con discos de laccasa PVA y mediador de laccasa SA, como se describe en el ejemplo 3.

La fig. 4 muestra los resultados del experimento de lixiviación de la enzima con discos de laccasa PVA y mediador de laccasa SN, como se describe en el ejemplo 3.

La fig. 5 muestra los resultados del blanqueo del vaquero en los experimentos de la placa de microtitulación de 12 pocillos descritos en el ejemplo 3.

La fig. 6 muestra los resultados de la tintura y blanqueo del vaquero en los experimentos del Launder-Ometer descritos en el ejemplo 3.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0028] La invención proporciona un sistema de administración para enzima y sustrato coformulados. Las composiciones descritas en la presente memoria contienen una enzima encapsulada en una matriz polimérica que contiene un polímero soluble en agua. Las composiciones también contienen un sustrato para la enzima. La enzima encapsulada puede suspenderse en un recipiente sellado o presentarse en forma de recipiente cerrado que rodea una composición líquida sustancialmente no acuosa que comprende, consiste en o consiste básicamente en el sustrato, tal como, por ejemplo, un sustrato líquido, solución de sustrato o una suspensión líquida de cápsulas o partículas de sustrato sólido que contienen el sustrato. La liberación de enzima del polímero en el que se encapsula se desencadena mediante dilución en agua.

Definiciones

[0029] A menos que se defina de otra forma en la presente memoria, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado tal como lo entiende habitualmente un experto en la técnica a la que pertenece la presente invención. Por ejemplo, Singleton y Sainsbury, *Dictionary of Microbiology and Molecular Biology*, 2ª Ed., John Wiley and Sons, NY (1994); y Hale y Marham, *The Harper Collins Dictionary of Biology*, Harper Perennial, NY (1991) proporcionan a los expertos en la técnica con diccionarios generales de muchos de los términos usados en la presente invención. Cualquier método y material similar o equivalente a aquellos descritos en la presente memoria tienen utilidad en la práctica de la presente invención. Por consiguiente, los términos definidos justo a continuación se describen de forma más completa en referencia a la memoria en su totalidad. Asimismo, los términos singulares “un/a” y “el/la” usados en la presente memoria incluyen la referencia al plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. A menos que se indique lo contrario, los ácidos nucleicos se escriben de izquierda a derecha en la orientación 5' a 3'; las secuencias de aminoácidos se escriben de izquierda a derecha en la orientación amino a carboxi, respectivamente.

[0030] Se pretende que cada limitación numérica máxima dada en toda la presente memoria incluya cada limitación numérica inferior, como si tales limitaciones numéricas inferiores se escribieran de forma expresa en la presente memoria. Cada limitación numérica mínima proporcionada en toda la presente memoria incluirá cada limitación numérica superior, como si tales limitaciones numéricas superiores se escribieran de forma expresa en la presente memoria. Cada rango numérico proporcionado en toda la presente memoria incluirá cada rango numérico más limitado que entra dentro de dicho rango numérico más amplio, como si tales rangos numéricos más limitados se escribieran de forma expresa en la presente memoria.

[0031] El término “enzima” se refiere en el presente documento a cualquier proteína que cataliza una reacción química. La función catalítica de una enzima constituye su “actividad” o “actividad enzimática”. Una enzima normalmente se clasifica según el tipo de función catalítica que desarrolla, p. ej., hidrólisis de uniones de péptidos.

[0032] El término “sustrato” se refiere en el presente documento a una sustancia (p. ej., un compuesto químico sobre el que una enzima lleva a cabo su actividad catalítica para generar un producto.

[0033] Los términos “purificado” y “aislado” se refieren en la presente memoria a la eliminación de contaminantes de una muestra y/o a un material (p. ej., una proteína, ácido nucleico, célula, etc.), es decir, un material que se extrae de al menos un componente al que está asociado de forma natural. Por ejemplo, estos términos pueden referirse a un material que está sustancialmente o básicamente libre de componentes que normalmente lo acompañan tal y como se encuentra en su estado natural, tal como, por ejemplo, un sistema biológico intacto.

[0034] El término “polinucleótido” se refiere en la presente memoria a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud y cualquier estructura tridimensional y de cadena sencilla o múltiple (p. ej., monocatenario, bicatenario, triple hélice, etc.), que contienen desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos y/o formas análogas o modificadas de desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos, entre las que se incluyen bases o nucleótidos modificados o sus análogos. Puesto que el código genético se degenera, se puede usar más de un codón para codificar un aminoácido específico y la presente invención abarca polinucleótidos que codifican una secuencia de aminoácidos específica. Se puede utilizar cualquier tipo de nucleótido modificado o nucleótido análogo siempre que el polinucleótido retenga la funcionalidad deseada bajo condiciones de uso, entre las que se incluyen modificaciones que aumentan la resistencia a la nucleasa (p. ej., desoxi, 2'-O-Me, fosfortioatos, etc.). Se pueden incorporar marcas con fines de detección o captura, por ejemplo, anclas o marcas radioactivas o no radioactivas, p. ej., biotina. El término polinucleótido también incluye ácidos peptidonucleicos (PNA). Los polinucleótidos pueden darse de forma natural o de forma no natural. Los términos “polinucleótido” y “ácido nucleico” y “oligonucleótido” se emplean en la presente memoria indistintamente. Los polinucleótidos de la invención pueden contener ARN, ADN o ambos y/o formas modificadas y/o análogos de los mismos. Una secuencia de nucleótidos puede interrumpirse mediante componentes no nucleótidos. Uno o más enlaces de fosfodiéster pueden reemplazarse mediante grupos de unión alternativos. Estos grupos de unión alternativos incluyen, sin carácter limitativo, formas de realización en las que el fosfato se reemplaza con P(O)S (“tioato”), P(S)S (“ditioato”), (O)NR₂ (“amidato”), P(O)R, P(O)OR', CO o CH₂ (“formacetal”), en los que cada R o R' es independientemente H o alquilo sustituido o no sustituido (1-20 C) que contiene opcionalmente un enlace de éter (-O-), arilo, alqueno, cicloalquilo, cicloalqueno o araldilo. No todos los enlaces en un polinucleótido han de ser idénticos. Los polinucleótidos pueden ser lineales o circulares o comprender una combinación de partes lineales y circulares.

[0035] El término “polipéptido” se refiere en la presente memoria a cualquier composición compuesta por aminoácidos y reconocida como una proteína por los expertos en la técnica. En la presente memoria se emplea el código de una letra o tres letras convencional para los residuos de aminoácidos. Los términos “polipéptido” y “proteína” se usan indistintamente en la presente memoria para hacer referencia a polímeros de aminoácidos de cualquier longitud. El polímero puede ser lineal o ramificado, puede comprender aminoácidos modificados y puede interrumpirse mediante no aminoácidos. Los términos también incluyen un polímero de aminoácido que ha sido modificado de forma natural o mediante intervención; por ejemplo, formación de enlace de disulfuro, glicosilación, lipidación, acetilación, fosforilación o cualquier otra manipulación o modificación, tal como conjugación con un componente marcador. También incluidos en la definición se encuentran, por ejemplo, polipéptidos que contienen uno o más análogos de un aminoácido (incluidos, por ejemplo, aminoácidos no naturales, etc.), así como otras modificaciones conocidas en la técnica.

[0036] En la presente memoria, proteínas similares funcional y/o estructuralmente se consideran “proteínas relacionadas”. En algunas formas de realización, estas proteínas se derivan de un género y/o especie diferente, incluidas diferencias entre clases de organismos (p. ej., una proteína bacteriana y una proteína fúngica). En formas de realización adicionales, las proteínas relacionadas se proporcionan de las mismas especies. De hecho, no se pretende que los procesos, métodos y/o composiciones descritos en la presente memoria estén limitados a las proteínas relacionadas de cualquier fuente específica. Además, el término “proteínas relacionadas” abarca homólogos estructurales terciarios y homólogos de secuencia primaria. En formas de realización adicionales, el término incluye proteínas que presentan reacción cruzada de forma inmunológica.

[0037] El término “perhidrolasa” se refiere a una enzima que es capaz de catalizar una reacción de perhidrólisis que tiene como resultado la producción de una cantidad lo bastante alta de perácido adecuado para usarse en una aplicación tal como limpieza, blanqueo, desinfección o esterilización. Generalmente, una enzima perhidrolasa empleada en los métodos descritos en la presente memoria muestra una ratio de perhidrólisis e hidrólisis alta. En algunas formas de realización, la perhidrolasa comprende, consiste en o consiste básicamente en la secuencia de aminoácido perhidrolasa *Mycobacterium smegmatis* descrita en la SEQ ID NO: 1 o una variable u homólogo de esta. En algunas formas de realización, la enzima perhidrolasa comprende actividad aciltransferasa y cataliza una reacción de transferencia acilo acuosa.

[0038] El término “perhidrolización” o “perhidrolizar” o “perhidrólisis” se refiere en la presente memoria a una reacción en la que se genera un perácido de éster y sustratos de peróxido de hidrógeno. En una forma de

realización, la reacción de perhidrolización se cataliza con una enzima perhidrolasa, p. ej., aciltransferasa o arilesterasa. En algunas formas de realización, se produce un perácido por perhidrólisis de un sustrato de éster de la fórmula $R_1C(=O)OR_2$, donde R_1 y R_2 son las mismas fracciones orgánicas o diferentes, en presencia de peróxido de hidrógeno (H_2O_2). En una forma de realización, $-OR_2$ es $-OH$. En una forma de realización, $-OR_2$ se reemplaza por $-NH_2$. En algunas formas de realización, se produce un perácido mediante perhidrólisis de un ácido carboxílico o sustrato de amida.

[0039] El término “perácido” se refiere en la presente memoria a una molécula derivada de un éster ácido carboxílico que ha sido reaccionado con peróxido de hidrógeno con el fin de formar un producto extremadamente reactivo que es capaz de transferir uno de sus átomos de oxígeno, p. ej., un ácido orgánico de la fórmula $RC(=O)OOH$. Esta capacidad de transferir átomos de oxígeno es la que permite que un perácido, por ejemplo, ácido peracético, funcione como agente blanqueador.

[0040] La frase “fuente de peróxido de hidrógeno” incluye peróxido de hidrógeno así como los componentes de un sistema que pueden producir de forma espontánea o enzimática peróxido de hidrógeno como producto de reacción.

[0041] La frase “ratio entre perhidrólisis e hidrólisis” se refiere a la ratio entre la cantidad de perácido producido de forma enzimática y la cantidad de ácido producido de forma enzimática mediante un enzima perhidrolasa a partir de un sustrato de éster bajo las condiciones definidas y dentro de un periodo de tiempo definido.

[0042] El término “acilo” se refiere en la presente memoria a un grupo orgánico con la fórmula general $RCO-$, derivado de un ácido orgánico mediante la eliminación del grupo $-OH$. Normalmente, los nombres de grupos acilo terminan con el sufijo “-oilo”, p. ej., cloruro metanoilo, CH_3CO-Cl , es el cloruro de acilo formado a partir de ácido metanoico, CH_3CO-OH).

[0043] El término “acilación” se refiere en la presente memoria a una transformación química en la que uno de los sustituyentes de una molécula se sustituye por un grupo acilo o el proceso de introducción de un grupo acilo en una molécula.

[0044] El término “transferasa” se refiere en la presente memoria a una enzima que cataliza la transferencia de un grupo funcional de un sustrato a otro sustrato.

[0045] El término “conversión enzimática” se refiere en la presente memoria a la modificación de un sustrato o intermedio a un producto, mediante la puesta en contacto del sustrato o intermedio con una enzima. En algunas formas de realización, el contacto se realiza exponiendo de forma directa el sustrato o intermedio a la enzima adecuada. En otras formas de realización, la puesta en contacto comprende la etapa de exponer el sustrato o intermedio a un organismo que expresa y/o excreta la enzima, y/o metaboliza el sustrato y/o intermedio deseado a un intermedio y/o producto final deseado, respectivamente.

[0046] “Cantidad eficaz de enzima” se refiere en la presente memoria a la cantidad de enzima necesaria para conseguir la actividad requerida en la aplicación específica (p. ej., producción de ácido peracético mediante aciltransferasa para usarse en descontaminación). Los expertos en la técnica determinan fácilmente tales cantidades eficaces y se basan muchos factores, tal como la variable de enzima específica usada, la composición específica, el método de descontaminación, el artículo que ha de descontaminarse y similares.

[0047] El término “estabilidad” en referencia a una sustancia (p. ej., una enzima) o composición se refiere en la presente memoria a su capacidad de mantener un determinado nivel de actividad funcional durante un periodo de tiempo bajo determinadas condiciones medioambientales. Además, el término “estabilidad” puede utilizarse en una cantidad de contextos más específicos que se refieren a la condición medioambiental específica que sea de interés. Por ejemplo, “estabilidad térmica” se refiere en la presente memoria a la capacidad de una sustancia o composición de mantener su función (es decir, no degradarse) con una temperatura aumentada. Un cambio sustancial en la estabilidad se demuestra mediante al menos un aumento o disminución de aproximadamente un 5 % o mayor (en la mayoría de formas de realización, es preferiblemente un aumento) en la vida media de la actividad funcional que se analiza, comparado con la actividad presente en ausencia de las condiciones medioambientales elegidas.

[0048] El término “estabilidad química” usado en referencia a una enzima se refiere en la presente memoria a la estabilidad de la enzima en presencia de sustancias químicas que afectan de forma desfavorable a su actividad. En algunas formas de realización, entre dichas sustancias químicas se incluyen, sin carácter limitativo, peróxido de hidrógeno, perácidos, detergentes aniónicos, detergentes catiónicos, detergentes no iónicos, agentes quelantes, etc. Sin embargo, no se pretende que la presente invención esté limitada a cualquier nivel de estabilidad química específico ni gama de estabilidad química.

[0049] El término “estabilidad del pH” se refiere en la presente memoria a la capacidad de una sustancia (p. ej.,

una enzima) o composición de funcionar con un pH específico. La estabilidad con varios pH puede medirse ya sea mediante procedimientos convencionales conocidos por los expertos en la técnica y/o mediante los métodos descritos en la presente memoria. Un cambio sustancial en la estabilidad del pH se demuestra mediante al menos un aumento o disminución de aproximadamente un 5 % o mayor (en la mayoría de las formas de realización, es preferiblemente un aumento) en la vida media de la actividad funcional, comparado con la actividad con el pH óptimo. No se pretende que la presente invención esté limitada a ningún nivel de estabilidad de pH ni gama de pH.

[0050] El término “estabilidad oxidativa” se refiere en la presente memoria a la capacidad de una sustancia (p. ej., una enzima) o composición de funcionar bajo condiciones oxidativas, p. ej., en presencia de una sustancia química oxidante.

[0051] El término “estabilidad térmica” se refiere en la presente memoria a la capacidad de una proteína de funcionar a una temperatura específica. En general, la mayoría de las enzimas presentan una gama finita de temperaturas a las que funcionarán. Además de las enzimas que funcionan en temperaturas de nivel medio (p. ej., temperatura ambiente), existen enzimas que son capaces de funcionar con temperaturas muy altas o muy bajas. La estabilidad térmica puede medirse ya sea mediante procedimientos conocidos. Un cambio sustancial en la estabilidad térmica se demuestra mediante al menos un aumento o disminución de aproximadamente un 5 % o mayor en la vida media de la actividad catalítica de un mutante cuando se expone a una temperatura diferente (es decir, superior o inferior) a la temperatura óptima para la actividad enzimática. Sin embargo, no se pretende que los procesos, métodos y/o composiciones descritos en la presente memoria estén limitados a ningún nivel de estabilidad de temperatura o gama de temperaturas.

[0052] El término “sustancia química oxidante” se refiere en la presente memoria a una sustancia química que tiene la capacidad de blanquear. La sustancia química oxidante está presente con una cantidad, pH y temperatura adecuada para el blanqueo. El término incluye, sin carácter limitativo, peróxido de hidrógeno y perácidos.

[0053] El término “contaminante” se refiere en la presente memoria a cualquier sustancia que mediante el contacto o asociación con otra sustancia, material o artículo se vuelve no recomendable, impura y/o inadecuada para su uso.

[0054] El término “artículo contaminado” o “artículo que necesita descontaminarse” se refiere en la presente memoria a cualquier artículo o cosa en contacto con un contaminante o asociado a este y/o en necesidad de ser descontaminado. No se pretende que el artículo esté limitado a ninguna cosa o tipo de artículo específico. Por ejemplo, en algunas formas de realización, el artículo es una superficie dura, mientras que en otras formas de realización, el artículo es una prenda de vestir. En otras formas de realización adicionales, el artículo es un textil. En otras formas de realización más, el artículo se usa en el campo médico y/o veterinario. En algunas formas de realización, el artículo es un instrumento quirúrgico. En formas de realización adicionales, el artículo se usa en el transporte (p. ej., carreteras, pistas, vías férreas, trenes, coches, aviones, barcos, etc.). En formas de realización adicionales, el término se usa en referencia a comida y/o piensos, entre los que se incluyen, sin carácter limitativo, carne, subproductos cárnicos, pescado, marisco, verduras, fruta, productos lácteos, cereales, productos de panadería, forraje, henos, pasto, etc. De hecho, se pretende que el término abarque cualquier artículo que sea adecuado para la descontaminación mediante el uso de los métodos y composiciones proporcionados en la presente memoria.

[0055] El término “descontaminación” se refiere en la presente memoria a la eliminación de sustancialmente todos o todos los contaminantes de un artículo contaminado. En algunas formas de realización, la descontaminación abarca la desinfección, mientras que en otras formas de realización, el término incluye la esterilización. Sin embargo, no se pretende que el término esté limitado a estas formas de realización, ya que el término pretende incluir la eliminación de contaminantes inanimados, así como contaminación microbiana (p. ej., bacteriana, fúngica, viral, de priones, etc.).

[0056] El término “desinfectar” se refiere en la presente memoria a la eliminación de contaminantes de las superficies, así como a la inhibición o destrucción de microbios en las superficies de los artículos. No se pretende que la presente invención esté limitada a ninguna superficie, artículo o contaminante(s) o microbios específicos que han de eliminarse.

[0057] El término “esterilizar” se refiere en la presente memoria a la destrucción de todos los organismos microbianos en una superficie.

[0058] El término “esporicida” se refiere en la presente memoria a la destrucción de esporas microbianas, entre las que se incluyen, sin carácter limitativo, esporas bacterianas y fúngicas. El término incluye composiciones que son eficaces a la hora de impedir la germinación de esporas, así como aquellas composiciones que producen esporas completamente inviables.

[0059] Los términos “bactericida”, “fungicida” y “viricida” se refieren en la presente memoria a composiciones que matan bacterias, hongos y virus, respectivamente. El término “microbicida” se refiere a composiciones que inhiben el crecimiento y/o reproducción de cualquier microorganismo, entre los que se incluyen, sin carácter limitativo, bacterias, hongos, virus, protozoos, rickettsia, etc.

5 **[0060]** Los términos “bacteriostático”, “fungistático” y “virostático” se refieren en la presente memoria a composiciones que inhiben el crecimiento y/o reproducción de bacterias, hongos y virus, respectivamente. El término “microbiostático” se refiere a composiciones que inhiben el crecimiento y/o reproducción de cualquier microorganismo, entre los que se incluyen, sin carácter limitativo, bacterias, hongos, virus, protozoos, rickettsia, etc.

10 **[0061]** El término “composición de limpieza” se refiere en la presente memoria a composiciones que se utilizan en la eliminación de compuestos indeseados de artículos que han de limpiarse, tal como tela, platos, lentillas y otros sustratos sólidos, pelo (champús), piel (jabones y cremas), dientes (enjuagues bucales, pastas de dientes), etc. El término se refiere además a cualquier composición que sea adecuada para limpiar, blanquear, desinfectar y/o esterilizar cualquier objeto y/o superficie. Se pretende que el término incluya, sin carácter limitativo,
 15 composiciones de detergente (p. ej., detergentes para lavadoras sólidos y/o líquidos y detergentes para tejidos delicados; fórmulas de limpieza de superficies duras, tal como encimeras y ventanas de metal, cerámica, madera y cristal; productos de limpieza para alfombras; productos de limpieza para hornos; ambientadores para ropa, suavizantes para ropa; quitamanchas para lavadoras y textiles, así como detergentes para platos). El término incluye además cualquier material/compuesto elegido para el tipo específico de composición de limpieza deseada y la forma del producto (p. ej., composición en spray, gránulos, gel o líquida), siempre que la composición sea compatible con la aciltransferasa, la fuente de peróxido de hidrógeno, PGDA y cualquier otra enzima o sustancia usada en la composición. La selección específica de los materiales de la composición de limpieza se realiza fácilmente al tener en cuenta la superficie, artículo o tejido que se ha de limpiar y la forma deseada de la composición para las condiciones de limpieza durante su uso. De hecho, el término “composición de limpieza” tal y como se emplea en la presente memoria incluye, a menos que se indique lo contrario, agentes de limpieza de alta resistencia o multiusos en forma de polvo o gránulos, especialmente detergentes de limpieza; agentes de limpieza multiusos en forma de pasta, gel o líquido, especialmente los denominados líquidos de alta resistencia, detergentes para tejidos delicados líquidos; agentes de lavado de platos a mano o agentes de lavado de platos para tareas ligeras, especialmente aquellos con espumación alta; agentes de lavado de platos a máquina, entre los que se incluyen los diferentes tipos de pastillas, gránulos, líquidos y que ayudan en la
 20 brillantación para uso doméstico e institucional; agentes desinfectantes y de limpieza líquidos, entre los que se incluyen los de lavado a mano antibacterianos, barras de limpieza, enjuagues bucales, productos de limpieza para dentadura postiza, productos de limpieza para alfombras o coches, productos de limpieza para el baño, champús para el cabello y suavizantes; geles de ducha y baños de espuma y productos de limpieza para metal; así como productos auxiliares de limpieza tal como aditivos blanqueadores y barra quitamanchas o para el
 25 pretratamiento.

[0062] Los términos “composición de detergente” y “fórmula de detergente” se utilizan en la presente memoria en referencia a mezclas que están destinadas a usarse en un medio de lavado para la limpieza de objetos sucios. En algunas formas de realización, el término se emplea en referencia a tejidos y/o prendas para la colada
 40 (p. ej., “detergentes para la colada”). En formas de realización alternativas, el término se refiere a otros detergentes, tal como aquellos usados para limpiar platos, cubertería, etc. (p. ej., “detergentes para lavar los platos”). No se pretende que la presente invención se limite a ninguna composición o fórmula de detergente específica. De hecho, se pretende que además de una enzima perhidrolasa, p. ej., un aciltransferasa, el término incluya detergentes que contienen surfactantes, transferasa(s), enzimas hidrolíticas, reductasas de óxido, mejoradores de detergentes, agentes blanqueadores, activadores de blanqueo, colorante azul y colorantes fluorescentes, inhibidores aglomerantes, agentes enmascarantes, activadores de la enzima, antioxidantes y solubilizantes.

[0063] El término “enzima compatible” cuando se usa en el contexto de materiales de composiciones de limpieza indica en la presente memoria que los materiales no reducen la actividad enzimática hasta tal punto que
 50 la enzima relevante no es eficaz como se desea durante situaciones de uso normales.

[0064] El término “derivado” se refiere en la presente memoria a una proteína que se deriva de una proteína principal mediante la adición de uno o más aminoácidos tanto en uno como en ambos extremos C y N-terminal, la sustitución de uno o más aminoácidos en un sitio o número de sitios diferentes en la secuencia de aminoácidos y/o la eliminación de uno o más aminoácidos tanto en uno o en ambos extremos C y N-terminal y/o
 55 en uno o más sitios en la secuencia de aminoácidos, y/o la inserción de uno o más aminoácidos en uno o más sitios de la secuencia de aminoácidos. La preparación de una proteína derivada se consigue normalmente mediante la modificación de una secuencia de ADN que codifica una proteína natural, la transformación de la secuencia de ADN modificada en un huésped adecuado y la expresión de la secuencia de ADN modificada con el fin de producir una proteína derivada.

5 **[0065]** Las proteínas relacionadas (o derivadas) incluyen proteínas “variables”. Las proteínas variables se diferencian de una proteína principal y/o de una a otra por un pequeño número de residuos de aminoácidos. En algunas formas de realización, el número de los diferentes residuos de aminoácidos es cualquiera de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 25, 30, 35, 40, 45, o 50. En algunas formas de realización, las variables se diferencian por aproximadamente 1 a aproximadamente 10 aminoácidos.

[0066] En algunas formas de realización, las proteínas relacionadas, tal como las proteínas variables comprenden cualquiera de al menos aproximadamente un 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 99,5 % de la identidad de la secuencia de aminoácidos.

10 **[0067]** El término “secuencia análoga” se refiere en la presente memoria a una secuencia de polipéptidos dentro de una proteína que proporciona una función similar, estructura terciaria y/o residuos conservados con respecto a una proteína de referencia. Por ejemplo, en regiones de epitopos que contienen una hélice alfa o una estructura de hoja beta, el reemplazo de aminoácido(s) en una secuencia análoga mantiene el mismo elemento estructural. En algunas formas de realización, se presentan secuencias análogas que tienen como resultado una enzima variable que muestra una función similar o mejorada con respecto a la proteína principal de la que se deriva la variable.

20 **[0068]** El término “proteína homóloga” se refiere en la presente memoria a una proteína (p. ej., una enzima perhidrolasa) que tiene una función (p. ej., actividad enzimática) y/o estructura similar a la proteína de referencia (p. ej., una enzima perhidrolasa de una fuente diferente). Los homólogos pueden ser de especies relacionadas desde el punto de vista evolutivo o sin relacionar. En algunas formas de realización, un homólogo presenta una estructura cuaternaria, terciaria y/o primaria similar a la de una proteína de referencia, permitiendo así de forma potencial el reemplazo de un segmento o fragmento en la proteína de referencia con un segmento o fragmento análogo del homólogo, con reducida alteración de la estructura y/o función de la proteína de referencia en comparación con el reemplazo del segmento o fragmento con una secuencia de una proteína no homóloga.

25 **[0069]** En la presente memoria, las proteínas “de tipo silvestre”, “naturales” y “que se dan de forma natural” son aquellas que se encuentran en la naturaleza. Los términos “secuencia de tipo silvestre” se refieren a una secuencia de aminoácidos o de ácido nucleico que se halla en la naturaleza o que se da de forma natural. En algunas formas de realización, una secuencia de tipo silvestre es el punto inicial de un proyecto de creación de proteínas, por ejemplo, la producción de proteínas variables.

30 **[0070]** El término “blanqueo” indica en la presente memoria el proceso de tratamiento de un material textil tal como una fibra, hilo, tejido, prenda o material no tejido con el fin de producir un color más claro en dicha fibra, hilo, tejido, prenda o material no tejido. Por ejemplo, en la presente memoria blanqueo indica el blanqueamiento del textil mediante la eliminación, modificación o enmascaramiento de los componentes que provocan el color en materiales celulósicos u otros materiales textiles. Por lo tanto, “blanqueo” se refiere al tratamiento de un textil durante un periodo de tiempo suficiente y bajo las condiciones de temperatura y pH adecuados para efectuar un aclarado (es decir, blanqueamiento) del textil. El blanqueo puede llevarse a cabo utilizando agentes blanqueadores químicos y/o agentes blanqueadores generados de forma enzimática. Entre los ejemplos de agentes blanqueadores adecuados se encuentran, sin carácter limitativo, ClO₂, H₂O₂, perácidos, NO₂, etc.

40 **[0071]** El término “agente blanqueador” en la presente memoria incluye cualquier fracción que es capaz de blanquear un textil. Puede ser necesario un activador de blanqueo. Ejemplos de agentes blanqueadores químicos adecuados útiles en los procesos, métodos y composiciones descritos en la presente memoria son peróxido de sodio, perborato de sodio, permanganato de potasio y perácidos. En algunos aspectos, H₂O₂ puede considerarse un agente blanqueador químico cuando se ha generado de forma enzimática *in situ*. Una “composición blanqueadora química” contiene uno o más agentes blanqueadores químicos.

45 **[0072]** La frase “sistema de blanqueo enzimático” o “composición de blanqueo enzimática” contiene una o más enzimas o sustratos capaces de generar de forma enzimática un agente blanqueador. Por ejemplo, un sistema de blanqueo enzimático puede contener una enzima perhidrolasa, un sustrato de éster y una fuente de peróxido de hidrógeno, para la producción de un agente blanqueador de perácido.

50 **[0073]** Un “sustrato de éster” en referencia a un sistema de blanqueo enzimático que contiene una enzima perhidrolasa se refiere a un sustrato perhidrolasa que contiene un enlace de éster. Se pueden utilizar ésteres que comprenden alcoholes y ácidos carboxílicos aromáticos y/o alifáticos como sustratos con enzimas perhidrolasas. En algunas formas de realización, la fuente de éster es un éster de acetato. En algunas formas de realización, la fuente de éster se elige de uno o más de entre diacetato de propilenglicol, diacetato de etilenglicol, triacetina, acetato de etilo y tributirina. En algunas formas de realización, la fuente de éster se elige de los ésteres de entre uno o más de los siguientes ácidos: ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico, ácido butírico, ácido valérico, ácido caproico, ácido caprílico, ácido nonanoico, ácido decanoico, ácido dodecanoico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico y ácido oleico.

- 5 **[0074]** El término “fuente de peróxido de hidrógeno” indica peróxido de hidrógeno que se añade a un baño de tratamiento textil bien de una fuente exógena (es decir, una externa o exterior) o generada *in situ* mediante la acción de una oxidasa que genera peróxido de hidrógeno en un sustrato. La “fuente de peróxido de hidrógeno” incluye peróxido de hidrógeno así como los componentes de un sistema que pueden producir de forma enzimática o espontánea peróxido de hidrógeno como un producto de reacción.
- 10 **[0075]** El término “oxidasa que genera peróxido de hidrógeno” indica una enzima que cataliza una reacción de oxidación/reducción que implica oxígeno molecular (O₂) como el receptor electrón. En tal reacción, se reduce el oxígeno a agua (H₂O) o peróxido de hidrógeno (H₂O₂). Una oxidasa adecuada para usarse en la presente memoria es una oxidasa que genera peróxido de hidrógeno (en lugar de agua) en su sustrato. Un ejemplo de una oxidasa que genera peróxido de hidrógeno y su sustrato adecuado para usarse en la presente memoria es oxidasa de glucosa y glucosa. Otras enzimas de oxidasa que pueden utilizarse para la generación de peróxido de hidrógeno incluyen oxidasa de alcohol, oxidasa de etilenglicol, oxidasa de glicerol, oxidasa de aminoácido, etc. En algunas formas de realización, la oxidasa que genera peróxido de hidrógeno es una oxidasa de carbohidrato.
- 15 **[0076]** El término “textil” se refiere en la presente memoria a fibras, hilos, tejidos, prendas y no tejidos. El término incluye textiles hechos a partir de mezclas naturales, sintéticas (p. ej., manufacturadas) y distintas mezclas sintéticas y naturales. Por lo tanto, el término “textil(es)” se refiere a fibras, hilos, tejidos o tejidos de punto, no tejidos y prendas procesadas o sin procesar. En algunas formas de realización, un textil contiene celulosa.
- 20 **[0077]** El término “textil(es) que necesita(n) procesamiento” se refiere a textiles que necesitan ser desaprestados, descrudados, blanqueados y/o teñidos o pueden necesitar otros tratamientos tal como biopulido, biolavado a la piedra y/o suavizante.
- [0078]** El término “textil(es) que necesita(n) blanqueo” se refiere a textiles que necesitan ser blanqueados sin referencia a otros posibles tratamientos. Estos textiles pueden o no estar ya sujetos a otros tratamientos. De forma similar, estos textiles pueden o no necesitar tratamientos posteriores.
- 25 **[0079]** “Tejido” se refiere a un conjunto manufacturado de fibras y/o hilos que presenta un área de superficie sustancial en relación a su grosor y suficiente cohesión para proporcionar al conjunto con fuerza mecánica útil.
- [0080]** Los términos “purificado” y “aislado” se refieren en la presente memoria a la eliminación de contaminantes de una muestra y/o a un material (p. ej., una proteína, ácido nucleico, célula, etc.) que se ha extraído de al menos un componente al que está asociado de forma natural. Por ejemplo, estos términos pueden hacer referencia a un material que está sustancialmente o prácticamente libre de componentes que normalmente lo acompañan cuando se halla en su estado natural, tal como,
- 30 **[0081]** Los términos “apresto” o “aprestado” se refieren a compuestos usados en la industria textil para mejorar el rendimiento de tejido mediante el aumento de la resistencia de abrasión y la fuerza del hilo. El apresto se realiza normalmente con almidón o compuestos similares al almidón.
- 35 **[0082]** Los términos “desapresto” o “desaprestado” se refieren en la presente memoria a los procesos de eliminación de apresto, generalmente almidón, de textiles normalmente antes de aplicar tintes, blanqueos o acabados especiales.
- [0083]** “Enzima(s) desaprestada(s)” se refiere en la presente memoria a enzimas que se utilizan para eliminar de forma enzimática el apresto. Enzimas de ejemplo son amilasas, celulasas y mananasas.
- 40 **[0084]** El término “descrudado” indica en la presente memoria la eliminación de impurezas, por ejemplo, muchos de los compuestos no celulósicos (p. ej., pectinas, proteínas, cera, motas, etc.) hallados de forma natural en algodón y otros textiles. Además de las impurezas no celulósicas naturales, el descrudado puede eliminar, en algunas formas de realización, materiales residuales introducidos mediante procesos de fabricación, tal como lubricantes de hilado, enconado de hilos o encolado. En algunas formas de realización, se puede utilizar el blanqueo para eliminar impurezas de los textiles.
- 45 **[0085]** El término “enzima(s) de biodescrudado” se refiere a una(s) enzima(s) capaz de eliminar al menos una parte de las impurezas halladas en algodón u otros textiles.
- [0086]** El término “motas” se refiere a impurezas indeseadas, tal como fragmentos de semillas de algodón, hojas, raíces y otras partes de la planta, que se adhieren a la fibra incluso tras un proceso de despepitado mecánico.
- 50 **[0087]** El término textiles “sin procesar” se refiere en la presente memoria a textiles que no han recibido ningún blanqueo, tintura o tratamiento de acabado después de ser producido. Por ejemplo, cualquier tejido o tejido de

punto fuera del telar que no se ha acabado aún (desaprestado, descrudado, etc.), blanqueado o teñido se denomina textil sin procesar.

[0088] El término “tintura” se refiere en la presente memoria a la aplicación de color, especialmente empapando, por ejemplo, textiles en una solución colorante.

5 **[0089]** El término fibra, hilo o tejido “celulósico que no es algodón” indica fibras, hilos o tejidos que están compuestos principalmente por una composición basada en celulosa que no es algodón. Ejemplos de dichas composiciones incluyen lino, ramio, yute, linaza, rayón, lyocell, acetato de celulosa y otras composiciones similares que se derivan de celulósicas que no son algodón.

10 **[0090]** El término “pectato liasa” se refiere en la presente memoria a un tipo de pectinasa. “Pectinasa” indica una enzima pectinasa definida según la técnica donde las pectinasas son un grupo de enzimas que rompen enlaces glicosídicos de sustancias pécticas principalmente poli(1,4-alfa-D-galacturónico) y sus derivados (véase Sakai *et al.* (1993) *Advances in Applied Microbiology* 39:213-294). Preferiblemente, una pectinasa útil en la presente memoria es una enzima pectinasa que cataliza la escisión aleatoria de enlaces alfa-1,4-glicosídicos en ácido péctico también denominado ácido poligalacturónico mediante transeliminación, tal como la clase de enzima liasa poligalaturonato (EC 4.2.2.2) (PGL), también conocida como liasa poli(1,4-alfa-D-galacturónico), también conocido como pectato liasa.

15

[0091] El término “pectina” indica pectato, ácido poligalacturónico y pectina que pueden ser esterificados a un grado superior o inferior.

20 **[0092]** El término “cutinasa” se refiere en la presente memoria a una enzima derivada vegetal, bacteriana o fúngica usada en el procesamiento del textil. Las cutinasas son enzimas lipolíticas capaces de hidrolizar la cutina del sustrato. Las cutinasas pueden romper ésteres de ácido graso y otras composiciones basadas en aceite que necesitan ser eliminadas en el procesamiento (p. ej., el descrudado) de textiles. “Cutinasa” indica una enzima que presenta actividad de hidrólisis de cutina vegetal significante. De forma específica, una cutinasa tendrá actividad hidrolítica en la cutina de polímero de biopolíéster hallada en las hojas de las plantas. Las cutinasas adecuadas pueden aislarse de muchas fuentes vegetales, fúngicas y bacterianas diferentes.

25

[0093] El término “ α -amilasa” se refiere en la presente memoria a una enzima que rompe los enlaces α (1-4)glicosídicos de amilosa para producir moléculas de maltosa (disacáridos de α -glucosa). Las amilasas son enzimas digestivas halladas en la saliva y también las producen muchas plantas. Las amilasas rompen carbohidratos de cadena larga (tal como almidón) en unidades más pequeñas. Un α -amilasa “estable oxidativa” es un α -amilasa que resiste la degradación mediante medios oxidativos, cuando se compara con un α -amilasa estable no oxidativa, especialmente cuando se compara con la forma α -amilasa estable no oxidativa de la que se deriva el α -amilasa estable oxidativa.

30

[0094] El término “proteasa” indica un dominio de polipéptido o proteína de un polipéptido o proteína derivado de un microorganismo, p. ej., un hongo, bacteria o de una planta o animal que tiene la capacidad de catalizar la escisión de los enlaces de péptidos en una o más posiciones diferentes de una estructura de carbohidrato de proteína.

35

[0095] El término “productos de cuidado personal” indica en la presente memoria productos usados en la limpieza, blanqueo y/o desinfección de pelo, piel, cuero cabelludo y dientes, entre los que se incluyen, sin carácter limitativo, champús, lociones corporales, geles de ducha, loción hidratante tópica, pasta de dientes y/o otros limpiadores tópicos. En algunas formas de realización, estos productos se utilizan en seres humanos, mientras que en otras formas de realización, estos productos son útiles con animales no humanos (p. ej., en aplicaciones veterinarias).

40

[0096] Los términos “suspensión” o “dispersión” se refieren en la presente memoria a un sistema de dos fases en el que una fase sólida discontinua se dispersa dentro de una fase líquida continua.

45 **[0097]** El término “ayuda de suspensión” se refiere en la presente memoria a un material añadido a una composición líquida con el fin de impedir o reducir la sedimentación o la posibilidad de que floten partículas suspendidas. Las ayudas de suspensión funcionan normalmente al aumentar tanto la viscosidad como la fluencia de un líquido portador. Los fluidos con una fluencia significativa solo fluirán cuando se aplique una fuerza que sea mayor que la fluencia y, por lo tanto, muestre un comportamiento tixotrópico o pseudoplástico. Los agentes de suspensión eficaces normalmente actúan formando una red reversible de partículas o fibras con enlaces de fuerzas débiles. Entre los ejemplos de agentes de suspensión se incluyen, sin carácter limitativo, goma xantan y celulosa microfibrada, p. ej., CELLULON® (CP Kelco, San Diego, CA).

50

[0098] El término “encapsulado” se refiere en la presente memoria a una sustancia que está contenida dentro de un material circundante. Esto puede incluir morfologías de matriz o *core/shell* (núcleo/coraza) como se describe

en la técnica (véase, p. ej., "Microencapsulation" Kirk-Othmer *Encyclopedia of Chemical Technology*, 2005).

[0099] El término "miscible" se refiere en la presente memoria a un líquido que es capaz de mezclarse con otro líquido, con una ratio específica de los dos líquidos, sin separación en fases.

5 **[0100]** El término "matriz" se refiere en la presente memoria a un material en el que se contiene o se incrusta una sustancia.

[0101] El término "biopelícula" en la presente memoria es una colección de microorganismos incrustados en una matriz de sustancias poliméricas extracelulares y diferentes compuestos inorgánicos y orgánicos. Aunque algunas biopelículas pueden contener una única especie de microorganismo, normalmente las biopelículas contienen no solo diferentes especies de microorganismos sino diferentes tipos de microorganismos, por ejemplo, algas, protozoos, bacterias y otros.

Sistemas de coadministración de sustrato/enzima

15 **[0102]** La invención proporciona un sistema de administración líquida para enzima y sustrato coformulados en el que al menos se encapsula una enzima en una matriz polimérica y se formula con un sustrato para la enzima. El sustrato está en una fase líquida sustancialmente no acuosa en contacto con la matriz polimérica y en el que la matriz polimérica no es soluble. La matriz polimérica que contiene la enzima puede suspenderse en la fase líquida que contiene el sustrato o alrededor. La enzima y el sustrato no están en contacto en el sistema de administración en una configuración en la que puede darse catálisis enzimática. Cuando entra en contacto con agua, donde la matriz polimérica es soluble y donde la enzima es activa catalíticamente hacia el sustrato, se da actividad catalítica. Una o múltiples enzimas pueden incluirse en la composición, con al menos una enzima encapsulada en una matriz polimérica. En algunas formas de realización, el sistema de administración contiene dos o más enzimas, encapsuladas en la misma matriz polimérica o en matrices poliméricas separadas y el sistema de administración contiene un sustrato para al menos una de las enzimas.

25 **[0103]** El sustrato se solubiliza o suspende en un líquido portador que es sustancialmente no acuoso y en el que la matriz polimérica no es soluble. El líquido portador y el polímero se eligen de tal forma que la matriz polimérica permanece en forma sólida y sin aumento durante el almacenamiento. Esto puede conseguirse, por ejemplo, con un contenido bajo de agua, enlace cruzado reversible y/o baja temperatura de almacenamiento. En algunas formas de realización, la fase líquida contiene menos de aproximadamente un 5 %, menos de aproximadamente un 1 %, o menos de aproximadamente un 0,5 % de agua, por ejemplo, aproximadamente un 4 %, 3 %, 2 %, 1 %, 0,9 %, 0,8 %, 0,7 %, 0,6 %, 0,5 %, 0,4 %, 0,3 %, 0,2 %, o 0,1 % de agua.

30 **[0104]** La enzima encapsulada no reacciona sustancialmente con el sustrato en la fase líquida durante el almacenamiento del sistema de administración. En algunas formas de realización, menos de aproximadamente un 20 %, 10 %, 5 %, 1 %, o 0,5 % del sustrato en la fase líquida se convierte en producto durante el almacenamiento durante al menos aproximadamente 10 días, 2 semanas, 1 mes, 2 meses, 3 meses o más a aproximadamente 25 °C. En algunas formas de realización, menos de aproximadamente un 20 %, 10 %, 5 %, 1 %, o 0,5 % del sustrato en la fase líquida se convierte en producto durante el almacenamiento durante al menos aproximadamente 1,0 días, 2 semanas, 1 mes, 2 meses, 3 meses o más a aproximadamente 37 °C. En algunas formas de realización, menos de aproximadamente un 20 %, 10 %, 5 %, 1 %, o 0,5 % del sustrato en la fase líquida se convierte en producto durante el almacenamiento durante al menos aproximadamente 10 días, 2 semanas, 1 mes, 2 meses, 3 meses o más a aproximadamente 50 °C.

40 **[0105]** En un sistema de administración como se describe en la presente memoria, una enzima encapsulada retiene al menos aproximadamente un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o prácticamente todo el potencial catalítico inicial en la matriz polimérica, que se libera con el contacto con agua, pero no reacciona sustancialmente con el sustrato en la composición durante al menos aproximadamente 10 días, 2 semanas, 1 mes, 2 meses, 3 meses o más a aproximadamente 25 °C, 37 °C o 50 °C.

Matriz polimérica

50 **[0106]** La matriz polimérica comprende, consiste en o consiste básicamente en un polímero que es insoluble en un fluido portador que contiene el sustrato y soluble en agua. En algunas formas de realización, la matriz polimérica comprende, consiste en o consiste básicamente en alcohol polivinílico, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, polivinilpirrolidona, goma guar o derivados o copolímeros de estos o una mezcla de estos. En algunas formas de realización, la matriz polimérica contiene uno o más rellenos o expansores (p. ej., almidón, azúcar, arcilla, talco, carbonato de calcio, dióxido de titanio, fibras de celulosa), plastificante (p. ej., glicerol, sorbitol, propilenglicol), cosolvente, ligante, agente entumecedor (p. ej., poliacrilato, croscarmelosa sódica, glicolato de almidón sódico, hidroxipropilcelulosa de baja sustitución, galactomanano, Water-Lok, ZapLoc) o agente de liberación.

5 **[0107]** En algunas formas de realización, los polímeros son polímeros cargados negativamente, tal como heteropolisacáridos que incluyen residuos galacturónicos y/o glucurónidos. Tales polisacáridos puede incluir, por ejemplo, material producido por los organismos a partir de los cuales se han producido las propias enzimas y pueden permanecer como contaminantes en las preparaciones de enzima purificadas parcialmente aunque no tengan, en sí, una actividad enzimática útil. De forma alternativa o adicional, tales polisacáridos pueden añadirse de forma separada, en cantidades de hasta aproximadamente 1 a 5 % en peso o más de la suspensión. Tales cantidades pueden ser comparables a aquellas de las propias enzimas. En algunas formas de realización, los polisacáridos están presentes (o se añaden) antes del secado por pulverización. Otros polímeros de ejemplo son arabinogalactanos, xilogalactanos y, generalmente, polisacáridos ácidos.

10 **[0108]** En algunas formas de realización, la matriz polimérica incluye proteínas, péptidos o derivados de estos. Algunas o todas las proteínas o péptidos pueden estar presentes en un caldo de fermentación, medio celular o preparaciones de proteína parcialmente purificadas y pueden quedarse como contaminantes en las preparaciones de enzima purificadas parcialmente incluso aunque no tengan, en sí, una actividad enzimática útil. De forma alternativa o adicional, tales polisacáridos pueden añadirse de forma separada, en cantidades de hasta
15 aproximadamente 1 a 5 % en peso o más de la suspensión. Tales cantidades pueden ser comparables a aquellas de las propias enzimas.

20 **[0109]** En algunas formas de realización, las enzimas (y los sustratos opcionalmente) se encapsulan en polímeros que emplean técnicas que incluyen, sin carácter limitativo, moldeo por disolvente, secado por pulverización, liofilización, revestimiento por pulverización en lecho fluido, aglomeración en lecho fluido, enfriamiento por pulverización, granulación húmeda, granulación en tambor, granulación de alta cizalla, extrusión, revestimiento mediante bombo, conservación, gelificación y atomización. En formas de realización específicas, se emplea el secado por pulverización.

25 **[0110]** Generalmente, la cantidad de enzima encapsulada en la matriz polimérica es menor del 50 % en peso. En diferentes formas de realización, la cantidad de enzima encapsulada en la matriz polimérica está entre aproximadamente 0,01 % y aproximadamente 50 %, entre aproximadamente 0,1 % y aproximadamente 25 %, entre aproximadamente 1 % y aproximadamente 10 % o entre aproximadamente 2 % y aproximadamente 5 % en peso.

30 **[0111]** En algunas formas de realización, la matriz polimérica que contiene la enzima se presenta en forma de partículas que se suspenden en una fase líquida que contiene el sustrato. En diferentes formas de realización, las partículas tienen desde aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1000, desde aproximadamente 50 a aproximadamente 250, desde aproximadamente 100 a aproximadamente 300, desde aproximadamente 200 a aproximadamente 500, desde aproximadamente 400 a aproximadamente 800 o desde aproximadamente 600 a aproximadamente 1000 micrómetros de diámetro.

35 **[0112]** En algunas formas de realización, la matriz polimérica se presenta en forma de una película que tiene desde aproximadamente 5 a aproximadamente 1000, desde aproximadamente 50 a aproximadamente 100, desde aproximadamente 100 a aproximadamente 200 o desde aproximadamente 200 a aproximadamente 500 o desde aproximadamente 500 a aproximadamente 1000 micrómetros de grosor.

40 **[0113]** En algunas formas de realización, la matriz polimérica que contiene la enzima se presenta en forma de una película que forma un recipiente sellado (p. ej., un estuche, bolsita o cápsula) que rodea una fase líquida que contiene el sustrato.

Enzimas

45 **[0114]** En diferentes formas de realización, el sistema de administración contiene una o más proteasas, esterases, serina hidrolasas, lipasas, perhidrolasas, oxidasas, enzimas que oxidan fenol, laccasas, aciltransferasas, arilesterasas, perhidrolasas, amilasas, pectinasas, xilanasas, celulasas, hemicelulasas, catalasas, peroxidasas, oxidasa de carbohidratos, mananasas, fitasas, pectinasas, peroxidasas, oxidasas de carbohidrato, cutinasas, catalasas o mezclas de estas.

50 **[0115]** En una forma de realización, el sistema de administración contiene una laccasa (una oxidasa multicobre, EC 1.10.3.2, por ejemplo, de *Cerrena unicolor*) y un mediador (sustrato) para la laccasa, tal como sal diamónica de ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS), siringonitrilo (SN), siringamida (SA) o metilsiringato (MS) o 10-carboxipropil fenotiazina (PTP) o un mediador como se describe en la patente europea nº 1 064 359, 1 141 321, o 0 805 465, la patente estadounidense nº 6.329.332, la solicitud PCT nº 00/05349, o la publicación estadounidense nº 2008/0196173.

55 **[0116]** En una forma de realización, la enzima laccasa comprende, consiste en o consiste básicamente en la secuencia de aminoácidos representada en la SEQ ID NO: 1, a continuación, o una variable u homóloga de esta, que presenta al menos 70, 75, 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, o incluso 99 % o más de

identidad de secuencia, o una secuencia de aminoácidos como se describe en la solicitud PCT nº WO2008/076322, o una variable u homóloga de esta que presenta al menos 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, o 99, o incluso 99,5 % o más de identidad de secuencia.

AIGPVADLHIVNKDLAPDGVQRPTVLAGGTFPGTLITGQKGDNFQLNVIDDLTDDRMLT
 PTSIHWHGFFQKGTAWADGPAFVTQCPIIADNSFLYDFDVPDQAGTFWYHSHLSTQYC
 DGLRGAFVVYDPNDPHKDLVDVDDGGTVITLADWYHVLAQTVVGAATPDSTLINGLG
 RSQTGPADAELAVISVEHNKRYRFRFLVSISCDPNFTFSVDGHNMTVIEVDGVNTRPLTV
 DSIQIFAGQRYSFVLNANQPEDNYWIRAMPNIGRNTTTLTGKNAAILRYKNASVEEPTK
 VGGPAQSPLNEADLRPLVPAPVPGNAVPGGADINHRLNLTFSNGLFSINNASFTNPSVPA
 LLQILSGAQAQDLLPTGSYIGLELGKVVVELVIPPLAVGGPHPFHLHGHNFWVRSAGS
 DEYNFDDAILRDVVSIGAGTDEVTRFVTDNPGPWFLHCHIDWHLEAGLAIVFAEGINQT
 5 AAANP'IPQAWDELCPKYNGLSASQKVKPKKGTAI (SEQ ID NO: 1).

[0117] En algunas formas de realización, el sistema de administración contiene una enzima perhidrolasa (p. ej., aciltransferasa; arilesterasa) y sustrato(s) para producir un perácido por ejemplo, un donante de acilo tal como un sustrato de éster, p. ej., diacetato de propilenglicol (PGDA) y una fuente de peróxido de hidrógeno, p. ej., percarbonato de sodio, perborato de sodio, peróxido de hidrógeno urea o un sistema que genera peróxido de hidrógeno enzimático, por ejemplo, una oxidasa que genera peróxido de hidrógeno y su sustrato, p. ej., oxidasa de glucosa y glucosa.
 10

[0118] En algunas formas de realización, la enzima perhidrolasa es una enzima perhidrolasa *M. smegmatis* que se da de forma natural. En algunas formas de realización, la enzima perhidrolasa comprende, consiste en o consiste básicamente en la secuencia de aminoácidos descrita en la SEQ ID NO: 2 o una variable u homóloga de esta. En algunas formas de realización, la enzima perhidrolasa comprende, consiste en o consiste básicamente en una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o incluso 99,5% o más idéntica a la secuencia de aminoácido descrita en SEQ ID NO: 2.
 15

[0119] La secuencia de aminoácidos de la perhidrolasa *M. smegmatis* se muestra a continuación:

MAKRILCFGDSL TWGWVPVEDGAPTERFAPDVRWTGVLAQQLGADFEVIEEGLSARTI'
 NIDDPTDPRLNGASYLPSCLATHLPLDLVIIMLGNTDKAYFRRT'PLDIALGMSVLVTQV
 LTSAGGVGTTYPAPKVLVVSPPPLAPMPHPWFQLIFEGGEQKTTELARVYSALASFMKV
 20 PFFDAGSVISTDGVVDGIHFTEANNRDLGVALAEQVRSLL (SEQ ID NO: 2)

[0120] La secuencia polinucleótida correspondiente que codifica la perhidrolasa *M. smegmatis* es (5'-3'):

ATGGCCAAGCGAATTCTGTGTTTCGGTGATTCCCTGACCTGGGGCTGGGTCCCCGTC
 GAAGACGGGGCACCCACCGAGCGGTTCCGCCCCGACGTGCGCTGGACCGGTGTGCT
 GGCCCAGCAGCTCGGAGCGGACTTCGAGGTGATCGAGGAGGGACTGAGCGCGCGC
 ACCACCAACATCGACGACCCACCGATCCGCGGCTCAACGGCGCGAGCTACCTGCC
 GTCGTGCCTCGCGACGCACCTGCCGCTCGACCTGGTGATCATCATGCTGGGCACCAA
 CGACACCAAGGCCTACTTCCGGCGCACCCCGCTCGACATCGCGCTGGGCATGTGCG
 TGCTCGTCACGCAGGTGCTCACCAGCGCGGGCGGCGTCCGGCACCACGTACCCGGCA
 CCCAAGGTGCTGGTGGTCTCGCCGCCACCGCTGGCGCCCATGCCGCACCCCTGGTTC
 CAGTTGATCTTCGAGGGCGGCGAGCAGAAGACCACTGAGCTCGCCCGCGTGTACAG

CGCGCTCGCGTCGTTTCATGAAGGTGCCGTTCTTCGACGCGGGTTCGGTGATCAGCAC
 CGACGGCGTCGACGGAATCCACTTCACCGAGGCCAACAATCGCGATCTCGGGGTGG
 CCCTCGCGGAACAGGTGCGGAGCCTGCTGTAA-3' (SEQ ID NO: 3).

5 [0121] En algunas formas de realización, la enzima perhidrolasa comprende una o más sustituciones en una o más posiciones de aminoácidos equivalentes a la(s) posición(es) en la secuencia de aminoácidos de la perhidrolasa *M. smegmatis* descrita en SEQ ID NO: 2. En algunas formas de realización, la enzima perhidrolasa comprende cualquiera o cualquier combinación de sustituciones de aminoácidos elegidos de entre M1, K3, R4, I5, L6, C7, D10, S11, L12, T13, W14, W16, G15, V17, P18, V19, D21, G22, A23, P24, T25, E26, R27, F28, A29, P30, D31, V32, R33, W34, T35, G36, L38, Q40, Q41, D45, L42, G43, A44, F46, E47, V48, I49, E50, E51, G52, L53, S54, A55, R56, T57, T58, N59, I60, D61, D62, P63, T64, D65, P66, R67, L68, N69, G70, A71, S72, Y73, S76, C77, L78, A79, T80, L82, P83, L84, D85, L86, V87, N94, D95, T96, K97, Y99F100, R101, R102, P104, 10 L105, D106, I107, A108, L109, G110, M111, S112, V113, L114, V115, T116, Q117, V118, L119, T120, S121, A122, G124, V125, G126, T127, T128, Y129, P146, P148, W149, F150, I153, F154, I194, y F196.

15 [0122] En algunas formas de realización, la enzima perhidrolasa comprende una o más de las siguientes sustituciones en una o más de las posiciones de aminoácidos equivalentes a la(s) posición(es) en la secuencia de aminoácidos de la perhidrolasa *M. smegmatis* descrita en SEQ ID NO: 2: L12C, Q, o G; T25S, G, o P; L53H, Q, G, o S; S54V, L A, P, T, o R; A55G o T; R67T, Q, N, G, E, L, o F; K97R; V125S, G, R, A, o P; F154Y; F196G.

20 [0123] En algunas formas de realización, la enzima perhidrolasa comprende una combinación de sustituciones de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos equivalentes a las posiciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la perhidrolasa *M. smegmatis* descrita en SEQ ID NO: 2: L12I+S54V; L12M+S54T; L12T+S54V; L12Q+T25S+S54V; L53H+S54V; S54P+V125R; S54V+V125G; S54V+F196G; S54V+K97R+V125G; o A55G+R67T+K97R+V125G.

25 [0124] En algunas formas de realización, la suspensión líquida contiene una enzima perhidrolasa y sustratos para producir monoglicéridos y diglicéridos (p. ej., un donante de acilo y un receptor de alcohol) o un éster de sorbitán (p. ej., un donante de acilo y sorbitán). En algunas formas de realización, la suspensión líquida contiene una enzima perhidrolasa y sustratos para producir un éster fragante, por ejemplo, un éster de bencilo (p. ej., un donante de acilo y un alcohol volátil, por ejemplo, alcohol bencílico).

30 [0125] En algunas formas de realización, la enzima es una perhidrolasa y el sistema de administración contiene un sustrato de éster o mezcla de sustrato de éster, por ejemplo, un éster de acetato, p. ej., diacetato de propilenglicol (PGDA), acetato de etilo, acetato de butilo, acetato de hexilo, acetato de octilo, propionato de etilo, propionato de butilo, propionato de hexilo, acetato de isoamilo, acetato de citronelilo, propionato de citronelilo, acetato dodecílico, acetato de Neodol 23-3, acetato de Neodol 23-9, diacetato de etilenglicol, triacetina, tributirina, etilmetoxiacetato, acetato de linalilo, butirato de etilo, isobutirato de etilo, 2-metilbutirato etílico, isovalerato etílico, isovalerato dietílico, maleato dietílico, glicolato de etilo o una mezcla de estos.

35 [0126] En algunas formas de realización, el sistema de administración contiene una proteasa y al menos otra enzima sensible a las proteasas, es decir, una enzima que se puede hidrolizar mediante la proteasa, encapsulada en la misma matriz polimérica o distinta, o donde una de las proteasas o enzimas sensibles a las proteasas se encapsula en una matriz polimérica y la otra enzima está en una fase líquida en el sistema de administración y la proteasa no está sustancialmente activa catalíticamente hacia la enzima sensible a la proteasa hasta que se añade agua al sistema de administración.

Líquidos portadores

40 [0127] El sistema de administración incluye un sustrato para una enzima encapsulada en un líquido portador en el que la matriz polimérica (en el que se encapsula la enzima) es sustancialmente insoluble. Ejemplos sin carácter limitativo de líquidos portadores incluyen glicoles, surfactantes no iónicos, alcoholes, poliglicoles y ésteres de acetato. En algunas formas de realización, el líquido portador es, en sí, un sustrato para la enzima.

Ingredientes opcionales complementarios

45 [0128] En algunas formas de realización, el sistema de administración incluye uno o más surfactantes, es decir, un surfactante no iónico, aniónico, catiónico, anfófico, zwitteriónicos o semipolar no iónico, o una mezcla de estos. En algunas formas de realización, el sistema de administración incluye uno o más de: una ayuda de suspensión, un agente quelante, un agente estabilizador, un emulsionante, un amortiguador y/o una mezcla de estos.

50 *Composiciones*

5 **[0129]** La invención proporciona composiciones que contienen sistemas de coadministración de enzima/sustrato como se describe en la presente memoria. Composiciones de ejemplo incluyen: una composición de limpieza, una composición de desinfección, una composición de descontaminación, una composición de procesamiento textil, una composición de blanqueo, una composición de tincura textil, una composición de cuidado personal, una composición de tincura del cabello, una composición de procesamiento de papel o pulpa, una composición que produce compuesto de madera, una composición de procesamiento de aguas residuales, una composición de cocción, una composición de destilación, una composición de pienso animal, una composición de procesamiento de almidón y/o una composición que fermenta etanol. El sistema de administración puede almacenarse en la composición o se puede mezclar en la composición en el momento de utilizarse.

10 **[0130]** En una forma de realización, se presenta una composición de detergente para usarla en una aplicación de limpieza. Además del sistema de coadministración de enzima/sustrato descrito en la presente memoria, una composición de detergente puede contener uno o más ingredientes de detergente elegidos de entre surfactantes, mejoradores de detergentes, blanqueadores, precursores del blanqueo, estabilizadores de enzima, agentes formadores de complejos, agentes quelantes, reguladores de espuma, inhibidores de corrosión, agentes antielectrostáticos, tintes, perfumes, bactericidas, fungicidas y activadores. El sistema de administración puede almacenarse en la composición de detergente o se puede mezclar en la composición en el momento de utilizarse.

Método de uso

Métodos de limpieza

20 **[0131]** Los sistemas de coadministración de enzima/sustrato descritos en la presente memoria pueden usarse en métodos para limpieza. En algunas formas de realización, la invención proporciona un método para limpiar, que comprende la etapa de poner en contacto un artículo que contiene una mancha con una composición de detergente que comprende un sistema de coadministración de enzima/sustrato como se describe en la presente memoria en presencia de agua, donde al menos una parte de la mancha se elimina. Las enzimas adecuadas para utilizarse en los métodos de limpieza en la presente memoria incluyen, sin carácter limitativo, proteasas, amilasas, perhidrolasas, oxidasas, lipasas, celulasas, xilanasas, mananasas, estererasas, cutinasas, poliesterasas, pectinasas, enzimas que oxidan fenol, catalasas, lisozimas y hemicelulasas.

30 **[0132]** En una forma de realización, la invención proporciona un método para inhibir la transferencia del tinte de un tejido teñido a otro tejido durante el lavado, que comprende un sistema de coadministración de enzima/sustrato como se describe en la presente memoria en presencia de agua, donde el sistema de administración contiene una enzima capaz de blanquear, por ejemplo, una enzima que oxida fenol, tal como una laccasa o una peroxidasa, donde al menos una parte de las sustancias de color lixiviadas del tinte y/o tejido manchado se blanquea, impidiendo así la redeposición de sustancias de color en el otro tejido en el lavado.

Métodos de procesamiento textil

35 **[0133]** Los sistemas de coadministración de enzima/sustrato descritos en la presente memoria pueden utilizarse para el procesamiento textil. En algunas formas de realización, la invención proporciona un método para blanquear un textil que comprende la etapa de poner en contacto un textil con un sistema de coadministración de enzima/sustrato que contiene al menos una enzima y sustrato capaz de blanquear un textil, por ejemplo, una perhidrolasa y sustratos para producir un perácido o una enzima que oxida fenol, p. ej., una laccasa y un mediador capaz de producir un efecto blanqueante, en presencia de agua, durante un periodo de tiempo y bajo condiciones adecuadas para permitir un blanqueo medible del textil, produciendo así un textil blanqueado. En algunas formas de realización, la invención proporciona un método para cambiar el color de un textil (p. ej., teñir el textil), que comprende la etapa de poner en contacto un textil con un sistema de coadministración de enzima/sustrato que contiene una enzima y sustrato capaz de cambiar el color de un textil, por ejemplo, una enzima que oxida fenol, p. ej., una laccasa, y un mediador capaz de llevar a cabo un cambio de color, en presencia de agua, durante un periodo de tiempo y bajo condiciones adecuadas para permitir un cambio de color medible en el textil, produciendo así un textil con un cambio de color.

50 **[0134]** En algunas formas de realización, la invención proporciona métodos para el pretratamiento combinado de textiles de un único proceso, donde el sistema de coadministración de enzima/sustrato comprende al menos dos enzimas de procesamiento de textil. Por ejemplo, un proceso combinado para el desaprestado, descrudado y blanqueo incluye una enzima perhidrolasa y sustrato(s) (p. ej., sustrato de éster y fuente de peróxido de hidrógeno) como se describe en la presente memoria y enzimas pectinasa y amilasa. Un proceso de descrudado y blanqueo combinado incluye una enzima perhidrolasa y sustrato(s) como se describe en la presente memoria y una enzima pectinasa. Un proceso de desaprestado y blanqueo combinado incluye una enzima perhidrolasa y sustrato(s) como se describe en la presente memoria y una enzima amilasa. En los métodos de pretratamiento de textil combinado descritos en la presente memoria se puede utilizar una enzima pectinasa por sí sola o junto con una o más enzimas diferentes tal como proteasa, lipasa, celulasa, cutinasa y/o hemicelulasa.

Métodos de esterilización, desinfección y/o descontaminación usando una enzima perhidrolasa

[0135] Los sistemas de coadministración de enzima/sustrato de la presente invención (y sistemas y kits relacionados que incorporan estas composiciones) pueden utilizarse en una gama de métodos para la descontaminación, desinfección y/o esterilización de artículos.

5 **[0136]** En algunas formas de realización, el método para la descontaminación comprende: (a) proporcionar un sistema de coadministración de enzima/sustrato como se describe en la presente memoria que comprende una enzima con actividad perhidrolasa encapsulada en un polímero soluble en agua, donde dicha actividad comprende una ratio perhidrólisis e hidrólisis de al menos 2:1; una fuente de peróxido de hidrógeno; y un sustrato de éster; y (b) añadir la composición al agua y mezclar bajo condiciones y durante un periodo de tiempo
10 suficiente para solubilizar la matriz polimérica y generar una solución acuosa de al menos aproximadamente un 0,16 % de ácido peracético en peso, p. ej., al menos aproximadamente 20 minutos, y un pH menor que aproximadamente 9,0; y (c) exponer un artículo que comprende un contaminante a la solución.

15 **[0137]** En una forma de realización, el método para la descontaminación comprende: (a) proporcionar un sistema de coadministración de enzima/sustrato que comprende una enzima aciltransferasa encapsulada en un polímero soluble en agua, una fuente de peróxido de hidrógeno y diacetato de propilenglicol; (b) añadir la composición al agua y mezclar bajo condiciones y durante un periodo de tiempo suficiente para solubilizar la matriz polimérica y generar una solución acuosa de al menos aproximadamente un 0,16 % de ácido peracético en peso, p. ej., al menos aproximadamente 20 minutos; y (c) exponer un artículo que comprende un contaminante a dicha solución.

20 **[0138]** En algunas formas de realización, la fuente de peróxido de hidrógeno es un compuesto que genera peróxido de hidrógeno, por ejemplo, elegido de entre percarbonato de sodio, perborato de sodio y peróxido de hidrógeno urea. En algunas formas de realización, la fuente de peróxido de hidrógeno es un sistema enzimático, tal como una oxidasa que genera peróxido de hidrógeno y su sustrato, p. ej., oxidasa glucosa y glucosa. La oxidasa que genera peróxido de hidrógeno puede encapsularse en una matriz polimérica (la misma que la matriz polimérica en la que se encapsula la enzima perhidrolasa o diferente) o solubilizarse o suspenderse en la fase líquida en el sistema de administración. El sustrato para la oxidasa que genera peróxido de hidrógeno puede encapsularse en una matriz polimérica (la misma que la matriz polimérica en la que se encapsula la enzima perhidrolasa o diferente) o solubilizarse o suspenderse en la fase líquida en el sistema de administración.

25 **[0139]** Dependiendo del tipo específico de contaminante que ha de eliminarse, la etapa de exposición del artículo a la solución de perácido puede llevarse a cabo sobre una amplia gama de plazos de ejecución. Por ejemplo, en determinados procedimientos de esterilización, tiempos de exposición tan cortos como 30 segundos, 1 minutos, 5 minutos o 10 minutos pueden ser suficientes. Sin embargo, en otras aplicaciones (p. ej., eliminación de biopelículas), puede ser necesario exponer el artículo durante periodos de tiempo considerablemente mayores, tal como aproximadamente 30 minutos, 1 hora, 6 horas, 12 horas, 24 horas o incluso más, con el fin de
30 conseguir un nivel adecuado de descontaminación.

35 **[0140]** De forma similar, la temperatura de la solución de perácido durante la etapa de exposición puede regularse dependiendo del tipo de contaminante. En una forma de realización, la temperatura de exposición es la temperatura ambiente a la que se prepara la solución, es decir, normalmente aproximadamente 18-25 °C. En otras formas de realización, se pueden emplear mayores temperaturas con el fin de facilitar el proceso de descontaminación. Generalmente, mayores temperaturas acelerarán la reactividad de la solución de perácido, acelerando así el proceso de descontaminación. Por lo tanto, en algunas formas de realización, la etapa de exposición puede llevarse a cabo con la solución de perácido a aproximadamente 30 °C, 37 °C, 45 °C, 50 °C, 60 °C, 75 °C, 90 °C, o incluso superior.

40 **[0141]** En una forma de realización de los métodos, la matriz polimérica que contiene la enzima se presenta en forma de recipiente soluble en agua en el que se encierran los sustratos en una fase líquida y el recipiente se añade al agua.

45 **[0142]** Los métodos de descontaminación son útiles contra una amplia variedad de contaminantes que incluyen toxinas elegidas del grupo consistente en toxina botulínica, toxina del ántrax, ricina, toxina escombroide, ciguatoxina, tetrodotoxina, micotoxinas y cualquier combinación de estas; y patógenos elegidos del grupo consistente en bacterias, virus, hongos, parásitos, priones y cualquier combinación de estos. Por ejemplo, los métodos revelados en la presente memoria pueden utilizarse para la descontaminación de materiales contaminados con materiales que incluyen, sin carácter limitativo, sustancias químicas tóxicas, mostaza, VX, esporas *B. anthracis*, *Y. pestis*, *F. tularensis*, hongos y toxinas (botulina, ricina, micotoxinas, etc.), así como células infectadas con viriones infecciosos (flavivirus, ortomixovirus, paramixovirus, arnavirus, rhabdovirus, arbovirus, enterovirus, bunyavirus, etc.). En algunas formas de realización, el al menos un patógeno se elige de entre *Bacillus* spp., *B. anthracis*, *Clostridium* spp., *C. botulinum*, *C. perfringens*, *Listeria* spp., *Pseudomonas* spp., *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *E. coli*, *Yersinia* spp., *Y. pestis*,

Francisella spp., *F. tularensis*, *Campylobacter* spp., *Vibrio* spp., *Brucella* spp., *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp., *Cyclospora* spp., y *Trichinella* spp.

- 5 **[0143]** Las soluciones de perácido generadas utilizando los sistemas de administración descritos en la presente memoria y los métodos de su uso son eficaces a la hora de descontaminar biopelículas. Una de las propiedades que caracterizan las biopelículas es que los microorganismos en las mismas actúan de forma cooperativa o sinérgica. Se ha hallado de forma empírica que los microorganismos que viven en una biopelícula están mejor protegidos de biocidas que los microorganismos que viven fuera de una biopelícula. Por lo tanto, la eliminación de biopelículas patógenas representa un problema especialmente difícil a la hora de descontaminar y/o esterilizar el equipo.
- 10 **[0144]** En algunas formas de realización, las composiciones estables realizadas con el fin de generar una solución de perácido son útiles para eliminar biopelículas, incluidas aquellas que se forman por una o más bacterias patógenas elegidas del grupo consistente en: *Bacillus* spp., *B. anthracis*, *Clostridium* spp., *C. botulinum*, *C. perfringens*, *Listeria* spp., *Pseudomonas* spp., *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *E. coli*, *Yersinia* spp., *Y. pestis*, *Francisella* spp., *F. tularensis*, *Campylobacter* spp., *Vibrio* spp., *Brucella* spp., *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp., *Cyclospora* spp., *Trichinella* spp., y cualquier combinación de estas. En una forma de realización, una solución de perácido hecha mediante los métodos de la presente invención pueden utilizarse con el fin de descontaminar biopelículas elegidas del grupo consistente en: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* (SRWC-10943), *Listeria monocytogenes* (ATCC 19112) y cualquier combinación de estas.
- 20 **[0145]** En una forma de realización, las biopelículas patógenas que comprenden cultivos bacterianos de *Pseudomonas* spp., *Staphylococcus* spp., y/o *Listeria* spp., que contaminan equipo de acero inoxidable se pueden eliminar sustancialmente (es decir, una reducción de ~500-1000 veces) mediante la exposición a una solución APA al 0,16 % en peso (generada del sistema de coadministración de enzima/sustrato que contiene la perhidrolasa) a 45 °C durante 45 minutos.
- 25 **[0146]** En diferentes formas de realización, los métodos de descontaminación que emplean los sistemas de administración que contienen la perhidrolasa descritos en la presente memoria son útiles para esterilizar/descontaminar una amplia variedad de artículos contaminados, entre los que se incluyen superficies duras, tejidos, alimentos, pienso, artículos de ropa, alfombras, moquetas, textiles, instrumentos médicos, instrumentos de veterinaria, por ejemplo, equipo y artículos de acero inoxidable, incluidos grandes reactores, usados en los procesos farmacéuticos y de biotecnología.
- 30 **[0147]** Las soluciones de perácido generadas de forma enzimática empleando los sistemas de administración descritos en la presente memoria son bastante adecuados para limpiar equipos y artículos de acero inoxidable puesto que la ratio de perácido y el ácido correspondiente generado en solución acuosa es mucho más alta que la hallada en soluciones comerciales. Por ejemplo, una solución de ácido peracético (APA) generada utilizando la composición estable de la variable S54V de MsAcT, percarbonato y diacetato de propilenglicol (PGDA) tendrá una ratio de APA y ácido acético de aproximadamente 10:1. Las soluciones de APA comerciales normalmente tienen más ácido acético que APA y pueden incluso presentar la ratio opuesta (1:10). La ratio aumentada de APA y ácido acético reduce, u obvia completamente, la necesidad de llevar a cabo tratamientos pasivados adicionales del equipo o artículo de acero inoxidable después del tratamiento APA. Por lo tanto, en algunas formas de realización, se pueden utilizar soluciones de perácido generadas utilizando las composiciones estables de la presente invención con el fin de esterilizar equipo y artículos de acero inoxidable, entre los que se incluyen grandes reactores, usados en los procesos farmacéuticos y de biotecnología. En algunas formas de realización, las soluciones de perácido pueden utilizarse para esterilizar el equipo y artículos de acero inoxidable en una única etapa, sin necesidad de ningún tratamiento adicional del acero con un agente pasivante.
- 45 **[0148]** En formas de realización adicionales, se pueden utilizar los sistemas de administración descritos en la presente memoria para descontaminar alimentos y/o pienso, incluyendo sin carácter limitativo, verduras, frutas y otros artículos alimentarios y/o piensos. De hecho, se contempla que la presente invención será útil para la limpieza exterior de frutas, verduras, huevos, carnes, etc. De hecho, se pretende que la presente invención sea útil en las industrias alimentarias y/o de piensos para eliminar contaminantes de diferentes artículos alimentarios y/o de pienso. En algunas formas de realización, los métodos para descontaminar alimentos y/o pienso descritos por la Administración de Alimentos y Medicamentos estadounidense y/u otras entidades de seguridad alimentaria, como las conocidas por los expertos en la técnica, son útiles con la presente invención.
- 55 **[0149]** En formas de realización adicionales, el artículo que necesita ser descontaminado se elige de entre superficies duras, tejidos, alimentos, pienso, artículos de ropa, alfombras, moquetas, textiles, instrumentos médicos e instrumentos de veterinaria. En algunas formas de realización, los alimentos se eligen de entre frutas, verduras, pescado, marisco y carne. En algunas formas de realización adicionales, las superficies duras se eligen de entre superficies domésticas y superficies industriales. En algunas formas de realización, las superficies domésticas se eligen de entre encimeras de cocina, lavabos, armarios, tablas de cortar, mesas,

Solución madre del sustrato (100 mM p-Nitrofenil Butirato en DMSO)

[0159] Con el fin de preparar 10 mL, se añade 174,3 µL pNB a 10 mL DMSO.

Se divide en partes alícuotas de 1 mL y se almacena a -20 °C. Una solución de trabajo puede mantenerse a temperatura ambiente y desecharse cuando el color amarillo del fondo se vuelva inaceptablemente alto.

5 **Protocolo cubeta única**

[0160]

1. Configure el espectrofotómetro con el programa de análisis AAPF estándar, temperatura a 25 °C.
2. Diluya 10 µL de la solución madre del sustrato en 1 mL de tampón de análisis en una cubeta de 1 mL desechable. Equilibre a 25 °C.
3. Inicie espectrofotómetro.
4. Determine la velocidad ($\Delta A_{410}/\text{min}$).

[0161] Los resultados se muestran en la tabla 1.

Blanqueo textil

15 **[0162]** Se lavaron 3 muestras de tela de algodón 100 % de 7,62 cm (3 pulgadas) x 10,16 cm (4 pulgadas) cada una (Testfabrics, estilo #428U, satén de algodón desaprestado) y tres muestras de algodón entrelazado de 7,62 cm (3 pulgadas) x 10,16 cm (4 pulgadas) cada una en un Launder-O-Meter con y sin discos de perhidrolasa PVA, bajo las siguientes condiciones:

- Ratio del licor: 50:1
- pH 7 (100 M tampón fosfato de sodio)
- Temperatura: 60 °C
- PGDA: 4 ml/l
- H₂O₂ (50 %): 4 ml/l
- Tiempo de incubación: 60 min
- 25 Enzima perhidrolasa: siete discos de perhidrolasa PVA de 5/32 pulgadas (3,97 mm).

[0163] Se cuantificó el rendimiento del blanqueo con respecto a las muestras de satén de algodón 100 % midiendo los valores CIE L* con un Minolta CR-200 Chromameter. Los valores CIE L* más altos indican efectos de blanqueo más altos. Los resultados se muestran en la tabla 1. El algodón entrelazado se incluyó como relleno y no se evaluó el blanqueo del entrelazado.

30 **[0164]** Un control “no enzima” incluía todos los componentes anteriores excepto los discos de perhidrolasa PVA.

Tabla 1

Tipo película		Peso disco (mg)	Índice (disuelto en 4ml H ₂ O)				Actividad enzima total/mg disco		Blancura (CIE L*)		
			1	2	Media	DE	Media	DE	Media	DE	
51-05	Disco fresco 1	2.0	0.79	0.75	0.77	0.03	1537	1513	35	93.44	0.10
	Disco fresco 2	2.0	0.73	0.76	0.74	0.02	1488				
	Disco incubado 1	1.9	0.68	0.69	0.68	0.01	1441	1473	45		
	Disco incubado 2	2.0	0.73	0.78	0.75	0.03	1504				
71-30	Disco fresco 1	2.5	0.75	0.76	0.75	0.00	1206	1189	24	93.30	0.10
	Disco fresco 2	2.6	0.76	0.77	0.76	0.01	1172				
	Disco incubado 1	2.3	0.72	0.73	0.73	0.01	1261	1220	57		
	Disco incubado 2	2.6	0.76	0.78	0.77	0.01	1180				
No Enz									89.33	0.15	

Ejemplo 2

35 **[0165]** Se cortaron discos circulares de 5/32 pulgadas (3,97 mm) de película PVA (Elvanol 51-05) que presentaba un grosor de aproximadamente 50-100 µm y contenía enzimas de perhidrolasa y α-amilasa encapsuladas (“discos de perhidrolasa PVA/α-amilasa”). Las enzimas se encapsularon en la matriz polimérica como se describe anteriormente, pero con 9 partes de solución de polímero al 10 % a 1 parte cada uno de concentrado de perhidrolasa y concentrado de amilasa. La película de polímero resultante era aproximadamente 2,5 % en masa de cada enzima.

Lixiviación de enzima

[0166] Con el fin de evaluar la lixiviación de la enzima de los discos, se incubaron tres discos en viales de cristal sellados con o sin PGDA a 37 °C durante 60 horas. Después de la extracción de los viales, se disolvió cada disco en 4 ml de agua Milli-Q. Se midió la actividad alfa-amilasa utilizando el kit de análisis del índice Ceralpha disponible en Megazyme International Ireland Limited. Se evaluó la actividad alfa-amilasa mediante hidrólisis de *p*-nitrofenilo maltoheptaosido bloqueado en presencia de niveles de exceso de un α -glucosidasa termoestable, lo que tiene como resultado una hidrólisis cuantitativa del fragmento *p*-nitrofenil maltosacárido a glucosa y *p*-nitrofenol libre. La actividad perhidrolasa se midió usando el análisis del índice pNB como se describe en el ejemplo 1. Los resultados se muestran en la tabla 2. La actividad perhidrolasa (*) es la media de seis mediciones (2 por disco) y actividad amilasa es la media de tres mediciones (una por disco). La actividad se representa como $\Delta A_{410}/\text{min}$ para ambas enzimas.

Tabla 2

Enzima	Disco	Actividad	Desv. estándar
Perhidrolasa	Control	0,543	0,019
	PGDA	0,544	0,023
Amilasa	Control	0,042	0,001
	PGDA	0,040	0,002

Blanqueo y desaprestado textil

[0167] Se lavaron 3 muestras de tela de satén de algodón sin procesar de 7,62 cm (3 pulgadas) x 10,16 cm (4 pulgadas) (Testfabrics, estilo #428R) y tres muestras de algodón entrelazado sin procesar de 7,62 cm (3 pulgadas) x 10,16 cm (4 pulgadas) en un Launder-Ometer con y sin discos de perhidrolasa PVA/amilasa, bajo las siguientes condiciones:

Ratio del licor: 50:1
 pH: 7 (100 mM tampón fosfato de sodio)
 Temperatura: 60 °C
 PGDA: 4 ml/l
 H₂O₂ (50 %): 4 ml/l
 Tiempo de incubación: 60 min
 Enzimas: quince discos de perhidrolasa PVA/amilasa de 5/32 pulgadas (3,97 mm).

[0168] Para evaluar el desaprestado, se cortaron discos de tela de 5/8 pulgadas (1,58 cm) de cada muestra sin procesar tratada y, a continuación, los discos se tiñeron con una solución de yodo durante 1 min a temperatura ambiente. A continuación, se enjuagaron los discos de tela con agua fría, se le dieron ligeros toques con toallitas y se midió el color de los discos utilizando un Minolta CR-200 Chromameter. Se calcularon los valores CIE L* para cuantificar la profundidad de la tinción de yodo. Se evaluó el rendimiento del blanqueo para las muestras como se describe en el ejemplo 1. Un color más claro en un disco de tela indica que existe menos almidón presente, lo que indica mayor eficacia de desaprestado. Los resultados se muestran en la tabla 3.

Tabla 3

	Tinción de yodo (CIE L*)		Blanqueo (CIE L*)	
	Media	DesvEst	Media	DesvEst
Tampón control	26,10	2,25	87,33	0,20
(-) Enzimas	24,42	0,23	90,46	0,18
(+) Enzimas	33,93	1,25	93,54	0,23

Ejemplo 3

[0169] La enzima Laccasa de *Cerrena unicolor*, como se describe en la solicitud PCT n° WO 2008/076322, se encapsuló en alcohol polivinílico Elvanol 52-22 (hidrólisis 88 %, grado nominal de polimerización 1300), que se disuelve en agua a temperatura ambiente. La película polimérica contenía 1,5 % en masa de laccasa, 8,5 % en masa de sólidos de concentrado de ultrafiltración sin enzima de la fermentación y 90 % en masa de polímero. Se

cortaron discos circulares de 5/32 pulgadas (3,97 mm) de diámetro de la película PVA que contiene la enzima de laccasa encapsulada ("discos de laccasa PVA"). Se encapsuló la enzima en el polímero como se describe en el ejemplo 1.

Lixiviación de enzima

- 5 **[0170]** El blanqueo de enzima de los discos de laccasa PVA se evaluó utilizando tres mediadores de laccasa diferentes como sustratos para la enzima.

1. ABTS

- 10 **[0171]** Se insertaron dos discos de laccasa PVA en un vial de cristal con una solución de 1 ml de PGDA que contenía 1 % en peso de ABTS (diamonio 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) y se incubó durante 10 días a temperatura ambiente (vial "2" en la figura 2). Se preparó la misma preparación sin discos de laccasa PVA como un control negativo (vial "1" en la figura 2). Además, se disolvieron dos discos de laccasa PVA en 100 µl de agua desionizada y, a continuación, se añadieron al vial que contenía 1 ml de PGDA con 1 % de ABTS como un control positivo (vial "3" en la figura 2). Se controlaron los cambios de color de estas soluciones como indicio de la lixiviación de la enzima.

- 15 **[0172]** Después de 10 días de incubación a temperatura ambiente, no se observaron cambios de color en los viales 1 y 2. Sin embargo, el color de la solución en el vial 3 cambió a verde oscuro tan pronto como se añadió la laccasa disuelta al vial, lo que indica la reacción del mediador y laccasa.

2. SA

- 20 **[0173]** Se insertaron dos discos de laccasa PVA en un vial de cristal con una solución de 1 ml de PGDA que contenía 1 % en peso de siringamida (3,5-dimetoxi-4-hidroxibenzamida; "SA") y se incubó durante 10 días a temperatura ambiente ("4" en la figura 3). Se preparó la misma preparación sin discos de laccasa PVA como un control negativo ("5" en la figura 3). Además, se disolvieron dos discos de laccasa PVA en 100 µl de agua desionizada y, a continuación, se añadieron al vial que contenía 1 ml de PGDA con 1 % de SA como un control positivo ("6" en la figura 3).

- 25 **[0174]** El color de la solución que contenía la laccasa disuelta ("6") cambió de amarillo claro a marrón, lo que indica que la laccasa reaccionó con el mediador. Sin embargo, la misma preparación con discos de enzima encapsulada ("4") no cambió de color durante los 10 días de incubación y estos resultados sugieren que la laccasa encapsulada no reaccionó con SA en la solución PGDA.

- 30 **[0175]** Después de 10 días de incubación a temperatura ambiente, las soluciones incubadas se centrifugaron y se midió la absorbancia a 420 nm en un espectrofotómetro. Los resultados se muestran en la tabla 4.

Tabla 4

	Absorbancia (420nm)			
	1	2	Media	DesvEst
4 PGDA + SA	0,1980	0,1993	0,1987	0,0009
5 PGDA + SA + 2 discos enz	0,2028	0,2048	0,2038	0,0014
6 PGDA + SA + 2 discos enz + 100 ml agua	1,0357	1,0433	1,0395	0,0054

3. SN

- 35 **[0176]** Se insertaron dos discos de laccasa PVA en un vial de cristal con una solución de 1 ml de PGDA que contenía 5 % en peso de siringonitrilo (3,5-dimetoxi-4-hidroxibenzonitrilo; "SN") y se incubó durante 10 días a temperatura ambiente ("8" en la figura 4). Se preparó la misma preparación sin discos de laccasa PVA como un control negativo ("7" en la figura 4). Además, se disolvieron dos discos de laccasa PVA en 100 µl de agua desionizada y, a continuación, se añadieron al vial que contenía 1 ml de PGDA con 1 % de SN como un control positivo ("9" en la figura 4).

- 40 **[0177]** Después de 1 hora, el color del vial 9 cambió a un marrón verdoso, lo que indica que la laccasa reaccionó con SN. El color de los viales 7 y 8 permaneció sin cambios tras el periodo de 10 días de incubación.

Ensayo de aplicación

Preparación de tela vaquera

[0178] Se trataron una tela vaquera teñida de índigo/fondo de azufre desaprestada y una tela vaquera teñida de índigo 100 % desaprestada en una lavadora Unimac (50 libras [22,67 kg] a escala de laboratorio) con 1 g/L de celulasa INDIAGE® 44L a 55 °C y pH 4,8 durante 60 minutos con una ratio de licor de 10:1 seguido de dos enjuagues y después se secó.

- 5 **[0179]** Para los experimentos de placas de microtitulación de 12 pocillos descritos a continuación, se cortaron muestras de tela redondas con un diámetro de 5/8 pulgadas (1,58 cm) de la tela vaquera pretratada con celulasa. Para los experimentos del Launder-Ometer descritos a continuación, se cortaron muestras de tela de 7,62 cm (3 pulgadas) x 10,16 cm (4 pulgadas) de la tela vaquera pretratada con celulasa y, a continuación, se cosieron los bordes para impedir que se deshilaran durante el tratamiento.

10 Evaluación del rendimiento del blanqueo

[0180] Con el fin de cuantificar los efectos del blanqueo, las lecturas del reflectómetro de cada muestra de tela vaquera se tomaron antes y después del tratamiento utilizando un colorímetro Chromameter CR-200 de Minolta. La diferencia de color total (ΔE) se calculó según la siguiente fórmula:

$$\text{Diferencia de color total } (\Delta E) = \sqrt{(\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2)},$$

- 15 (donde ΔL , Δa , Δb , son diferencias en los valores CIE L*, CIE a*, y CIE b* respectivamente, antes y después del blanqueo de laccasa).

Experimentos de placas de microtitulación de 12 pocillos

[0181] Se incubaron muestras de tela vaquera pretratada con un diámetro de 5/8 pulgadas (1,58 cm) en una placa de microtitulación de 12 pocillos bajo las siguientes condiciones:

- 20 1. Solo tampón
2. Tampón + 50 μ l de solución PGDA que contiene 5 % SN
3. Tampón + 50 μ l de solución PGDA que contiene 5 % SN + laccasa encapsulada
- 25 ■ Ensayo de placa de microtitulación de 12 pocillos (volumen de reacción 2 ml) ■ pH: 6 (50 mM de tampón de acetato de sodio en agua) ■ Temperatura: 60 °C ■ Tiempo de incubación: 60 minutos ■ Enzima: 5 discos de 5/32 pulgadas (3,97 mm) de película de laccasa encapsulada por ensayo ■ Mediador: 50 μ l de solución PGDA que contiene 5 % siringonitrilo por ensayo

- 30 **[0182]** Los resultados se muestran en la figura 5. Se observó un efecto de blanqueo dramático cuando las muestras de tela vaquera se incubaron con discos de laccasa PVA. Los resultados indicaron claramente que el agua provocó la liberación de la laccasa de la película polimérica en la que estaba encapsulada, dando acceso al mediador y teniendo como resultado el hecho de que la reacción de la enzima con el mediador provocara el blanqueo.

Experimentos con Launder-Ometer

[0183] Se incubaron muestras de tela vaquera pretratada con celulasa de 7,62 cm (3 pulgadas) x 10,16 cm (4 pulgadas) en un Launder-Ometer bajo las siguientes condiciones:

- 35 (A) 1 ml de solución PGDA que contiene 5 % SN
(B) 1 ml de solución PGDA que contiene 5 % SN y 0,15 g de laccasa encapsulada
(C) 1 ml de solución PGDA que contiene 5 % ABTS
(D) 1 ml de solución PGDA que contiene 5 % ABTS y 0,15 g de laccasa encapsulada
- 40 ■ Launder-Ometer (volumen de reacción total 250 ml)
■ pH: 6 (50 mM de tampón de acetato de sodio en agua)
■ Temperatura: 60 °C
■ Tiempo de incubación: 60 minutos
■ Enzima: 0,15 g de película de laccasa encapsulada cortada en pequeños trozos aleatorios
■ Mediador:
- 45 ○ Siringonitrilo (SN)
○ Diamonio 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (ABTS)

[0184] Los resultados se muestran en la tabla 5 y la figura 6. Las muestras de tela vaquera tratadas con la preparación (B) (laccasa + sistema de coadministración SN) se blanquearon de forma significativa. El color de las muestras de tela vaquera tratadas con la preparación (D) (laccasa + sistema de coadministración ABTS) se

tiñeron a un color morado claro.

Tabla 5

	Diferencia de color entre antes y después de los tratamientos							
	Delta L		Delta a		Delta b		Delta E	
	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE
Tampón + PGDA + Mediador (SN)	0,38	0,62	-0,15	0,18	0,37	0,02	0,65	0,41
Tampón + PGDA + Mediador (SN) + Laccasa encapsulada	16,35	1,49	-2,78	0,06	6,89	1,04	17,96	1,76
Tampón + PGDA + Mediador (ABTS)	0,32	0,71	-0,07	0,15	0,29	0,11	0,64	0,32
Tampón + PGDA Mediador (ABTS) + Laccasa encapsulada	17,41	0,28	1,45	0,25	7,31	0,06	18,94	0,26

Ejemplo 4

5 Sistema de blanqueo de enzima estabilizado

[0185] Este ejemplo demuestra cómo puede usarse la encapsulación de enzima dentro de una matriz de polímero para estabilizar un sistema de desinfección o blanqueo enzimático en una única botella. El sistema de una única botella está diseñado para producir ácido peracético tras la dilución con agua. Sus componentes son: perborato de sodio, diacetato de propilenglicol (PGDA) y arilesterasa (ArE) y un fluido portador no acuoso. En la presente forma de realización, el fluido portador era un surfactante no iónico de alcoholetoxilato (Novel 1012-6 de Sasol Co.; Hamburgo, DE).

[0186] El componente de enzima ArE se añadió al sistema de dos formas: (1) directamente desde un concentrado de enzima líquido y (2) encapsulado en polímero como un polvo atomizado. El polímero era hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC, Methocel E5 Premium LV de Dow Chemical Co., Midland, MI, EEUU). El secado por pulverización se llevó a cabo de forma que el polvo atomizado era un 75 % (en masa) HPMC.

[0187] Tanto para el concentrado de enzima como para la enzima encapsulada, se añadieron 12,5 µg de ArE activa a cada uno de los seis tubos de ensayo que contenían 1 g del fluido portador, 135 mg de perborato de sodio y 2 mg de PGDA. Para cada conjunto de seis tubos, tres de los tubos se activaron (por dilución con 9 ml Tris, pH 9,0, tampón) y evaluaron para ácido peracético como se describe a continuación. Los otros tres tubos se incubaron a 37 °C durante cinco días, a continuación se activaron y evaluaron para ácido peracético.

Análisis para ácido peracético

Materiales y métodos:

[0188]

- Ácido peracético: Sigma-Fluka P/N 77240; L/N 11244491, 38,8 % (5,115M, F.W. = 76,05 g/mol), ácido peracético según Certificado de Análisis.
- Sal diamónica de ácido 2,2'-Azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS): Fluka P/N WA10917, L/N 1135552 54804068, 99+ % puro (HPLC), F.W. = 548,64 g/mol
- Ácido cítrico: Sigma P/N C1857, L/N 0054K0001, F.W. = 192,13
- Yodo de potasio (KI): P/N Sigma P4286, L/N 124K0151, F.W. = 166,0

30 Soluciones madre:

[0189]

- 125 mM de ácido cítrico, pH a 5,0 con NaOH, filtro estéril de 0,22 µm, estable de forma indefinida a temperatura ambiente hasta el crecimiento aparente (normalmente hongos con este pH).
- 100 mM de ABTS en H₂O Milli Q (MQ). Dividir en partes alícuotas de 500 µL y almacenar a -20 °C hasta seis meses.
- 25 mM de KI en H₂O MQ. Estable de forma indefinida a temperatura ambiente.

Sustrato de trabajo:

[0190]

1. Añade 50 mL de solución madre de tampón de ácido cítrico de 125 mM a un recipiente a prueba de luz (una botella de vidrio envuelta en papel de aluminio es aceptable).
2. Descongele una parte alícuota de 500 µL de solución madre ABTS y añádala a la solución de ácido cítrico.
3. Añade 100 µL de 25 mM KI al ácido cítrico.
4. Gire ligeramente para mezclar y tápelalo. Buena solución hasta 54 horas cuando se almacena en la oscuridad a temperatura ambiente.

Preparación de la curva patrón:

[0191]

1. Obtenga ácido peracético de reserva (normalmente ~ 39 %; ~390 (g/L)/76,05 (g/mol) ~ 5,13 M. NOTA: la presente concentración real se determinará mediante el número de análisis real indicado en el Certificado de Análisis.
2. Realice una dilución 1:100 del APA de reserva en 125 mM de ácido cítrico. Tape y mezcle durante 15 segundos.
3. Tome la dilución 1:100 de la etapa 2 y dilúyala 1:100 (eso haría una dilución 1:10000 del APA de reserva) en 125 mM de ácido cítrico. Tape y mezcle durante 15 segundos. Esta concentración de APA ahora es ~5000 mM/10000 = ~0,5 mM = ~500 µM
4. Tome la solución de la etapa tres y diluya 4 partes del patrón (el patrón de ~500 µM del nº 3) a 1 parte de ácido cítrico con el fin de realizar un patrón alrededor de 400 µM.
5. Tome la solución de la etapa tres y diluya 3 partes del patrón (el patrón de ~500 µM del nº 3) a 2 partes de ácido cítrico con el fin de realizar un patrón alrededor de 300 µM.
6. Tome la solución de la etapa tres y diluya 2 partes del patrón (el patrón de ~500 µM del nº 3) a 3 partes de ácido cítrico con el fin de realizar un patrón alrededor de 200 µM.
7. Tome la solución de la etapa tres y diluya 1 parte del patrón (el patrón de ~500 µM del nº 3) a 4 partes de ácido cítrico con el fin de realizar un patrón alrededor de 100 µM.

[0192] Análisis:

1. En una placa de microtitulación, coloque 20 µl de todos los patrones, en orden de dilución descendente por triplicado ya sea en forma de filas o formato de columnas (un patrón por pocillo).
2. Al final de la curva patrón, coloque 20 µl de ácido cítrico en pocillos triplicados (estos son los blancos).
3. Coloque en filas o columnas separadas 20 µl de muestras diluidas en pocillos triplicados.
4. Vierta una cantidad adecuada de sustrato de trabajo en una cuenca de sustrato (o base o tapa de placa de Petri limpia, o una tapa de caja de punta de pipeta limpia)
5. Con una pipeta multicanal, añada 200 µl de sustrato a cada pocillo de la placa de microtitulación que tiene el patrón, el blanco y la muestra.
6. Con un temporizador, deje que tenga lugar la reacción durante 3 minutos (+/- 0,5 min).
7. Lea los pocillos en un lector de microplacas a 420 nm.
8. Transfiera los datos a un Excel o utilice el programa de lector de placas para generar la curva patrón, calcular la pendiente y calcular la intersección con el eje y mediante la regresión lineal utilizando los datos de patrón (calcule la media, DE, etc.).
9. Calcule las concentraciones de muestra utilizando la pendiente y la intersección utilizando $y = m \cdot x + b$ y multiplicando por el factor de dilución de la muestra.

Resultados

- [0193]** Se calculó la media de los resultados de ácido peracético para cada conjunto de tres tubos y se tabularon. Los resultados se muestran en la tabla 6. La muestra encapsulada demostró una estabilidad significativamente aumentada tras 5 días a 37 °C.

Tabla 6

Muestra	Ácido peracético producido (µM)	
	No incubación	Tras 5 días a 37°C
Concentrado de enzima	410	153
Enzima encapsulada en polímero	417	275

REIVINDICACIONES

1. Un sistema de administración líquida para enzima y sustrato coformulados, en el que el sistema de administración es una composición que comprende una enzima y un sustrato para la enzima, en el que la enzima se encapsula en una matriz polimérica soluble en agua y el sustrato está presente en una fase líquida sustancialmente no acuosa en contacto con la matriz polimérica en la que se encapsula la enzima, en el que el polímero no es soluble en la fase líquida y la fase líquida sustancialmente no acuosa comprende menos de aproximadamente un 5 % de agua.
2. Sistema de administración según la reivindicación 1, en el que la fase líquida sustancialmente no acuosa comprende menos de aproximadamente un 1 % de agua.
3. Sistema de administración según la reivindicación 1, en el que la fase líquida sustancialmente no acuosa comprende menos de aproximadamente un 0,5 % de agua.
4. Sistema de administración según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la enzima retiene potencial catalítico en la matriz polimérica pero no reacciona sustancialmente con el sustrato en la composición durante al menos 10 días a 25 °C.
5. Sistema de administración según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que tras la adición de agua a la composición, la matriz polimérica se solubiliza, liberando la enzima, permitiendo que tenga lugar la reacción catalítica con el sustrato.
6. Sistema de administración según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende una o más enzimas elegidas del grupo consistente en proteasas, celulasas, amilasas, pectinasas, perhidrolasas, peroxidases, oxidasas de carbohidrato, enzimas que oxidan el fenol, cutinasas, lipasas, hemicelulasas, xilanasas, mananasas, catalasas, laccasas y mezclas de estas.
7. Sistema de administración según cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 6, que comprende:
 - (a) dos o más enzimas encapsuladas en la misma matriz polimérica; o
 - (b) dos o más enzimas encapsuladas en matrices poliméricas separadas.
8. Sistema de administración según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además al menos un surfactante.
9. Sistema de administración según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que:
 - (a) la matriz polimérica se elige del grupo consistente en alcohol polivinílico, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, polivinilpirrolidona, goma guar y derivados o copolímeros de estos; y/o
 - (b) la enzima encapsulada en una matriz polimérica en forma de partículas suspendidas en un líquido sustancialmente no acuoso que contiene el sustrato y opcionalmente las partículas se mantienen en suspensión mediante una ayuda de suspensión; y/o
 - (c) el sustrato se solubiliza o dispersa en una fase líquida sustancialmente no acuosa, que puede incluir de forma opcional un líquido no acuoso (fluido portador).
10. Sistema de administración según la reivindicación 9, en el que:
 - (a) el fluido portador se elige del grupo consistente en glicoles, surfactantes no iónicos, alcoholes, poliglicoles, ésteres de acetato y una mezcla de estos; o
 - (b) el fluido portador es un sustrato para la enzima.
11. Sistema de administración según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que:
 - (a) la enzima es una perhidrolasa y el sustrato es un sustrato de éster; o
 - (b) la enzima es una perhidrolasa y el sustrato es diacetato de propilenglicol.
12. Sistema de administración según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que comprende además un compuesto que genera peróxido de hidrógeno seleccionado de entre percarbonato de sodio, perborato de sodio y peróxido de hidrógeno urea, en el que se produce un perácido después de añadir agua a la composición.
13. Sistema de administración según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que:
 - (a) la enzima es una enzima laccasa y el sustrato es un mediador de laccasa; o

(b) la enzima es una enzima que oxida fenol y el sustrato se elige del grupo consistente en 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato), siringamida y siringonitrilo

- 5
14. Sistema de administración según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que la enzima es una perhidrolasa y el sustrato es un sustrato de éster y el sistema de administración comprende además perborato de sodio.
15. Sistema de administración según la reivindicación 14, en el que el sistema de administración aumentó la estabilidad de almacenamiento en comparación con un sistema de administración comparable que carecía del polímero.
- 10
16. Un kit que contiene el sistema de administración para sustrato y enzima coformulados según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 e instrucciones para su uso.
- 15
17. Método para blanquear un textil, que comprende: (a) la adición del sistema de administración de la reivindicación 14 o reivindicación 15 al agua en presencia de una fuente de peróxido de hidrógeno y la mezcla, generando así una solución de perácido acuosa; y (b) la puesta en contacto de un textil con la solución durante un periodo de tiempo y bajo las condiciones adecuadas con el fin de permitir un blanqueamiento medible del textil, produciendo así un textil blanqueado.
18. Método para descontaminar, que comprende: (a) la adición del sistema de administración de la reivindicación 14 o reivindicación 15 al agua en presencia de una fuente de peróxido de hidrógeno y la mezcla, generando así una solución de perácido acuosa; y (b) la puesta en contacto de un artículo que comprende un contaminante con la solución, reduciendo así la concentración del contaminante.
- 20
19. Método según la reivindicación 17 o la reivindicación 18, en el que la fuente de peróxido de hidrógeno es perborato de sodio.

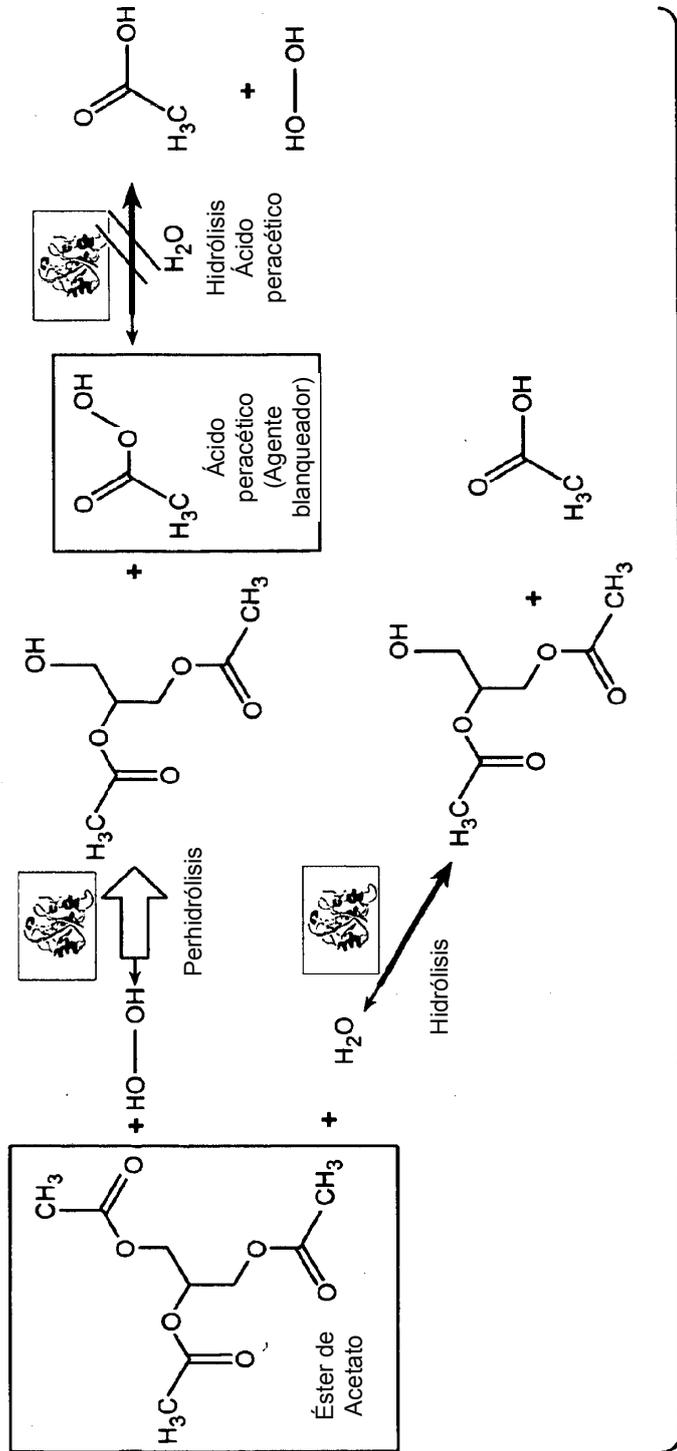
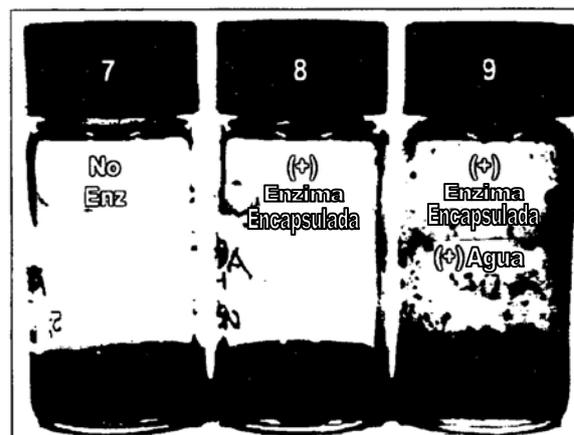
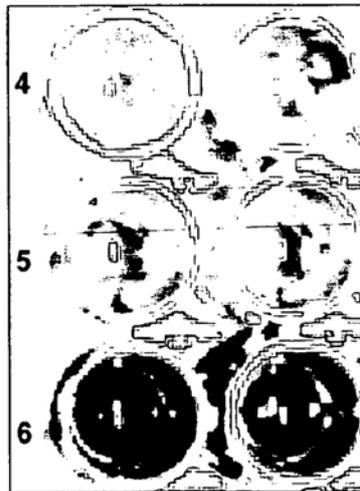
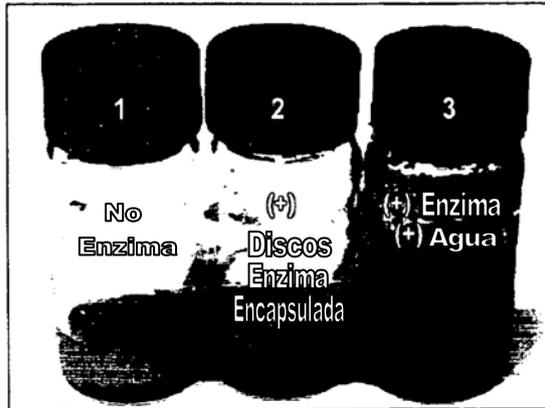


FIG. 1



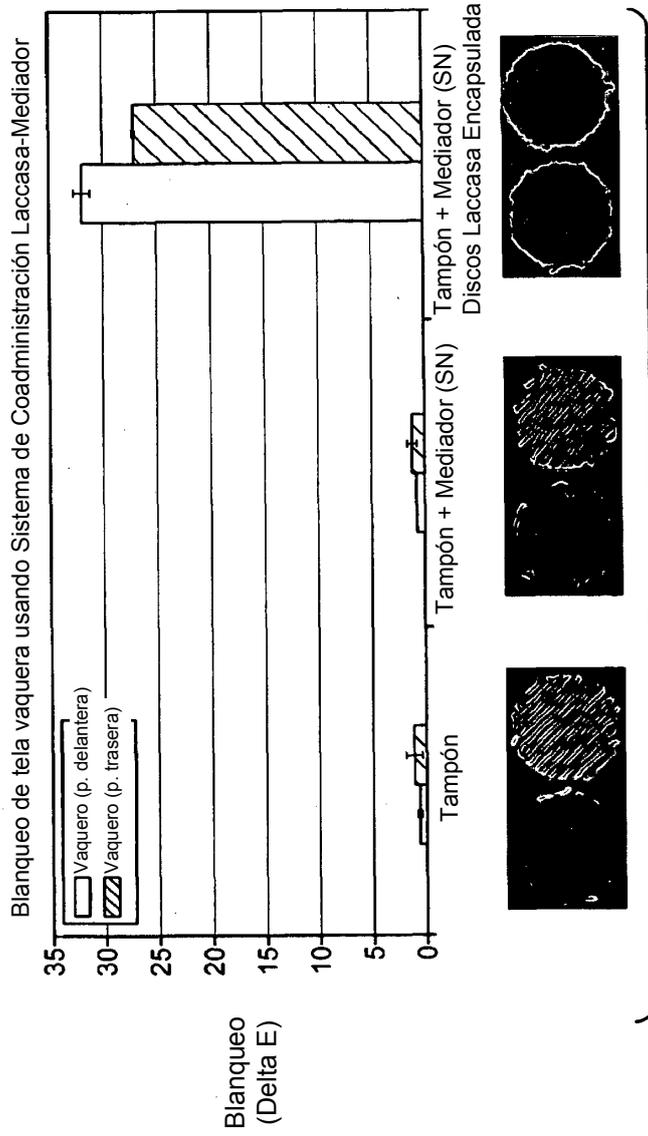


FIG. 5

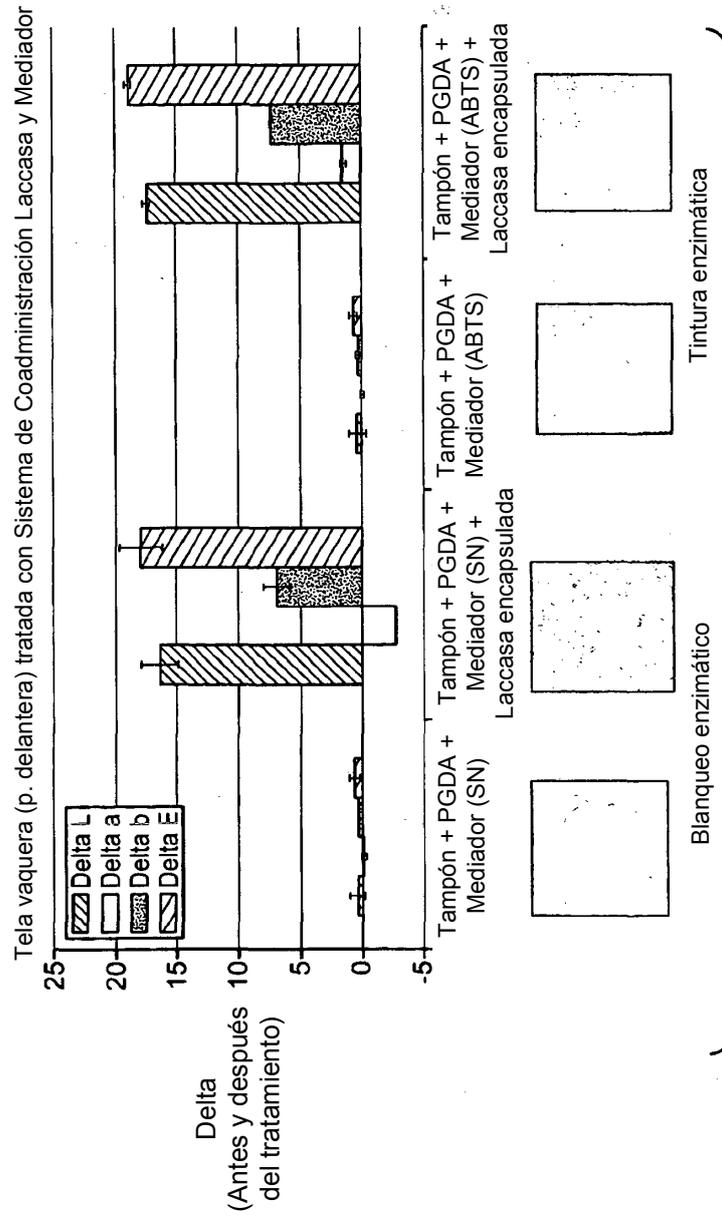


FIG. 6