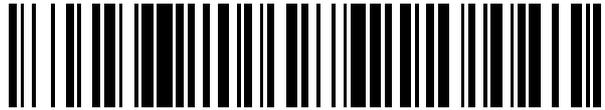


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 543 106**

51 Int. Cl.:

**D06M 11/50** (2006.01)  
**D06M 11/82** (2006.01)  
**D06M 16/00** (2006.01)  
**D06M 11/55** (2006.01)  
**C12N 9/14** (2006.01)  
**D06P 5/22** (2006.01)  
**C12N 9/10** (2006.01)  
**D06M 101/12** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.03.2011 E 11707325 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.04.2015 EP 2553160**

54 Título: **Tratamiento de fibras queratinosas con una enzima que presenta actividad perhidrolasa**

30 Prioridad:

**26.03.2010 US 317915 P**

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

**14.08.2015**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**YOON, MEE-YOUNG**

74 Agente/Representante:

**RIZZO, Sergio**

**ES 2 543 106 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**

Tratamiento de fibras queratinosas con una enzima que presenta actividad perhidrolasa

5 **CAMPO TÉCNICO**

**[0001]** Los presentes métodos se refieren al tratamiento de fibras queratinosas y de tejidos que comprenden dichas fibras con perácidos generados enzimáticamente en condiciones acuosas. El tratamiento reduce el fieltro y aumenta la captación de colorante.

10

**ANTECEDENTES**

**[0002]** Cuando los textiles elaborados a partir de fibras queratinosas, como la lana, se someten a manipulación mecánica en estado húmedo, tienden a encoger, en ocasiones de forma drástica. Dicho encogimiento se conoce como «fieltro». Por lo general, el fieltro no es deseable y es de carácter irreversible, y el tejido o la prenda se vuelven inservibles. La tendencia al fieltro puede reducirse mediante la modificación química de la superficie de los textiles, lo que cambia las propiedades de fricción de los textiles al reducir u ocultar la estructura de escamas.

15

**[0003]** La cloración es el método más antiguo y más conocido para reducir el fieltro y aumentar la captación de colorante. Sin embargo, los compuestos que contienen cloro y sus productos de degradación resultan perjudiciales para el medio ambiente y para los trabajadores textiles. Problemas medioambientales y de seguridad similares están asociados al acabado con resina, puesto que la resina se reticula normalmente con epíclorohidrina.

20

**[0004]** Se ha descrito el uso de los perácidos para modificar la superficie de las fibras de lana (por ejemplo, la patente de los Estados Unidos n.º 3.634.020); sin embargo, dichos métodos se realizan en soluciones anhídrido orgánicas. Los problemas medioambientales y de seguridad asociados al uso y almacenamiento de soluciones de perácido y de disolventes orgánicos concentrados excluyen a dichos métodos de ser viables comercialmente.

25

**[0005]** Los documentos WO 2010/030769 y US 2007/0167344 A1 describen el uso de una composición que comprende una perhidrolasa, un sustrato de éster y una fuente de peróxido de hidrógeno para su uso en blanqueo textil y composiciones de limpieza, respectivamente.

30

**[0006]** El documento US 2003/0154555 A1 da a conocer el uso de sulfito de sodio y transglutaminasa en el antifieltrado de la lana.

35

**[0007]** Existe la necesidad de composiciones y métodos más seguros, más respetuosos con el medio ambiente y más eficaces para reducir el fieltro y aumentar la captación de colorante de la lana y de otros tejidos elaborados a partir de fibras queratinosas.

40

**SUMARIO**

**[0008]** Se describen métodos para modificar químicamente fibras queratinosas, por ejemplo, para reducir el fieltro, aumentar la captación de colorante y/o reducir la tendencia al picor de textiles que comprenden dichas fibras.

45

**[0009]** En algunos aspectos, un método para reducir el fieltro de la lana o de otro textil elaborado a partir de fibras queratinosas, comprendiendo el método: la puesta en contacto del textil con una composición acuosa que comprende una enzima que presenta actividad perhidrolasa, un sustrato de éster para la enzima y una fuente de peróxido de hidrógeno, en el que la enzima genera perácidos *in situ* en un medio acuoso, y en el que los perácidos modifican el textil, reduciendo de este modo la tendencia del textil a fieltro. En algunas formas de realización, la enzima puede generar perácidos *in situ* antes de poner en contacto el textil con la composición acuosa. En algunas formas de realización, la puesta en contacto del textil con la composición acuosa se produce antes de que la enzima genere perácidos *in situ*. En algunas formas de realización, la puesta en contacto del textil con la composición acuosa y la generación de perácidos *in situ* por parte de la enzima se producen simultáneamente.

50

55

**[0010]** En un aspecto concreto, se ofrece un método para reducir el fieltro de la lana o de otro textil elaborado a partir de fibras queratinosas, comprendiendo el método la puesta en contacto del textil con una composición acuosa que comprende una enzima que presenta actividad perhidrolasa, un sustrato de éster para la enzima y una fuente de peróxido de hidrógeno, durante un periodo de tiempo suficiente para generar perácidos, en el que los perácidos modifican el textil, reduciendo de este modo la tendencia del textil a fieltro.

60

5 [0011] En otro aspecto concreto, se ofrece un método para reducir el fieltro de la lana o de otro textil elaborado a partir de fibras queratinosas, comprendiendo el método: (i) la provisión de una composición acuosa que comprende: una enzima que presenta actividad perhidrolasa, un sustrato de éster para la enzima y una fuente de peróxido de hidrógeno, (ii) la generación de perácidos *in situ* en la composición acuosa y (iii) la puesta en contacto del textil que comprende fibras queratinosas con la composición acuosa que comprende perácidos, modificando de este modo el textil para reducir la tendencia del textil a fieltroarse.

10 [0012] En otro aspecto concreto más, se ofrece un método para reducir el fieltro de la lana o de otro textil elaborado a partir de fibras queratinosas, comprendiendo el método: (i) la provisión de una composición acuosa que comprende: una enzima que presenta actividad perhidrolasa, un sustrato de éster para la enzima y una fuente de peróxido de hidrógeno, (ii) la generación de perácidos *in situ* en la composición acuosa y (iii) la puesta en contacto de las fibras queratinosas con la composición acuosa que comprende perácidos, modificando de este modo las fibras para reducir la tendencia a fieltroarse de un textil que comprende las fibras.

15 [0013] En un aspecto adicional, en un método para fabricar un textil que comprende fibras queratinosas, se ofrece un método para modificar las fibras para reducir el fieltro del textil, comprendiendo: (i) la provisión de una composición acuosa que comprende: una enzima que presenta actividad perhidrolasa, un sustrato de éster para la enzima y una fuente de peróxido de hidrógeno, (ii) la generación de perácidos *in situ* en la composición acuosa y (iii) la puesta en contacto de las fibras queratinosas con la composición acuosa que comprende perácidos para modificar las fibras, reduciendo de este modo la tendencia a fieltroarse de un textil que comprende las fibras.

20 [0014] En algunas formas de realización de cualquiera de los métodos anteriores, las fibras queratinosas se pueden obtener a partir de ovinos. En algunas formas de realización, el textil es lana.

25 [0015] En algunas formas de realización de cualquiera de los métodos anteriores, la enzima que presenta actividad perhidrolasa es un polipéptido que presenta una secuencia de aminoácidos que es al menos un 70 % idéntica a la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:1 o la SEQ ID NO:2. En algunas formas de realización, la enzima que presenta actividad perhidrolasa puede ser un polipéptido que presenta una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80 % idéntica a la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:1 o la SEQ ID NO:2. En algunas formas de realización, la enzima que presenta actividad perhidrolasa puede ser un polipéptido que presenta una secuencia de aminoácidos que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:1 o la SEQ ID NO:2.

30 [0016] En algunas formas de realización de cualquiera de los métodos anteriores, la enzima que presenta actividad perhidrolasa procede de la perhidrolasa *Mycobacterium smegmatis*. En algunas formas de realización, la enzima que presenta actividad perhidrolasa es una variante de la perhidrolasa *Mycobacterium smegmatis* que presenta la sustitución S54V.

35 [0017] En algunas formas de realización de cualquiera de los métodos anteriores, el sustrato de éster es diacetato de propilenglicol (PGDA), triacetina, acetato de etilo, tributirina y/o diacetato de etilenglicol (EGDA). En algunas formas de realización, la fuente de peróxido de hidrógeno es peróxido de hidrógeno, perborato o percarbonato.

40 [0018] Algunas formas de realización de cualquiera de los métodos anteriores comprenden además la etapa de tratamiento de la fibra queratinosa o de los textiles que comprenden la fibra queratinosa con sulfito de sodio para reducir más el fieltro de los textiles. Algunas formas de realización de dichos métodos comprenden además la etapa de tratamiento de la fibra queratinosa o de los textiles que comprenden la fibra queratinosa con transglutaminasa para mejorar la resistencia textil.

45 [0019] Estos y otros aspectos y formas de realización de los presentes métodos se pondrán de manifiesto a partir de la descripción, incluyendo las Figuras adjuntas.

50 **BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

55 **[0020]**

60 La Figura 1 es una micrografía electrónica de barrido que muestra la morfología de las fibras de lana tratadas con tampón (aumento ≈ 2000X).

La Figura 2 es una micrografía electrónica de barrido que muestra la morfología de las fibras de lana tratadas con tampón + PGDA + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (aumento ≈ 2000X).

65 La Figura 3 es una micrografía electrónica de barrido que muestra la morfología de las fibras de lana tratadas con tampón + PGDA + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + arilesterasa (aumento ≈ 2000X).

La Figura 4 muestra los espectros FTIR/ATR de fibras de lana tratadas con (1) tampón, (2) tampón + PGDA + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y (3) tampón + PGDA + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + arilesterasa.

5 La Figura 5 muestra los resultados de manchar fibras de lana con tratamientos diferentes con Shirlastain A. Las fibras de la izquierda no están teñidas (Control). Las fibras de la derecha están teñidas con Shirlastain A (Teñidas).

10 La Figura 6 muestra la cantidad de encogimiento de muestras de jersey de lana tratadas con tampón (izquierda), tampón + PGDA + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (centro) y tampón + PGDA + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + arilesterasa (derecha).

La Figura 7 ilustra la ubicación de marcas de referencia (es decir, hilos de algodón/poliéster; mostrados en forma de cruces) colocadas sobre muestras de tejido de lana antes del tratamiento.

15 La Figura 8 muestra los tamaños de muestras de lana de punto interlock tratadas con PGDA + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (izquierda) y PGDA + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + arilesterasa (derecha) y lavadas del modo descrito.

20 Las Figuras 9 y 10 son micrografías electrónicas de barrido que muestran la morfología de fibras de lana a partir de muestras tratadas con tampón + PGDA + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 9) y tampón + PGDA + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + arilesterasa (Figura 10), (aumento ≈ 2000X).

La Figura 11 muestra los espectros FTIR/ATR de fibras de lana de control y de las tratadas con perácidos generados enzimáticamente.

25 La Figura 12 muestra los espectros FTIR/ATR de tejido de jersey de lana tratado (1) sin enzima, (2) con arilesterasa, (3) con sulfito de sodio, (4) sin enzima seguida de sulfito de sodio y (4) con arilesterasa seguida de sulfito de sodio.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA

### 30 **Definiciones**

[0021] Antes de describir con detalle los presentes métodos, se definen las siguientes expresiones por claridad. Las expresiones que no aparezcan definidas se les deben asignar sus significados corrientes que se empleen en la técnica relevante.

35 [0022] Como se usa en la presente memoria, «fibras queratinosas» son fibras que comprenden queratina, una familia de proteínas estructurales fibrosas que se encuentran naturalmente en las células animales. Las fibras queratinosas se encuentran principalmente en la lana (véase a continuación), en el pelo, pelaje, uñas y otros tejidos animales. Como se usa en la presente memoria, las fibras queratinosas incluyen tanto fibras de origen  
40 naturale como sintéticas.

[0023] Como se usa en la presente memoria, «lana» se refiere a los textiles elaborados a partir de fibras queratinosas de animales de la familia de los *Caprinae*, principalmente ovinos. Sin embargo, la lana también abarca la cachemira y el mohair procedente de las cabras, la vicuña, alpaca y camello de animales de la familia  
45 de los camellos, y la angora de los conejos. Las fibras queratinosas usadas para hacer la lana son similares pero distintas del pelo o el pelaje.

[0024] Como se usa en la presente memoria, «fieltrado» se refiere al encogimiento de textiles que comprenden fibras queratinosas en uno o varios tamaños. El fieltrado se produce con facilidad, por ejemplo, al manipular dichos textiles en estado húmedo, donde interactúan las escamas presentes en la superficie de las fibras queratinosas, acercando las fibras y encogiendo los textiles.

[0025] Como se usa en la presente memoria, «encogimiento» se refiere a una disminución de la zona superficial de un tejido medida en uno o varios tamaños. El encogimiento puede estar asociado a un aumento de la  
55 densidad y a cambios en la textura.

[0026] Como se usa en la presente memoria, la expresión «textil» se refiere a fibras, hilos, tejidos, prendas y no tejidos. Los textiles pueden ser naturales, sintéticos (p. ej., manufacturados) o mezclas de estos. La expresión «textil» se refiere a fibras, hilos, tejidos o tejidos de punto, no tejidos y prendas tanto procesadas como sin  
60 procesar.

[0027] Como se usa en la presente memoria, la expresión «tejido» se refiere a un conjunto manufacturado de fibras y/o hilos que presenta una zona superficial sustancial en relación con su grosor y suficiente cohesión para proporcionar al conjunto una resistencia mecánica útil.

**[0028]** Como se usa en la presente memoria, la expresión «colorante» se refiere a una sustancia coloreada (es decir, cromófora) que presenta afinidad por un sustrato, como un textil, al cual se le aplica.

**[0029]** Como se usa en la presente memoria, «tinción» se refiere a la aplicación de un cromóforo a un sustrato, como por ejemplo un textil, especialmente al sumergirlo en una solución de tinción.

**[0030]** Como se usa en la presente memoria, un «medio acuoso» es una solución o mezcla de solución/suspensión en la que el disolvente es principalmente agua. Un medio acuoso está sustancialmente libre de disolventes inorgánicos.

**[0031]** Como se usa en la presente memoria, una «enzima perhidrolasa» o una «perhidrolasa» es una enzima capaz de catalizar una reacción de perhidrólisis que da como resultado la producción de perácidos. Preferiblemente, la enzima perhidrolasa presenta una razón entre perhidrólisis e hidrólisis alta. Las perhidrolasas pueden poseer actividad aciltransferasa y/o arilesterasa, y pueden nombrarse de manera acorde.

**[0032]** Como se usa en la presente memoria, la expresión «perhidrólisis» se refiere a una reacción en la que se usan un sustrato de éster y peróxido de hidrógeno para producir perácidos.

**[0033]** Como se usa en la presente memoria, una «cantidad eficaz de enzima perhidrolasa» se refiere a la cantidad de enzima perhidrolasa necesaria para modificar las fibras queratinosas para reducir el fieltro de un tejido elaborado a partir de estas.

**[0034]** Como se usa en la presente memoria, la expresión «perácido» se refiere a una molécula procedente de un éster de ácido carboxílico que ha sido reaccionado con peróxido de hidrógeno con el fin de formar un producto extremadamente reactivo que presenta la fórmula general  $RC(=O)OOH$ . Dichos productos de perácido son capaces de transferir uno de los átomos de oxígeno a otra molécula, como por ejemplo una fibra queratinosa.

**[0035]** Como se usa en la presente memoria, la expresión «sustrato de éster» se refiere a un sustrato de perhidrolasa que contiene al menos un enlace de éster. Se pueden utilizar los ésteres que comprenden alcoholes y ácidos carboxílicos aromáticos y/o alifáticos como sustratos con enzimas perhidrolasa.

**[0036]** Como se usa en la presente memoria, la expresión «acilo» se refiere a un grupo orgánico con la fórmula general  $RCO-$ , que puede proceder de un ácido orgánico mediante la eliminación del grupo  $-OH$ . Normalmente, los nombres de grupos acilo terminan con el sufijo «-oilo», p. ej., el cloruro de metanoilo,  $CH_3CO-Cl$ , es el cloruro de acilo formado a partir de ácido metanoico,  $CH_3CO-OH$ .

**[0037]** Como se usa en la presente memoria, la expresión «acilación» se refiere a una transformación química en la que uno de los sustituyentes de una molécula se sustituye por un grupo acilo o al proceso de introducción de un grupo acilo en una molécula.

**[0038]** Como se usa en la presente memoria, la expresión «fuente de peróxido de hidrógeno» se refiere a una molécula capaz de generar peróxido de hidrógeno, p. ej., *in situ*. Las fuentes de peróxido de hidrógeno incluyen peróxido de hidrógeno en sí mismo, así como moléculas que producen de forma espontánea o enzimática peróxido de hidrógeno como producto de reacción.

**[0039]** Como se usa en la presente memoria, la expresión «razón entre perhidrólisis e hidrólisis» se refiere a la razón entre perácido producido enzimáticamente y ácido producido enzimáticamente (p. ej., en moles) que produce una enzima perhidrolasa a partir de un sustrato de éster sometido a unas condiciones definidas y en un periodo de tiempo definido. Los ensayos ofrecidos en el documento WO 05/056782 pueden usarse para determinar las cantidades de perácido y de ácido producidas por la enzima.

**[0040]** Como se usa en la presente memoria, la expresión «oxidasa que genera peróxido de hidrógeno» se refiere a una enzima que cataliza una reacción de oxidación/reducción que implica oxígeno molecular ( $O_2$ ) como el aceptador de electrones. En una reacción de este tipo, el oxígeno se reduce a agua ( $H_2O$ ) o a peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). Una oxidasa adecuada para el uso en la presente memoria es una oxidasa que genera peróxido de hidrógeno (en lugar de agua) sobre su sustrato. Un ejemplo de una oxidasa que genera peróxido de hidrógeno y su sustrato adecuado para el uso en la presente memoria es oxidasa de glucosa y glucosa. Otras enzimas de oxidasa que pueden usarse para la generación de peróxido de hidrógeno incluyen oxidasa de alcohol, oxidasa de etilenglicol, oxidasa de glicerol, oxidasa de aminoácido, etc. La oxidasa que genera peróxido de hidrógeno puede ser una oxidasa de carbohidrato.

**[0041]** Como se usa en la presente memoria, las expresiones «polipéptido» y «proteína» se usan indistintamente para referirse a polímeros de cualquier longitud que comprenden residuos de aminoácidos enlazados por enlaces peptídicos. En la presente memoria se usa el código convencional de una letra o de tres letras para residuos de aminoácidos. El polímero puede ser lineal o ramificado, puede comprender aminoácidos modificados y puede

verse interrumpido por no aminoácidos. Las expresiones también abarcan un polímero de aminoácidos que ha sido modificado naturalmente o por intervención; por ejemplo, formación con enlace de disulfuro, glicosilación, lipidación, acetilación, fosforilación o cualquier otra manipulación o modificación, como por ejemplo la conjugación con un componente marcador. También se encuentran incluidos dentro de la definición, por ejemplo, los polipéptidos que contienen uno o varios análogos de un aminoácido (que incluyen, por ejemplo, aminoácidos no naturales, etc.), así como otras modificaciones conocidas en la técnica.

**[0042]** Como se usa en la presente memoria, proteínas similares desde el punto de vista funcional y/o estructural se consideran «proteínas relacionadas». Dichas proteínas pueden proceder de organismos de diferentes géneros y/o especies, o incluso de diferentes clases de organismos (p. ej., bacterias y hongos). Las proteínas relacionadas también abarcan homólogos determinados mediante un análisis de la secuencia primaria, determinados mediante análisis de la estructura terciaria o determinados mediante reactividad cruzada inmunológica.

**[0043]** Como se usa en la presente memoria, la expresión «polipéptido/proteína derivada» se refiere a una proteína que procede de una proteína mediante la adición de uno o varios aminoácidos tanto en uno como en ambos extremos N y C-terminal, la sustitución de uno o varios aminoácidos en un sitio o número de sitios diferentes de la secuencia de aminoácidos y/o la eliminación de uno o varios aminoácidos tanto en uno o en ambos extremos de la proteína o en uno o varios sitios de la secuencia de aminoácidos, y/o la inserción de uno o varios aminoácidos en uno o varios sitios de la secuencia de aminoácidos. La preparación de una proteína derivada puede lograrse mediante la modificación de una secuencia de ADN que codifica la proteína nativa, la transformación de dicha secuencia de ADN en un huésped adecuado y la expresión de la secuencia de ADN modificada con el fin de producir la proteína derivada.

**[0044]** Las proteínas relacionadas (y derivadas) incluyen «proteínas variables». Las proteínas variables difieren de una proteína de referencia/original, p. ej., una proteína natural, mediante sustituciones, eliminaciones y/o inserciones en un pequeño número de residuos de aminoácidos. El número de residuos de aminoácidos diferentes puede ser uno o más de uno, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50 o más residuos de aminoácidos. Las proteínas variables comparten al menos alrededor de un 70 %, al menos alrededor de un 75 %, al menos alrededor de un 80 %, al menos alrededor de un 85 %, al menos alrededor de un 90 %, al menos alrededor de un 91 %, al menos alrededor de un 92 %, al menos alrededor de un 93 %, al menos alrededor de un 94 %, al menos alrededor de un 95 %, al menos alrededor de un 96 %, al menos alrededor de un 97 %, al menos alrededor de un 98 % o incluso al menos alrededor de un 99 % o más de identidad de secuencia de aminoácidos con una proteína de referencia. Una proteína variable también puede diferir de una proteína de referencia en una selección de motivos, dominios, epítomos, regiones conservadas y similares.

**[0045]** Como se usa en la presente memoria, la expresión «secuencia análoga» se refiere a una secuencia dentro de una proteína que ofrece una función, estructura terciaria y/o residuos conservados similares a los de la proteína de interés (es decir, normalmente, la proteína original de interés). Por ejemplo, en las regiones epítomos que contienen una estructura de hélice alfa o lámina beta, los aminoácidos de sustitución en la secuencia análoga preferiblemente mantienen la misma estructura específica. La expresión también se refiere a secuencias de nucleótidos, así como a secuencias de aminoácidos. En algunas formas de realización, las secuencias análogas se desarrollan de modo que los aminoácidos de sustitución den como resultado una enzima variable que muestre una función similar o mejorada. En algunas formas de realización, la estructura terciaria y/o residuos conservados de los aminoácidos en la proteína de interés se sitúan en o cerca del segmento o fragmento de interés. Por consiguiente, en los casos en que el segmento o fragmento de interés contenga, por ejemplo, una estructura de hélice alfa o lámina beta, los aminoácidos de sustitución mantienen preferiblemente dicha estructura específica.

**[0046]** Como se usa en la presente memoria, la expresión «proteína homóloga» se refiere a una proteína que presenta actividad y/o estructura similares a las de una proteína de referencia. No se pretende que los homólogos estén necesariamente relacionados evolutivamente. Por consiguiente, se pretende que la expresión abarque la misma o mismas enzimas, similares o correspondientes (es decir, en términos de estructura y función) obtenidas de diferentes organismos. En algunas formas de realización, es deseable identificar un homólogo que presente una estructura cuaternaria, terciaria y/o primaria similar a la de una proteína de referencia. En algunas formas de realización, las proteínas homólogas inducen una respuesta o respuestas inmunológicas similares a las de la proteína de referencia. En algunas formas de realización, las proteínas homólogas están manipuladas para producir enzimas con una actividad o actividades deseadas.

**[0047]** El grado de homología entre secuencias puede determinarse mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica (véase, p. ej., Smith y Waterman (1981) *Adv. Appl. Math.* 2:482; Needleman y Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.*, 48:443; Pearson y Lipman (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444; programas como GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el paquete de software de Wisconsin Genetics (Genetics Computer Group, Madison, WI); y Devereux *et al.* (1984) *Nucleic Acids Res.* 12:387-395).

**[0048]** Por ejemplo, PILEUP es un programa de utilidad para determinar los niveles de homología entre secuencias. PILEUP crea un alineamiento de secuencias múltiple a partir de un grupo de secuencias relacionadas mediante alineamientos progresivos por pares. También puede representar un árbol que muestre las relaciones de agrupamiento usadas para crear el alineamiento. PILEUP usa una simplificación del método de alineamiento progresivo de Feng y Doolittle, (Feng y Doolittle (1987) *J. Mol. Evol.* 35:351-360). El método es similar al descrito por Higgings y Sharp (Higgings y Sharp (1989) *CABIOS* 5:151-153). Los parámetros útiles de PILEUP incluyen un peso del espacio predeterminado de 3,00, un peso de la longitud del espacio predeterminado de 0,10 y espacios de los extremos ponderados. Otro ejemplo de un algoritmo útil es el algoritmo BLAST, descrito por Altschul *et al.* (Altschul *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410; y Karlin *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-5787). Un programa BLAST que resulta particularmente útil es el programa WU-BLAST-2 (véase Altschul *et al.* (1996) *Meth. Enzymol.* 266:460-480). Los parámetros «W», «T» y «X» determinan la sensibilidad y velocidad del alineamiento. El programa BLAST usa de manera predeterminada una longitud de palabra (W) de 11, la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915), alineamientos (B) de 50, una expectativa (E) de 10, M<sup>5</sup>, N<sup>-4</sup>, y una comparación de ambas cadenas.

**[0049]** Como se usa en la presente memoria, las frases «sustancialmente similar» y «sustancialmente idéntico», en el contexto de al menos dos ácidos nucleicos o polipéptidos, normalmente se refiere a que un polinucleótido o polipéptido comprende una secuencia que presenta al menos alrededor de un 70 % de identidad, al menos alrededor de un 75 % de identidad, al menos alrededor de un 80 % de identidad, al menos alrededor de un 85 % de identidad, al menos alrededor de un 90 % de identidad, al menos alrededor de un 91 % de identidad, al menos alrededor de un 92 % de identidad, al menos alrededor de un 93 % de identidad, al menos alrededor de un 94 % de identidad, al menos alrededor de un 95 % de identidad, al menos alrededor de un 96 % de identidad, al menos alrededor de un 97 % de identidad, al menos alrededor de un 98 % de identidad o incluso al menos alrededor de un 99 % de identidad o más, en comparación con la secuencia de referencia (es decir, natural). La identidad con la secuencia puede determinarse mediante programas conocidos como BLAST, ALIGN y CLUSTAL por medio de parámetros estándar. (Véase, p. ej., Altschul, *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410; Henikoff *et al.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915; Karin *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873; y Higgings *et al.* (1988) *Gene* 73:237-244). El *software* para realizar los análisis BLAST está disponible públicamente a través del Center for Biotechnology Information. También puede buscarse en bases de datos por medio de FASTA (Pearson *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444-2448). Un indicativo de que dos polipéptidos son sustancialmente idénticos es que el primer polipéptido reacciona inmunológicamente de forma cruzada con el segundo polipéptido. Normalmente, los polipéptidos que difieren en sustituciones de aminoácidos conservadoras reaccionan inmunológicamente de forma cruzada. Por consiguiente, un polipéptido es sustancialmente idéntico a un segundo polipéptido, por ejemplo, cuando los dos péptidos difieren únicamente en una sustitución conservadora. Otro indicativo de que dos secuencias de ácido nucleico son sustancialmente idénticas es que las dos moléculas hibridan entre sí sometidas a condiciones rigurosas (p. ej., en un intervalo de rigor medio a alto).

**[0050]** Como se usa en la presente memoria, las proteínas «naturales» y «nativas» son aquellas que se encuentran en la naturaleza. Las expresiones «secuencia natural» y «gen natural» se usan indistintamente en la presente memoria para referirse a una secuencia que es nativa o de origen natural en una célula hospedadora. En algunas formas de realización, la secuencia natural se refiere a una secuencia de interés que es el punto de partida de un proyecto de ingeniería de proteínas. Los genes que codifican la proteína de origen natural pueden obtenerse de acuerdo con los métodos generales conocidos por los expertos en la materia. En general, los métodos comprenden la síntesis de sondas marcadas que presentan secuencias putativas que codifican regiones de la proteína de interés, la preparación de genotecas genómicas a partir de organismos que expresan la proteína y el cribado de las genotecas en busca del gen de interés mediante hibridación con las sondas. A continuación, se mapean y secuencian los clones de hibridación positiva.

**[0051]** Como se usa en la presente memoria, «envase» se refiere a un recipiente capaz de ofrecer una enzima perhidrolasa, un sustrato para la enzima perhidrolasa y una fuente de peróxido de hidrógeno en un formato de fácil manejo y transporte. Envases de ejemplo incluyen cajas, tubos, bidones, barriles, toneles, bolsas o incluso camiones cisterna.

**[0052]** Como se usa en la presente memoria, la expresión «puesta en contacto» se refiere a incubar en la presencia de normalmente una solución acuosa.

**[0053]** Como se usa en la presente memoria, la expresión «modificar una fibra queratinosa» se refiere a cualquier alteración química de una fibra queratinosa que dé como resultado una disminución del fieltro de un tejido que comprende la fibra modificada. Las modificaciones químicas incluyen, sin carácter limitativo, oxidación, formación de ácido cisteico y formación de sales de Bunte.

**[0054]** Como se usa en la presente memoria, los artículos singulares «un», «una», «el», «la» abarcan los referentes plurales a menos que el contexto diga claramente lo contrario.

[0055] Salvo que se especifique lo contrario, las siguientes abreviaturas/siglas tienen los siguientes significados:

	EC	comisión de enzimas
	kDa	kiloDalton
5	PM	peso molecular
	p/v	peso/volumen
	p/p	peso/peso
	v/v	volumen/volumen
10	% p	por ciento en peso
	°C	grados centígrados
	H <sub>2</sub> O	agua
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	peróxido de hidrógeno
	dH <sub>2</sub> O o DI	agua desionizada
	dIH <sub>2</sub> O	agua desionizada, filtración Milli-Q
15	g	gramo
	µg	microgramo
	mg	miligramo
	kg	kilogramo
	lb	libra
20	µL y µl	microlitro
	mL y ml	mililitro
	mm	milímetro
	µm	micrómetro
25	M	molar
	mM	milimolar
	µM	micromolar
	U	unidad
	ppm	partes por millón
30	s	segundo
	min	minuto
	"	pulgadas
	h	hora
	EtOH	etanol
35	eq.	equivalente
	N	normal
	IC	Índice de Color
	CAS	Chemical Abstracts Society

### Compendio

40 [0056] Los presentes métodos se refieren a la modificación química de fibras queratinosas para reducir la cantidad de fieltro de un tejido que comprende dichas fibras. Una característica de los métodos es el tratamiento de fibras queratinosas con perácidos generados enzimáticamente en un medio acuoso, obviando de este modo muchos problemas asociados a métodos convencionales.

45 [0057] En un aspecto, los métodos implican la puesta en contacto de fibras queratinosas, o un tejido elaborado a partir de fibras queratinosas con una composición acuosa que comprende una enzima que presenta actividad perhidrolasa, un sustrato de éster para la enzima y una fuente de peróxido de hidrógeno durante una cantidad de tiempo suficiente para generar perácidos. Conforme se producen los perácidos generados *in situ*, estos modifican las fibras queratinosas en un entorno acuoso, reduciendo de este modo la tendencia a fieltro de un tejido elaborado a partir de fibras queratinosas.

50 [0058] En otro aspecto, los métodos reivindicados comprenden el uso de una composición acuosa que comprende una enzima que presenta actividad perhidrolasa, un sustrato de éster para la enzima y una fuente de peróxido de hidrógeno, para generar perácidos *in situ* en una composición acuosa. A continuación, las fibras queratinosas o un tejido elaborado a partir de fibras queratinosas se ponen en contacto con los perácidos generados *in situ* en condiciones acuosas, en las que los perácidos modifican las fibras y reducen la tendencia a fieltro de un tejido elaborado a partir de fibras queratinosas.

[0059] Se van a describir diversas características y formas de realización preferidas de los métodos.

**Enzima perhidrolasa**

5 [0060] Una característica de los presentes métodos para reducir el fieltado de tejidos elaborados a partir de fibras queratinosas es el uso de una o varias enzimas perhidrolasa. Por lo general, las enzimas perhidrolasa son capaces de generar perácidos a partir de sustratos de éster adecuados en presencia de peróxido de hidrógeno.

10 [0061] En algunas formas de realización, la enzima perhidrolasa es una enzima de origen natural, o una enzima perhidrolasa que comprende, consiste en o consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o incluso un 99,5 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de una enzima perhidrolasa de origen natural. La enzima perhidrolasa puede proceder de una fuente microbiana, como una bacteria u hongo.

15 [0062] En algunas formas de realización, la enzima perhidrolasa es una enzima perhidrolasa *Mycobacterium smegmatis* de origen natural o una variante de esta. Esta enzima, sus propiedades enzimáticas, su estructura, y numerosos homólogos y variantes de esta se describen con detalle en las publicaciones de solicitud de patente internacional WO 05/056782A y WO 08/063400A y las publicaciones de solicitud de patente de los Estados Unidos US2008145353 y US2007167344.

20 [0063] En algunas formas de realización, una enzima perhidrolasa comprende, consiste en o consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:1 o una variante u homólogo de esta. En algunas formas de realización, la enzima perhidrolasa comprende, consiste en o consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 25 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o incluso un 99,5 % idéntica a la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:1.

[0064] La secuencia de aminoácidos de la perhidrolasa *M. smegmatis* se muestra a continuación (SEQ ID NO:1):

MAKRILCFGDSL TWGWVPVEDGAPTERFAPDVRWTGVLAQQLGADFEVIEEGLSAR  
 TTNIDDPTDPR L NGASYLPSCLATHLPLDLVIIMLGTNDTKAYFRRTPLDIALGMSVLVT  
 QVLTSAGGVGTTYPAPKVLVSPPLAPMPHPWFQLIFEGGEQKTT ELARVYSALAS  
 30 FMKVPFFDAGSVISTDGV DGIHFTEANNRDLGVALAEQVRSLL

[0065] En algunas formas de realización, la enzima perhidrolasa puede comprender una o más sustituciones de A en una o varias posiciones de aminoácidos equivalentes a la posición o posiciones en la secuencia de aminoácidos de la perhidrolasa *M. smegmatis* expuesta en la SEQ ID NO: 1. En algunas formas de realización, la enzima perhidrolasa puede comprender una cualquiera o cualquier combinación de sustituciones de aminoácidos seleccionadas de M1, K3, R4, 15, L6, C7, D10, S11, L12, T13, W14, W16, G15, V 17, P 18, V 19, 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, 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.

[0066] En algunas formas de realización, la enzima perhidrolasa puede comprender una o varias de las siguientes sustituciones en una o varias posiciones de aminoácidos equivalentes a la posición o posiciones en la secuencia de aminoácidos de la perhidrolasa *M. smegmatis* expuesta en la SEQ ID NO: 1: 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.

50 [0067] En algunas formas de realización, la enzima perhidrolasa puede comprender una combinación de sustituciones de aminoácidos en posiciones de aminoácidos equivalentes a las posiciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la perhidrolasa *M. smegmatis* expuesta en la SEQ ID NO: 1: 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.

55 [0068] En formas de realización concretas, la enzima perhidrolasa es la variante S54V de la perhidrolasa *M. smegmatis*, que se muestra a continuación (SEQ ID NO: 2; sustitución por S54V subrayada):

MAKRILCFGDSLWTGWVPEVDGAPTERFAPDVRWTGVLAQQLGADFEVIEEGLVAR  
 TTNIDDPTDPRNLNGASYLPSCLATHLPLDLVIIMLGTNDTKAYFRRTPLDIALGMSVLVT  
 QVLTSAGGVGTTYPAPKVLVVSPPPLAPMPHPWFQLIFEGGEQKTELARVYSALAS  
 FMKVPFFDAGSVISTDGVVDGIHFTEANNRDLGVALAEQVRSLL

5 [0069] En algunas formas de realización, la enzima perhidrolasa incluye la sustitución por S54V, pero es de otro modo al menos alrededor de un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o incluso un 99,5 % idéntica a la secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID NOs: 1 o 2.

10 [0070] En algunas formas de realización, la enzima perhidrolasa puede presentar una razón perhidrólisis:hidrólisis de al menos 1. En algunas formas de realización, una enzima perhidrolasa puede presentar una razón perhidrólisis:hidrólisis mayor que 1.

[0071] Por lo general, la cantidad de enzima perhidrolasa no es crucial, y se selecciona para generar una cantidad suficiente de perácidos para modificar las fibras queratinosas del modo descrito.

#### 15 **Sustrato de éster**

[0072] Otra característica de los presentes métodos es el uso de un sustrato de éster para la enzima perhidrolasa para la producción de un perácido en la presencia de peróxido de hidrógeno. Los sustratos adecuados pueden ser monovalentes (es decir, que comprenden una única fracción de éster de ácido carboxílico) o polivalentes (es decir, que comprenden más de una fracción de éster de ácido carboxílico). La cantidad de sustrato necesaria para la generación de perácidos puede ajustarse en función del número de fracciones de éster de ácido carboxílico en la molécula del sustrato.

25 [0073] En algunas formas de realización, el sustrato de éster es un éster de un alcohol o ácido carboxílico alifático y/o aromático. El sustrato de éster puede ser un éster monovalente, divalente o multivalente o una mezcla de estos. Por ejemplo, el sustrato de éster puede ser un ácido carboxílico y un solo alcohol (monovalente, p. ej., etilacetato, propilacetato), dos ácidos carboxílicos y un diol [p. ej., diacetato de propilenglicol (PGDA), diacetato de etilenglicol (EGDA) o una mezcla, por ejemplo, 2-acetiloxi-1-propionato, donde el propilenglicol tiene un éster de acetato sobre el grupo alcohol 2 y un éster de propilo sobre el grupo alcohol 1], o tres ácidos carboxílicos y un triol (p. ej., triacetato de glicerol o una mezcla de acetato/propionato, etc., ligada a glicerol o a otro alcohol multivalente). En algunas formas de realización, el sustrato de éster puede ser un éster de un nitroalcohol (p. ej., 2-nitro-1-propanol). En algunas formas de realización, el sustrato de éster es un éster polimérico, por ejemplo un alcohol policarboxi parcialmente acilado (acetilado, propionilado, etc.), almidón acetilado, etc. En algunas formas de realización, el sustrato de éster puede ser un éster de uno o varios de los siguientes: ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico, ácido butírico, ácido valérico, ácido caproico, ácido caprílico, ácido nonaico, ácido decanoico, ácido dodecanoico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico y ácido oleico. En algunas formas de realización, triacetina, tributirina y otros ésteres sirven de donadores de acilo para la formación de perácidos. En algunas formas de realización, el sustrato de éster es diacetato de propilenglicol, diacetato de etilenglicol o acetato de etilo. En una forma de realización, el sustrato de éster es diacetato de propilenglicol.

[0074] Por lo general, la cantidad de sustrato de éster no es crucial, y se selecciona para generar una cantidad suficiente de perácidos para modificar las fibras queratinosas del modo descrito.

#### 45 **Fuente de peróxido de hidrógeno**

[0075] Otra característica de los presentes métodos es el uso de una fuente de peróxido de hidrógeno. Por lo general, el peróxido de hidrógeno puede venir provisto directamente o generado continuamente por medios químicos, electroquímicos y/o enzimáticos.

50 [0076] En algunas formas de realización, la fuente de peróxido de hidrógeno puede ser peróxido de hidrógeno en sí mismo. En algunas formas de realización, la fuente de peróxido de hidrógeno puede ser un compuesto que genere peróxido de hidrógeno tras la adición de agua. El compuesto puede ser un compuesto sólido. Dichos compuestos incluyen aductos de peróxido de hidrógeno con diversos compuestos inorgánicos y orgánicos, de los cuales el más empleado es carbonato de sodio por hidrato, también denominado percarbonato de sodio.

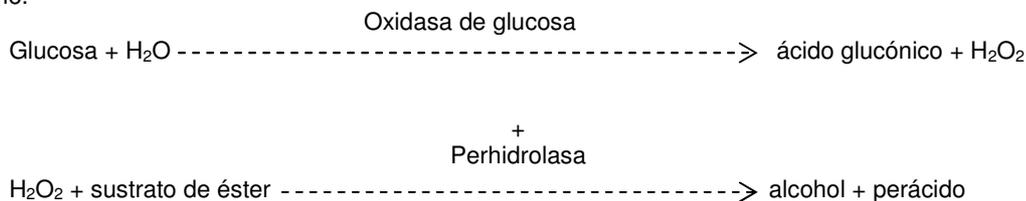
55 [0077] En algunas formas de realización, la fuente de peróxido de hidrógeno puede ser una sal perhidratada inorgánica. Ejemplos de sales perhidratadas inorgánicas son sales de perborato, percarbonato, perfosfato, persulfato y persilicato. Las sales perhidratadas inorgánicas son normalmente sales de metal alcalino.

**[0078]** Las fuentes de peróxido de hidrógeno adicionales incluyen aductos de peróxido de hidrógeno con zeolitas, o peróxido de hidrógeno de urea.

**[0079]** La fuente de peróxido de hidrógeno puede estar en forma cristalina y/o en forma sustancialmente sólida y pura sin protección adicional. Para determinadas sales perhidratadas, las formas preferidas son composiciones granuladas que implican un recubrimiento, lo que ofrece una mejor estabilidad en el almacenamiento para la sal perhidratada del producto granulado. Los recubrimientos adecuados comprenden sales inorgánicas como sales de silicato, carbonato o borato de metal alcalino o mezclas de estas, o materiales orgánicos como ceras, aceites o jabones grasos.

**[0080]** En algunas formas de realización, la fuente de peróxido de hidrógeno puede ser un sistema de generación enzimática de peróxido de hidrógeno. En una forma de realización, el sistema de generación enzimática de peróxido de hidrógeno puede comprender una oxidasa y su sustrato. Las enzimas de oxidasa adecuadas incluyen, sin carácter limitativo: oxidasa de glucosa, oxidasa de sorbitol, oxidasa de hexosa, oxidasa de colina, oxidasa de alcohol, oxidasa de glicerol, oxidasa de colesterol, oxidasa de piranosas, oxidasa de carboxialcohol, oxidasa de L-aminoácido, oxidasa de glicina, oxidasa de piruvato, oxidasa de glutamato, oxidasa de sarcosina, oxidasa de lisina, oxidasa de lactato, oxidasa de vanillil, oxidasa de glicolato, oxidasa de galactosa, uricasa, oxidasa de oxalato y oxidasa de xantina.

**[0081]** La siguiente ecuación ofrece un ejemplo de un sistema asociado de producción enzimática de peróxido de hidrógeno.



**[0082]** No se pretende que la generación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  se limite a una enzima específica, puesto que se puede usar cualquier enzima que genere  $\text{H}_2\text{O}_2$  con un sustrato adecuado. Por ejemplo, se pueden usar las oxidasas de lactato procedentes de la especie *Lactobacillus*, conocidas por crear  $\text{H}_2\text{O}_2$  a partir de ácido láctico y oxígeno. Una ventaja de una reacción de este tipo es la generación enzimática de ácido (p. ej., ácido glucónico en el ejemplo anterior), que reduce el pH de una solución acuosa básica al intervalo de pH en el que el perácido resulta más eficaz en el blanqueo (es decir, en o por encima del pKa). Dicha reducción en el pH también la ocasiona directamente la producción de perácido. También se pueden usar otras enzimas (p. ej., oxidasa de alcohol, oxidasa de etilenglicol, oxidasa de glicerol, oxidasa de aminoácido, etc.) que sean capaces de generar peróxido de hidrógeno con sustratos de éster en combinación con una enzima perhidrolasa para generar perácidos.

**[0083]** En los casos en que el peróxido de hidrógeno se genere electroquímicamente, puede producirse, por ejemplo, mediante una celda de combustible provista de gas de oxígeno e hidrógeno.

**[0084]** Por lo general, la cantidad de peróxido de hidrógeno no es crucial, y se selecciona para generar una cantidad suficiente de perácidos para modificar las fibras queratinosas del modo descrito. Tras el tratamiento de las fibras queratinosas, puede ser deseable en algunas circunstancias usar una enzima catalasa para destruir el peróxido de hidrógeno residual.

### **Fibras y tejidos**

**[0085]** Las fibras queratinosas adecuadas para el tratamiento del modo descrito incluyen tanto fibras de origen natural como fibras sintéticas que comprenden polipéptidos clasificados como queratinas, una familia de proteínas estructurales fibrosas que se encuentran principalmente en las células animales. Las queratinas son ricas en cisteína, puesto que los puentes de disulfuro entre residuos de cisteína son importantes para la integridad estructural global de las fibras queratinosas. Los productos naturales que comprenden fibras queratinosas incluyen, sin carácter limitativo, lana, pelo, pelaje, uñas, cuernos, pezuñas, plumas y piel. En algunos casos, la queratina comprende la mayoría del peso en seco de dichos materiales. Aunque las fibras queratinosas se obtienen por lo general de fuentes naturales, no existe nada en la presente descripción que pueda interpretarse como que excluye el uso de fibras queratinosas elaboradas a partir de proteína de queratina extraída o incluso de proteína de queratina recombinante.

**[0086]** La expresión «lana» se usa a menudo para referirse únicamente a las fibras queratinosas procedentes de células de la piel especializadas (denominadas folículos) de ovinos. Sin embargo, la expresión «lana» también se usa para referirse de manera más general a fibras queratinosas procedentes de animales de la familia de los *Caprinae*, incluyendo ovejas, cabras, camellos y conejos. La lana procedente de las cabras también se conoce

como cachemira y mohair; la lana de los camellos también se conoce como vicuña y alpaca, y la lana de los conejos también se conoce como angora. Los presentes métodos son de utilidad para tratar la lana en general, aunque se ejemplifican mediante lana de oveja.

5 **[0087]** Las fibras queratinosas pueden tratarse antes de su incorporación a un textil, tras su incorporación a un hilo, tejido, textil o prenda, o en ambos casos. Dicho tratamiento puede realizarse en medios acuosos en tandas o de forma continua. Los tejidos que comprenden fibras queratinosas pueden mezclarse con otras fibras, incluyendo otras fibras naturales o sintéticas. Las fibras ejemplares incluyen, sin carácter limitativo, algodón, lino, poliéster, poliamida, cáñamo y similares.

10 *Colorantes*

15 **[0088]** Una característica de los presentes métodos es la capacidad de aumentar la captación de colorante mediante fibras queratinosas o un tejido elaborado a partir de estas. Ejemplos de colorantes adecuados incluyen, sin carácter limitativo, colorantes azoicos, monoazoicos, disazoicos, nitro, de xanteno, quinolina, antraquinona, triarilmetano, paraazoanilina, azinaoxazina, estilbena, anilina y ftalocianina, o mezclas de estos. El colorante puede ser un colorante azoico (p. ej., Reactive Black 5 (ácido 2,7-naftalenodisulfónico, 4-amino-5-hidroxi-3,6-bis(sal (4-((2-(sulfooxi)etil)sulfonil)fenil)azo)-tetrasódica), Reactive Violet 5, amarillo de metilo, rojo Congo, etc.), un colorante de antraquinona (p. ej., azul remazol), índigo (carmín de índigo), un colorante de triarilmetano/paraazoanilina (p. ej., cristal violeta, verde malaquita) o un colorante a base de azufre. El colorante puede ser un colorante reactivo, directo, disperso o pigmentario. El colorante puede ser un componente de una tinta.

25 *Medio acuoso*

30 **[0089]** Una característica de los presentes métodos es que las fibras queratinosas, o los tejidos elaborados a partir de fibras queratinosas, son tratados con perácidos generados enzimáticamente en medios acuosos. Un medio acuoso es una solución o mezcla de solución/suspensión en la que el disolvente primario es agua. Esta característica distingue con facilidad los presentes métodos del tratamiento convencional con perácidos de las fibras queratinosas, el cual se realizó en disolventes sustancialmente inorgánicos (véase, p. ej., la patente de los Estados Unidos n.º 3.634.020). Aunque por lo general se toleran pequeñas cantidades de dichos disolventes en los presentes métodos, no son necesarios. Por consiguiente, el medio acuoso puede estar libre por completo de disolventes orgánicos, o puede contener menos de un 5 %, menos de un 4 %, menos de un 3 %, menos de un 2 %, menos de un 1 %, menos de un 0,7 %, menos de un 0,5 %, menos de un 0,2 % o incluso menos de un 0,1 % de disolventes orgánicos.

40 **[0090]** Los medios acuosos pueden incluir cualquier número de tampones, tensioactivos, sales, lubricantes, aglomerantes, adyuvantes, polímeros, agentes quelantes, agentes complejantes, agentes antiincrustantes, colorantes y similares. Los medios acuosos pueden incluir además enzimas, sustratos, cofactores, promotores, etc., adicionales para dichas enzimas. Sin embargo, en algunas formas de realización, el medio acuoso puede no incluir expresamente cantidades significativas de proteasas y/o peroxidasas. Los medios acuosos adecuados son los usados para el procesamiento de los textiles, lo que normalmente incluye tampones, sales y, de manera opcional, tensioactivos.

45 *Tratamiento con sulfito de sodio*

50 **[0091]** En algunas formas de realización de los presentes métodos, las fibras queratinosas, o los textiles que comprenden dichas fibras, son tratados de manera adicional con sulfito de sodio. El tratamiento con sulfito de sodio (u otras sales de sulfito) es conocido por provocar la formación de sales de Bunte con residuos de cisteína oxidada. Los métodos convencionales de formación de sales de Bunte dependen del tratamiento de las fibras queratinosas con un potente agente oxidante, como por ejemplo ácido peracético, permanganato, persulfato, peróxido de hidrógeno y similares, seguido de un tratamiento con sulfito de sodio.

55 **[0092]** En algunas formas de realización de los presentes métodos, las fibras queratinosas o los tejidos que comprenden fibras queratinosas son tratados primero con perácidos generados enzimáticamente en un medio acuoso, seguido de un tratamiento con sulfito de sodio. Como se ejemplifica, el tratamiento de la presente memoria con perácido enzimáticamente en un medio acuoso seguido de un tratamiento con sulfito de sodio dio como resultado un fieltro aún menor que el del tratamiento solamente con perácido enzimáticamente.

60 *Tratamiento con transglutaminasa*

65 **[0093]** En algunas formas de realización de los presentes métodos, se usa una transglutaminasa para reticular fibras queratinosas tratadas con perácidos generados enzimáticamente o tratadas con perácidos generados enzimáticamente y sulfito de sodio, o textiles que comprenden dichas fibras. Dicho tratamiento se describe con detalle en, por ejemplo, Cortez *et al.* (2004) *Enzyme and Microbial Technology* 34:64-72. El tratamiento con

transglutaminasa puede aumentar la resistencia de la lana o de otros textiles elaborados a partir de fibras queratinosas, o restaurar la resistencia perdida durante el tratamiento con perácidos generados enzimáticamente.

5 [0094] Estos y otros aspectos y formas de realización del presente método se pondrán de manifiesto para el experto en la materia a la vista de la presente descripción. Los siguientes ejemplos pretenden ilustrar adicionalmente, pero no limitar, los métodos.

## EJEMPLOS

### 10 Ejemplo 1: cambio de la morfología de las fibras de lana tratadas enzimáticamente

[0095] Se incubaron 50 mg de fibras de lana al 100 % (es decir, «lana peinada») en un volumen de reacción de 2 ml a 65 °C en un tubo de vidrio con agitación lenta durante una hora. Las condiciones de incubación fueron las siguientes:

15

- 1) Tampón (tampón de fosfato de sodio 100 Mm, pH 7),
- 2) Tampón + 5 µl/ml de PGDA + 5 µl/ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (p/p al 50 %), o
- 3) Tampón + 5 µl/ml de PGDA + 5 µl/ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (p/p al 50 %) + 0,8 ppm de enzima perhidrolasa.

20 [0096] La enzima perhidrolasa concreta usada fue la variante S54V de la perhidrolasa *M. smegmatis* (también denominada «arilesterasa»). Las fibras de lana se enjuagaron con agua DI 3 veces tras el tratamiento, y después se secaron al aire. La morfología de las fibras de lana tratadas se evaluó por medio del microscopio de barrido electrónico Phenom de FEI.

25 [0097] El tratamiento de las fibras de lana con tampón + PGDA + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 2) no produjo cambios significativos en las morfologías de las escamas de la lana en comparación con el tratamiento solo con tampón (Figura 1). Sin embargo, la adición de enzima perhidrolasa dio lugar a una eliminación significativa de escamas de la lana (Figura 3).

30 [0098] Los cambios químicos de las fibras de lana como resultado de los diferentes tratamientos fueron controlados mediante una espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier en el modo de reflexión total atenuada (FTIR/ATR). Las fibras de lana sólidas se colocaron directamente sobre el accesorio MIRacle ATR sujeto al Tensometer 27 (Brucker Optics) para obtener espectros tras los diferentes tratamientos. Como se muestra en la Figura 4, unos grandes aumentos del espectro a aproximadamente 1040 cm<sup>-1</sup> y 1170 cm<sup>-1</sup> indican un aumento de los niveles de ácido cisteico (producto de oxidación de la cisteína) tras el tratamiento con la enzima perhidrolasa (Figura 4).

35

[0099] Estos resultados sugieren que el tratamiento con la enzima perhidrolasa reduce el escamado superficial de las fibras de lana, posiblemente como consecuencia del residuo de cisteína oxidante existente en las proteínas de la lana.

40

### Ejemplo 2: cambio de la afinidad por el colorante de fibras de lana tratadas enzimáticamente

[0100] Se mancharon 50 mg de fibras de lana tratadas (véase Ejemplo 1) con Shirlastain A (combinación de ácido pícrico, G150 Blue Chlorazol y 3BS Crocein Scarlet) a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se observó un aumento significativo de la afinidad por el colorante mediante Shirlastain A en las fibras de lana tratadas con la enzima perhidrolasa (Figura 5). Mientras que las fibras de lana tratadas con tampón o tampón + PGDA + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se tiñeron de un color naranja medio, las fibras de lana tratadas con tampón o tampón + PGDA + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + enzima perhidrolasa se tiñeron de un color rojo intenso. Estos resultados demuestran que el tratamiento de las fibras de lana con la enzima perhidrolasa aumenta la captación de colorante.

45

50

### Ejemplo 3: reducción del encogimiento del tejido de lana tratado en un Launder-O-meter

[0101] Se incubaron 3 muestras de jersey de lana al 100 % cada una (dimensiones 5" x 5" (12,7 cm x 12,7 cm); estilo 532 de Testfabrics) en un volumen de reacción de 300 ml (proporciones del baño = 32:1) en un Launder-O-meter durante una hora a 65 °C sometidas a una de las siguientes condiciones (n=3):

55

- 1) Tampón (tampón de fosfato de sodio 100 Mm, pH 7),
- 2) Tampón + 5 µl/ml de PGDA + 5 µl/ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (p/p al 50 %), o
- 3) Tampón + 5 µl/ml de PGDA + 5 µl/ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (p/p al 50 %) + 0,8 ppm de enzima perhidrolasa

60

[0102] Los resultados representativos se muestran en la Figura 6. Las muestras tratadas con enzima perhidrolasa mostraron un encogimiento significativamente menor en comparación con las muestras tratadas solo con tampón o con tampón + PGDA + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Estos resultados demuestran que el tratamiento de las fibras de lana con enzima perhidrolasa disminuye el encogimiento en condiciones de lavado.

65

**Ejemplo 4: reducción del encogimiento del tejido de lana tratado en un Unimac**

[0103] Se trataron 5 muestras de lana al 100 % de punto interlock cada una (Britannia Mills LTD, estilo 7061) en un volumen de reacción de 30 L (proporciones del baño = alrededor de 51:1) en un Unimac (es decir, lavador de tambor de laboratorio de 50 libras (22, 67 kg)) durante una hora a 60 °C con una agitación muy suave (7 RPM) sometidas a una de las siguientes condiciones (n=5):

- 1) Tampón + 5 ml/L de PGDA + 5 ml/L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (p/p al 50 %)
- 2) Tampón + 5 ml/L de PGDA + 5 ml/L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (p/p al 50 %) + 0,8 ppm de enzima perhidrolasa

[0104] El tampón fue un tampón de fosfato de sodio 100 mM (pH 7) con 0,05 ml/L de Triton X-100 (p/p al 10 %) añadido como agente humectante. Antes del tratamiento, cada muestra de tejido (30 cm x 40 cm; el lado más largo en el sentido de la máquina) se marcó con pequeños nudos de hilo de algodón/poliéster como se muestra en la Figura 7. Estas marcas sirvieron de puntos de referencia para facilitar la medición del encogimiento tras la simulación de lavado.

[0105] Tras el lavado, las muestras de lana se sometieron a tres ciclos de enjuague (entrada de agua) y luego se secaron al aire en posición horizontal antes de realizar ensayos de encogimiento por fieltado. Las muestras representativas se muestran en la Figura 8. Las muestras tratadas con la enzima perhidrolasa fueron más grandes que las muestras de control tras el lavado, lo que demostró que el tratamiento con la enzima perhidrolasa redujo el encogimiento de la lana, incluso en un lavador con capacidad de 50 libras (22,67 kg).

[0106] Las micrografías electrónicas de barrido de las muestras de control y las tratadas con enzima perhidrolasa se muestran en las Figuras 9 y 10, respectivamente. Las fibras de las muestras tratadas con enzima perhidrolasa mostraron una morfología significativamente alterada (p. ej., reducción del escamado) en comparación con las fibras de las muestras de control. El análisis FTIR/ATR de las fibras sin tratar, fibras a partir de muestras tratadas con tampón + PGDA + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y fibras a partir de muestras tratadas con tampón + PGDA + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + enzima perhidrolasa mostró de nuevo una modificación resultante del tratamiento con enzima perhidrolasa.

[0107] El encogimiento por relajación de las muestras de lana de punto interlock de control y las tratadas con enzima perhidrolasa se midió de acuerdo con el método IWS TM 31, 1 X7A y el encogimiento por fieltado se midió de acuerdo con los métodos IWS TM 31, 5X5A modificados. Para los tratamientos se usó el Unimac (Modelo UY230, máquina de tinte de tambor de laboratorio de 50 libras (22,67 kg) con microprocesador).

[0108] Las muestras tratadas se secaron en posición horizontal y el porcentaje de encogimiento se calculó en función del método enumerado en IWS TM31. Estos cálculos de encogimiento se encuentran resumidos a continuación:

Cálculos de encogimiento:

[0109]

$$\text{Encogimiento por relajación (\%)} = \{(M.O.-M.R.)/M.O.\} \times 100$$

$$\text{Encogimiento por fieltado (\%)} = \{(M.R.-M.F.)/M.R.\} \times 100$$

Donde:

- M.O. = Medidas originales
- M.R. = Medidas de relajación
- M.F. = Medidas de fieltado

[0110] Como se muestra en la tabla de la Figura 13, los tejidos de lana tratados con enzima perhidrolasa mostraron un fieltado y una zona de encogimiento drásticamente menores en comparación con el tratamiento de control sin tratamiento con enzima perhidrolasa. El número negativo indica que, de hecho, el tejido aumentó de largo tras el tratamiento.

**Ejemplo 5: tratamiento enzimático combinado con tratamiento con sulfito de sodio en un tejido de lana**

[0111] Se trataron 4 muestras de jersey de lana al 100 % cada una (29" x 24" (73,66 cm x 60,96 cm); Testfabrics, estilo 532) en un volumen de reacción de 30 L (proporciones del baño = alrededor de 75:1) en un lavador de tambor Unimac de 50 libras (22,67 kg) durante 1 hora a 65 °C con una agitación muy suave (7 RPM) sometidas a las siguientes condiciones (n=4):

- 1) Tampón + 5 ml/L de PGDA + 5ml/L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (p/p al 50 %)

2) Tampón + 5 ml/L de PGDA + 5 ml/L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (p/p al 50 %) + 0,8 ppm de enzima perhidrolasa.

[0112] El tampón fue un tampón de fosfato de sodio 100 mM (pH 7) con 0,05 ml/L de Triton X-100 (p/p al 10 %) añadido como agente humectante. En cada muestra de tejido se marcaron rectángulos de 30 cm x 40 cm (el lado más largo en el sentido de la máquina) con pequeños nudos de hilo de algodón/poliéster, como se ilustra en la Figura 7.

[0113] Tras el tratamiento, se realizaron tres enjuagues y las muestras se secaron en posición horizontal. Las muestras de control y las tratadas enzimáticamente, además de dos muestras de jersey adicionales sin tratar, se incubaron con 4g/L de sulfito de sodio (junto con los dos tejidos de jersey sin tratar como controles) a 40 °C y pH 7 (fosfato de sodio 50 mM) durante una hora en el Unimac. Tras el tratamiento con sulfito de sodio, las muestras se enjuagaron tres veces y después se secaron al aire en posición horizontal antes de llevar a cabo ensayos de encogimiento por fieltado. Para determinar el encogimiento por fieltado, se lavaron los tejidos de jersey de lana con tratamientos diferentes de acuerdo con el IWS TM 31 (5x5A).

[0114] La Figura 12 muestra los espectros FTIR/ATR de un tejido de jersey de lana tratado (1) sin enzima (es decir, solo PGDA + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), (2) con arilesterasa, (3) con sulfito de sodio, (4) sin enzima seguida de sulfito de sodio y (4) con arilesterasa seguida de sulfito de sodio. Se observó la aparición de un nuevo máximo a alrededor de 1023 cm<sup>-1</sup> usando muestras tratadas con sulfito de sodio, lo que indicó la formación de sales de Bunte. Como antes, las señales a 1040 cm<sup>-1</sup> y 1170 cm<sup>-1</sup> son resultado del tratamiento con arilesterasa.

[0115] Como se muestra en la tabla de la Figura 13, los tejidos tratados tanto con arilesterasa como con arilesterasa + sulfito de sodio mostraron una reducción significativa del encogimiento por fieltado en comparación con otras muestras de tejidos tratadas. Estos resultados demuestran que la combinación de un tratamiento con arilesterasa y un tratamiento con sulfito de sodio produce un tejido que presenta un encogimiento aún menor y un tacto más suave en comparación con el tratamiento con arilesterasa solo.

#### LISTADO DE SECUENCIAS

#### [0116]

<110> Danisco US Inc. Yoon, Mee-Young

<120> Tratamiento de fibras queratinosas con una enzima que presenta actividad perhidrolasa

<130> 31505WO

<140> PCT/US2011/026613

< 141> 01-03-2011

<150> US 61/317.915

< 151> 26-03-2010

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

< 211> 216

< 212> PRT

< 213> Mycobacterium smegmatis

<400> 1

ES 2 543 106 T3

```

Met Ala Lys Arg Ile Leu Cys Phe Gly Asp Ser Leu Thr Trp Gly Trp
1      5      10      15
Val Pro Val Glu Asp Gly Ala Pro Thr Glu Arg Phe Ala Pro Asp Val
20      25      30
Arg Trp Thr Gly Val Leu Ala Gln Gln Leu Gly Ala Asp Phe Glu Val
35      40      45
Ile Glu Glu Gly Leu Ser Ala Arg Thr Thr Asn Ile Asp Asp Pro Thr
50      55      60
Asp Pro Arg Leu Asn Gly Ala Ser Tyr Leu Pro Ser Cys Leu Ala Thr
65      70      75      80
His Leu Pro Leu Asp Leu Val Ile Ile Met Leu Gly Thr Asn Asp Thr
85      90      95
Lys Ala Tyr Phe Arg Arg Thr Pro Leu Asp Ile Ala Leu Gly Met Ser
100      105      110
Val Leu Val Thr Gln Val Leu Thr Ser Ala Gly Gly Val Gly Thr Thr
115      120      125
Tyr Pro Ala Pro Lys Val Leu Val Val Ser Pro Pro Pro Leu Ala Pro
130      135      140
Met Pro His Pro Trp Phe Gln Leu Ile Phe Glu Gly Gly Glu Gln Lys
145      150      155      160
Thr Thr Glu Leu Ala Arg Val Tyr Ser Ala Leu Ala Ser Phe Met Lys
165      170      175
Val Pro Phe Phe Asp Ala Gly Ser Val Ile Ser Thr Asp Gly Val Asp
180      185      190
Gly Ile His Phe Thr Glu Ala Asn Asn Arg Asp Leu Gly Val Ala Leu
195      200      205
Ala Glu Gln Val Arg Ser Leu Leu
210      215

```

<210> 2

< 211> 216

5 < 212> PRT

< 213> Mycobacterium smegmatis

<400> 2

```

10 Met Ala Lys Arg Ile Leu Cys Phe Gly Asp Ser Leu Thr Trp Gly Trp
1      5      10      15
Val Pro Val Glu Asp Gly Ala Pro Thr Glu Arg Phe Ala Pro Asp Val
20      25      30
Arg Trp Thr Gly Val Leu Ala Gln Gln Leu Gly Ala Asp Phe Glu Val
35      40      45
Ile Glu Glu Gly Leu Val Ala Arg Thr Thr Asn Ile Asp Asp Pro Thr
50      55      60
Asp Pro Arg Leu Asn Gly Ala Ser Tyr Leu Pro Ser Cys Leu Ala Thr
65      70      75      80
His Leu Pro Leu Asp Leu Val Ile Ile Met Leu Gly Thr Asn Asp Thr
85      90      95
Lys Ala Tyr Phe Arg Arg Thr Pro Leu Asp Ile Ala Leu Gly Met Ser
100      105      110
Val Leu Val Thr Gln Val Leu Thr Ser Ala Gly Gly Val Gly Thr Thr
115      120      125
Tyr Pro Ala Pro Lys Val Leu Val Val Ser Pro Pro Pro Leu Ala Pro
130      135      140
Met Pro His Pro Trp Phe Gln Leu Ile Phe Glu Gly Gly Glu Gln Lys
145      150      155      160
Thr Thr Glu Leu Ala Arg Val Tyr Ser Ala Leu Ala Ser Phe Met Lys
165      170      175
Val Pro Phe Phe Asp Ala Gly Ser Val Ile Ser Thr Asp Gly Val Asp
180      185      190
Gly Ile His Phe Thr Glu Ala Asn Asn Arg Asp Leu Gly Val Ala Leu
195      200      205
Ala Glu Gln Val Arg Ser Leu Leu
210      215

```

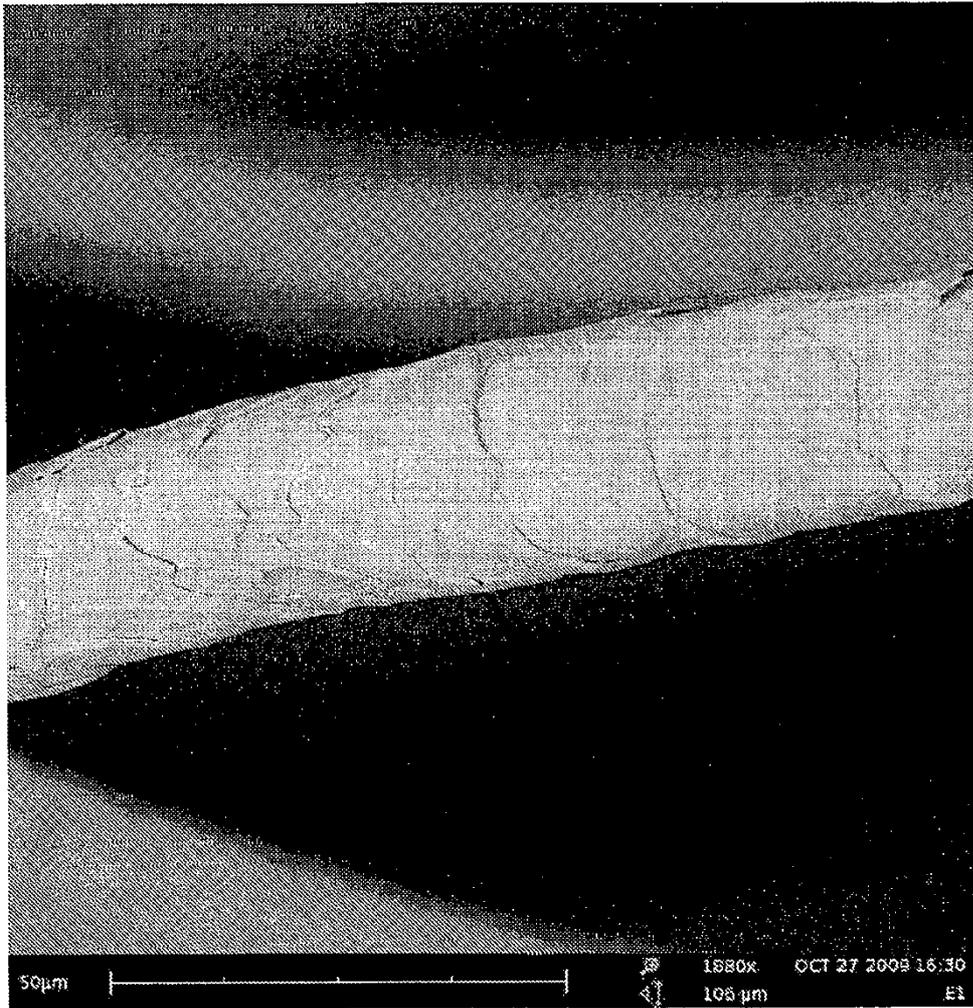
**REIVINDICACIONES**

1. Método para reducir el fieltrado de la lana o de otro textil elaborado a partir de fibras queratinosas, comprendiendo el método:
 

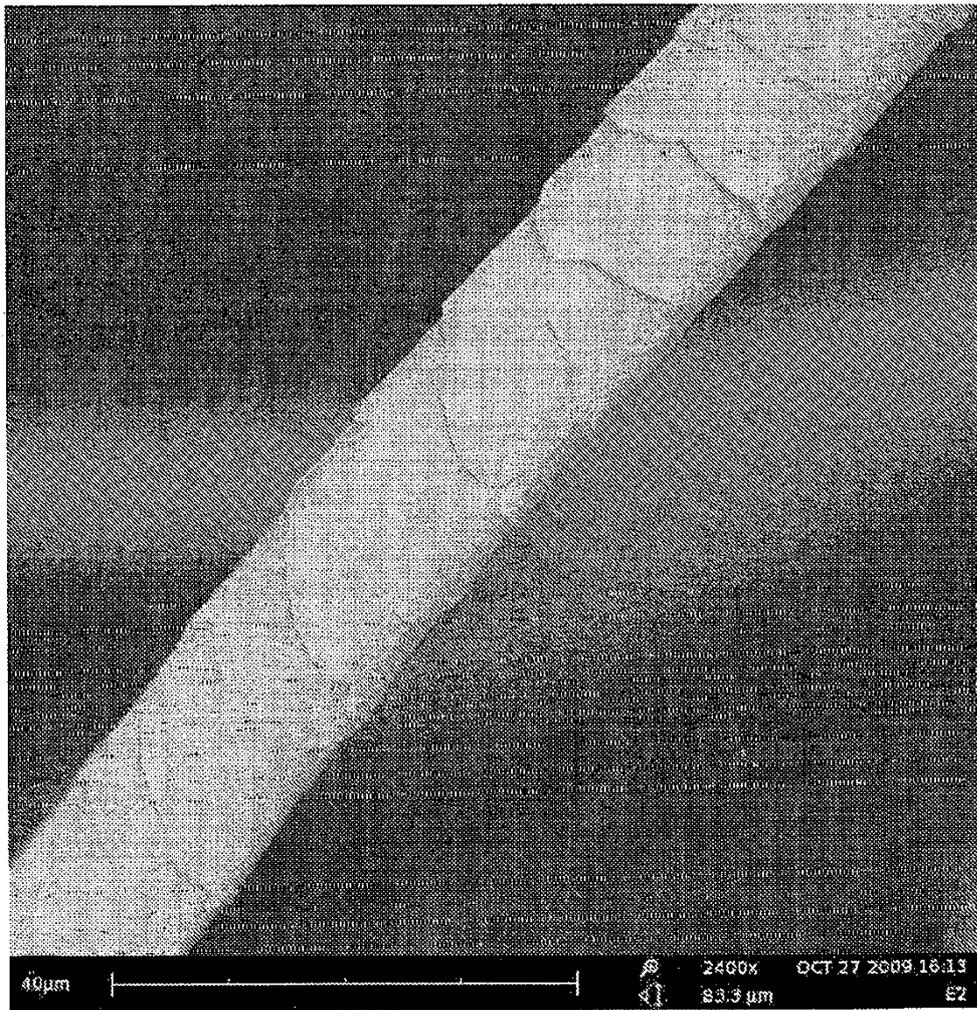
5                    la puesta en contacto del textil con una composición acuosa que comprende una enzima que presenta actividad perhidrolasa, un sustrato de éster para la enzima y una fuente de peróxido de hidrógeno, en el que la enzima genera perácidos *in situ* en un medio acuoso, y en el que los perácidos modifican el textil, reduciendo de este modo la tendencia del textil a fieltrarse.
2. Método según la reivindicación 1, en el que la enzima genera perácidos *in situ* antes de poner en contacto el textil con la composición acuosa.
3. Método según la reivindicación 1, en el que la puesta en contacto del textil con la composición acuosa se produce antes de que la enzima genere perácidos *in situ*.
4. Método según la reivindicación 1, en el que la puesta en contacto del textil con la composición acuosa y la generación de perácidos *in situ* por parte de la enzima se producen simultáneamente.
- 20 5. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el textil es lana.
6. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las fibras queratinosas se obtienen a partir de ovinos.
- 25 7. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la enzima que presenta actividad perhidrolasa es un polipéptido que presenta una secuencia de aminoácidos que es al menos un 70 % idéntica a la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:1 o la SEQ ID NO:2.
- 30 8. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la enzima que presenta actividad perhidrolasa es un polipéptido que presenta una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80 % idéntica a la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:1 o la SEQ ID NO:2.
9. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la enzima que presenta actividad perhidrolasa es un polipéptido que presenta una secuencia de aminoácidos que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:1 o la SEQ ID NO:2.
- 35 10. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la enzima que presenta actividad perhidrolasa procede de la perhidrolasa *Mycobacterium smegmatis*.
- 40 11. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la enzima que presenta actividad perhidrolasa es una variante de la perhidrolasa *Mycobacterium smegmatis* que presenta la sustitución S54V.
12. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el sustrato de éster es diacetato de propilenglicol (PGDA), triacetina, acetato de etilo, tributirina y/o diacetato de etilenglicol (EGDA).
- 45 13. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la fuente de peróxido de hidrógeno es peróxido de hidrógeno, perborato o percarbonato.
14. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, comprendiendo además la etapa de:
 

50                    tratamiento de la fibra queratinosa o de los textiles que comprenden la fibra queratinosa con sulfito de sodio para reducir más el fieltrado de los textiles.
- 55 15. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, comprendiendo además la etapa de:
 

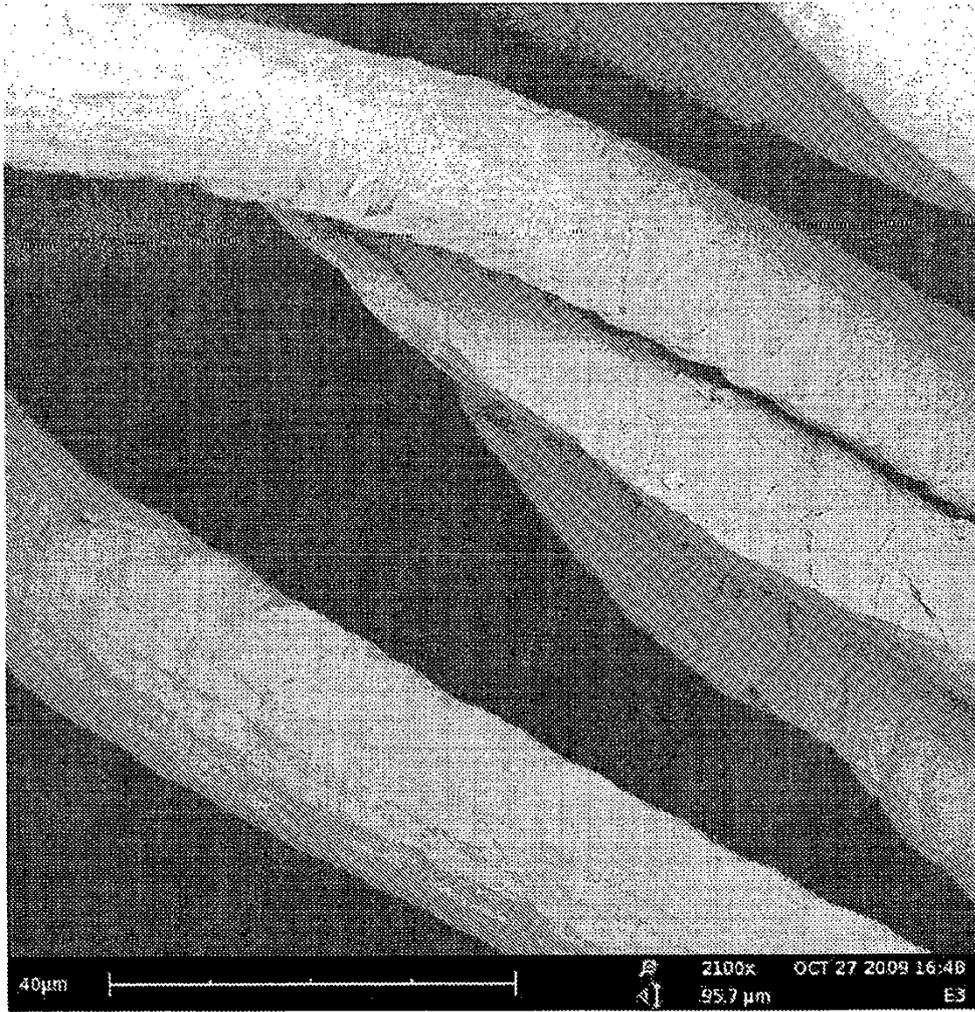
                         tratamiento de la fibra queratinosa o de los textiles que comprenden la fibra queratinosa con transglutaminasa para mejorar la resistencia textil.



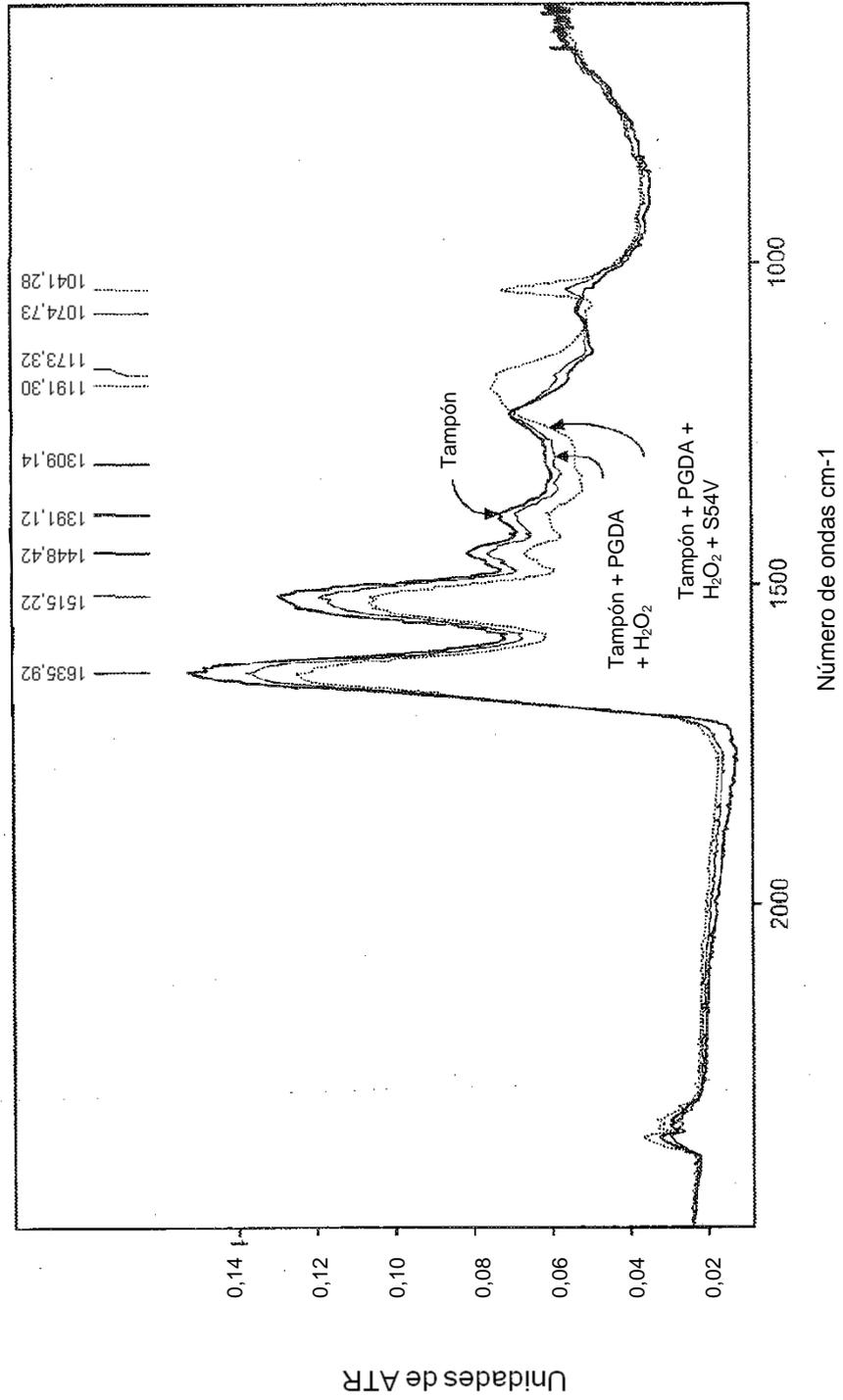
**FIG. 1**



**FIG. 2**

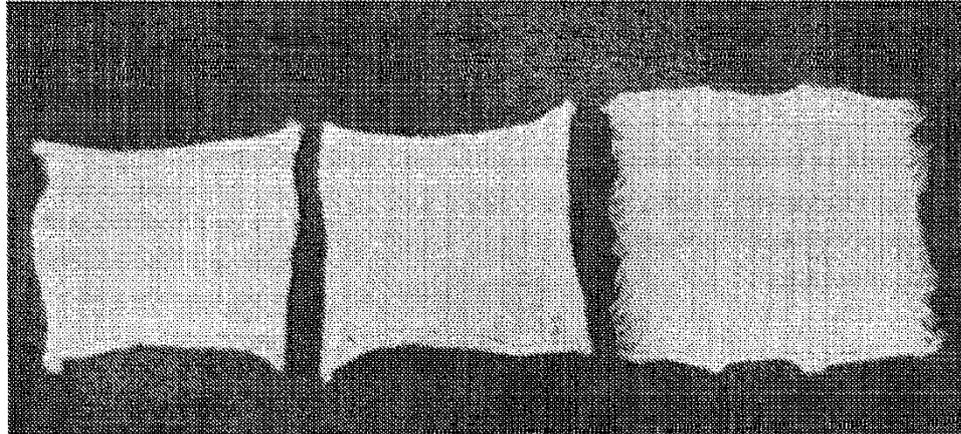


**FIG. 3**



**FIG. 4**



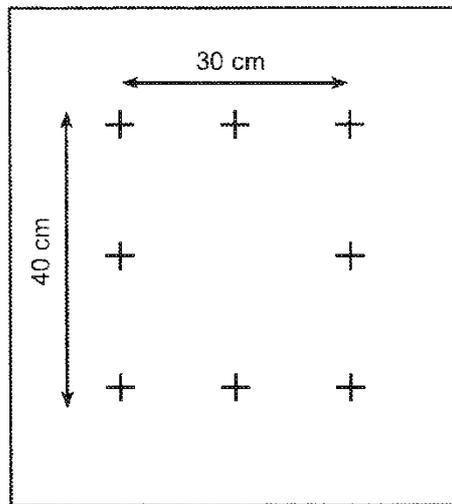


Tampón

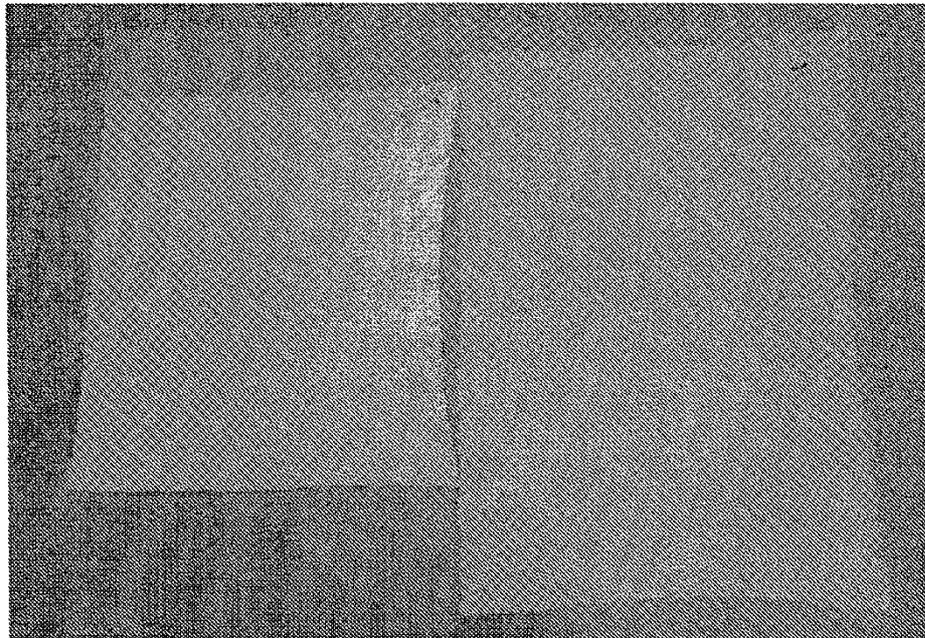
Tampón + PGDA + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Tampón + PGDA +  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + arilesterasa

**FIG. 6**



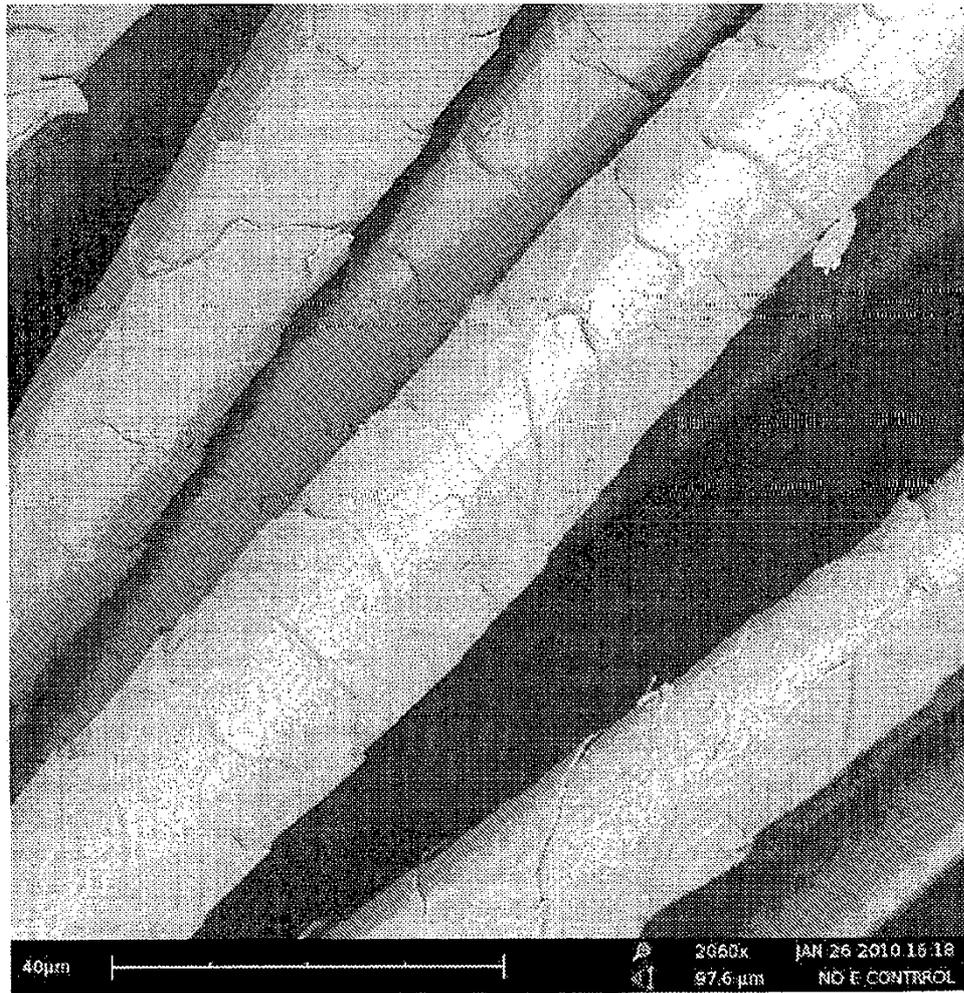
**FIG. 7**



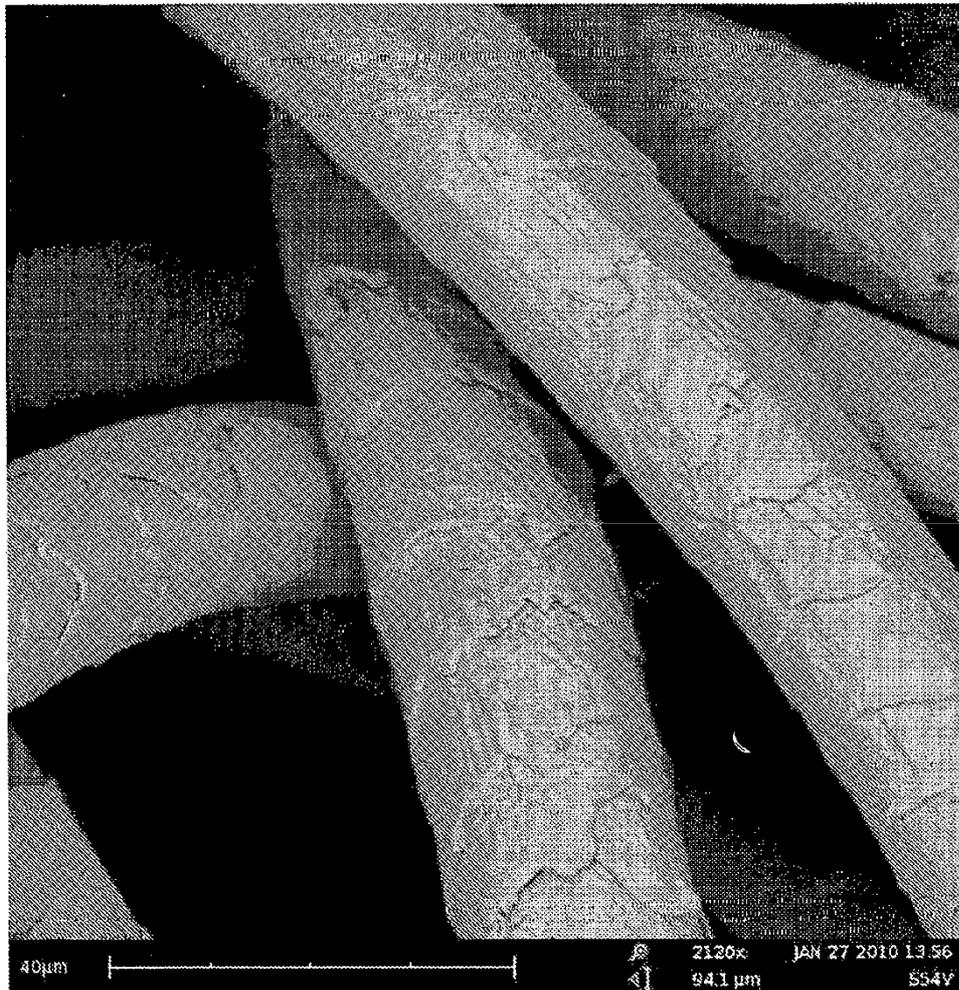
Sin control de enzimas

Tratada con arilesterasa

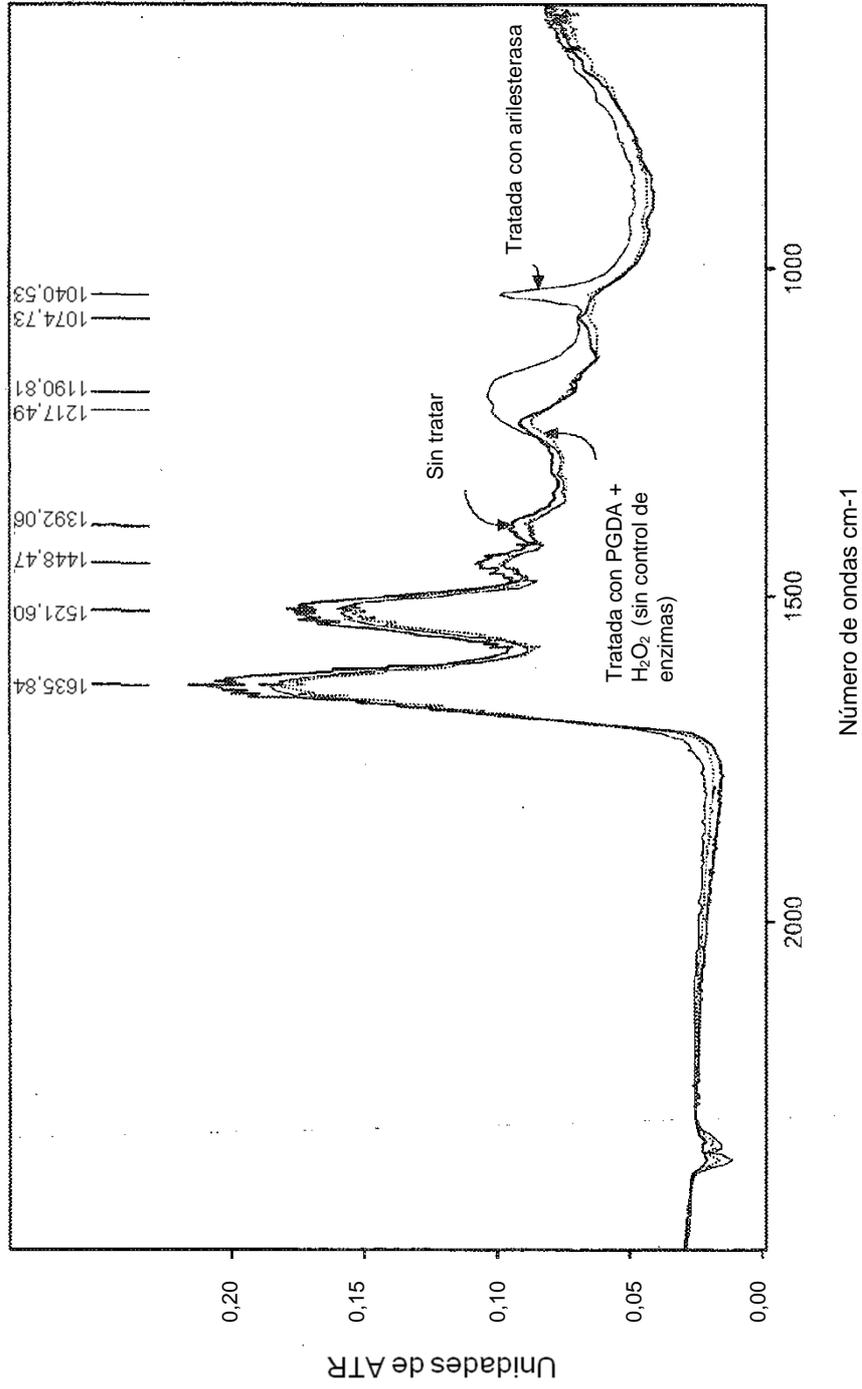
**FIG. 8**



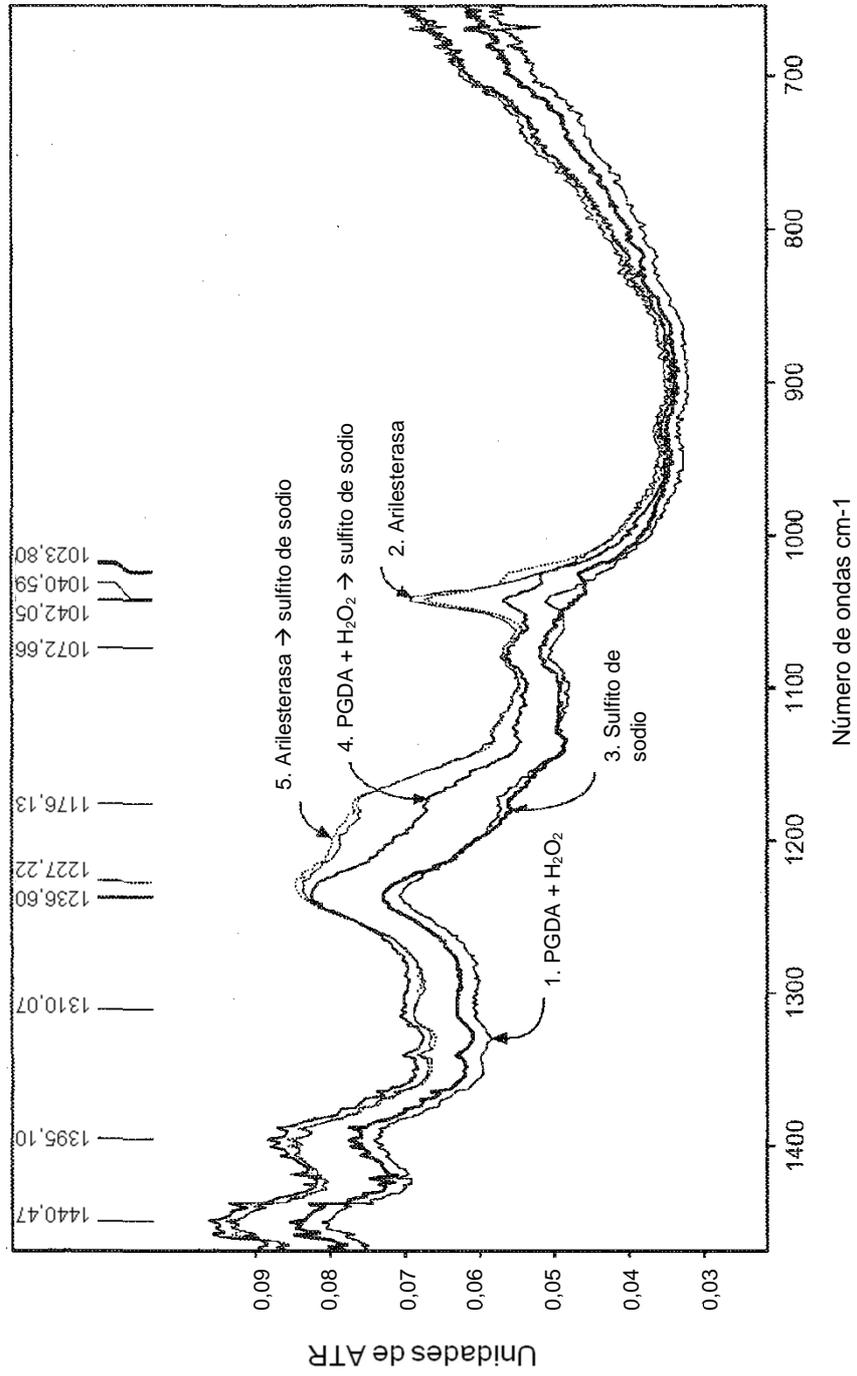
**FIG. 9**



**FIG. 10**



**FIG. 11**



**FIG. 12**

Largo medido en cm (% de encogimiento)

Tratamiento	Sentido	Largo original antes tratamiento	Largo después tratamiento	Encogimiento por relajación IWS TM 31 (1x7a)	Encogimiento por fieltro IWS TM 31 (5X5a)	Zona encog.
PGDA + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Largo (máquina)	40,0	30,3	34,1 (14,8 %)	21,6 (36,5 %)	(60,5 %)
	ancho	29,7	21,8	25,6 (13,7 %)	19,5 (24,1 %)	
Tratados con arilesterasa	Largo (máquina)	40,0	32,7	34,1 (14,8 %)	28,3 (17,1 %)	(-22,4 %)
	ancho	29,7	31,6	25,6 (13,7 %)	35,8 (-39,6 %)	

FIG. 13

Largo medido en cm (% de encogimiento)

Tratamiento	Sentido	Largo original antes tratamiento	Largo después tratamiento	Encogimiento por relajación IWS TM 31 (1x7a)	Encogimiento por fieltro IWS TM 31 (5X5a)	Zona encog.
PGDA + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Largo (máquina)	40,0	37,2	38,1 (4,8 %)	29,7 (22,1 %)	(30,6 %)
	ancho	29,7	28,4	28,8 (3,2 %)	26,3 (8,5 %)	
Arilesterasa	Largo (máquina)	40,0	38,1	38,1 (4,8 %)	32,0 (16,0 %)	(19,6 %)
	ancho	29,7	28,4	28,8 (3,2 %)	27,7 (3,6 %)	
Sulfito de sodio (SS)	Largo (máquina)	40,0	34,8	38,1 (4,8 %)	28,6 (25,0 %)	(33,5 %)
	ancho	29,7	29,0	28,8 (3,2 %)	26,3 (8,5 %)	
PGDA + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> → SS	Largo (máquina)	40,0	34,3	38,1 (4,8 %)	29,1 (23,7 %)	(32,0 %)
	ancho	29,7	28,5	28,8 (3,2 %)	26,4 (8,3 %)	
Arilesterasa	Largo (máquina)	40,0	37,1	38,1 (4,8 %)	32,6 (14,4 %)	(15,4 %)
	ancho	29,7	28,9	28,8 (3,2 %)	28,5 (1,0 %)	

FIG. 14