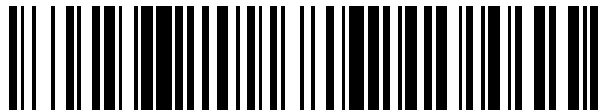


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 671 043**

51 Int. Cl.:

**C11D 17/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.03.2013 PCT/US2013/030403**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.09.2013 WO13138288**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.03.2013 E 13713616 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.04.2018 EP 2825624**

54 Título: **Composiciones hidrosolubles que incorporan enzimas y método de preparación de las mismas**

30 Prioridad:

**16.03.2012 US 201213422709**

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

**04.06.2018**

73 Titular/es:

**MONOSOL, LLC (100.0%)  
707 E. 80th Place Suite 301  
Merrillville, Indiana 46410, US**

72 Inventor/es:

**LEE, DAVID, M. y  
SIMS, JENNIFER, L.**

74 Agente/Representante:

**LINAGE GONZÁLEZ, Rafael**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 671 043 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

Composiciones hidrosolubles que incorporan enzimas y método de preparación de las mismas

### 5 **Campo de la divulgación**

La presente divulgación se refiere en general a películas hidrosolubles. Más en particular, la divulgación se refiere a películas hidrosolubles que comprenden una mezcla de una primera resina hidrosoluble, una enzima y un estabilizador enzimático que comprende un sustrato funcional para la enzima.

10

### **Antecedentes**

Las películas hidrosolubles se conocen bien en la técnica. Las películas hidrosolubles tienen muchas aplicaciones, tales como materiales de envasado, en los que la película en sí misma puede constituir un paquete hidrosoluble. Estas composiciones tienen la ventaja de que son fáciles de dosificar, manipular, transportar y almacenar.

15

Los paquetes hidrosolubles son muy adecuados para aplicaciones de dosis única en las que el paquete encierra un detergente para ropa, un blanqueador u otros aditivos para el lavado de ropa, cuidado de telas, lavado de vajillas, limpieza de superficies duras, cuidados de belleza, cuidado de la piel, otros cuidados personales o composiciones de productos alimenticios. A menudo hay agentes activos encerrados en paquetes hidrosolubles que se pueden volver inestables en presencia de otros agentes activos, o pueden provocar que otros ingredientes se vuelvan inestables, limitando de este modo qué agentes activos se pueden preenvasar juntos en forma de dosis única.

20

La actividad de las enzimas en películas previamente conocidas tendía a ser baja y a disminuir con el tiempo de almacenamiento. Esta pérdida de actividad tendía a ser especialmente grave cuando la composición enzimática incluía una proteasa, ya que la proteasa puede descomponerse a sí misma o a otras enzimas. En un intento de compensar la disminución de la actividad enzimática, se incluía una gran concentración de enzima en composiciones de película, y este enfoque no siempre fue exitoso en la producción de una película con al menos una actividad moderada. Por consiguiente, es sumamente deseable producir una película que mantenga un alto nivel de actividad enzimática sin que se requiera comenzar con una alta concentración de enzima (es decir, alto porcentaje de recuperación de enzima después del procesamiento y almacenamiento).

25

30

Los agentes activos que a menudo se usan como aditivos en aplicaciones de lavado de ropa y lavado de vajillas incluyen enzimas tales como las enzimas proteasa, amilasa, lipasa y oxidorreductasa, que incluyen pero no se limitan a las enzimas oxidorreductasa que catalizan la formación de agentes blanqueadores. Por lo tanto, una película hidrosoluble que contiene enzimas que mantienen un alto nivel de actividad, especialmente en presencia de proteasa, sería ventajosa para su uso en paquetes hidrosolubles de dosis única que encierran detergentes u otros aditivos para el lavado de ropa o para el lavado de vajillas.

35

### 40 **Sumario**

Un primer aspecto de la invención es una película hidrosoluble que comprende una mezcla hidrosoluble de una resina hidrosoluble que comprende una resina de poli(alcohol vinílico), una enzima y un sustrato enzimático para dicha enzima, en la que el sustrato enzimático se proporciona en una cantidad de al menos 1 phr.

45

Un segundo aspecto de la invención es un método de formación de una película hidrosoluble, que incluye las etapas de proporcionar una mezcla hidrosoluble de acuerdo con el primer aspecto, disuelta en agua; colar la mezcla disuelta sobre una superficie precalentada a una temperatura de menos de 77 °C, opcionalmente en un intervalo de 66 °C a 77 °C, o 74 °C; secar el agua de la mezcla colada durante un período de menos de 24 horas, opcionalmente menos de 12 horas, opcionalmente menos de 8 horas, opcionalmente menos de 2 horas, opcionalmente menos de 1 hora, opcionalmente menos de 45 minutos, opcionalmente menos de 30 minutos, opcionalmente menos de 20 minutos, opcionalmente menos de 10 minutos, por ejemplo en un intervalo de 6 minutos a 10 minutos, u 8 minutos, para formar una película hidrosoluble.

50

Un tercer aspecto de la invención es un método de formación de una película hidrosoluble como se define en el primer aspecto, en el que la película hidrosoluble se vierte desde una mezcla hidrosoluble preparada de acuerdo con las etapas de:

55

proporcionar una mezcla de resina hidrosoluble que comprende una resina de poli(alcohol vinílico), agua, sustrato enzimático y aditivos opcionales que excluyen enzimas; hervir la mezcla durante al menos 30 minutos; desgasificar la mezcla en un horno a una temperatura de al menos 40 °C; opcionalmente en un intervalo de 40 °C a 70 °C, por ejemplo 65 °C; añadir al menos una enzima, opcionalmente al menos un plastificante, y opcionalmente agua adicional a la mezcla a una temperatura de 65 °C o menos, en el que el sustrato enzimático en la mezcla es un sustrato para dicha enzima; y agitar la mezcla, opcionalmente sin vórtice, hasta que la mezcla tenga un color y una consistencia sustancialmente uniformes; opcionalmente durante un período de tiempo en un intervalo de 30 minutos a 90 minutos, opcionalmente al menos 1 hora; y colar la mezcla rápidamente después del período de tiempo de

60

65

agitación, de manera de formar una película hidrosoluble como se define en el primer aspecto, por ejemplo, en el transcurso de 4 horas, o 2 horas, o en el transcurso de 1 hora o menos.

5 Opcionalmente, las películas hidrosolubles descritas en el presente documento pueden ser termoformables, por ejemplo para dar una bolsita.

10 Para las composiciones y métodos descritos en el presente documento, se contemplan características opcionales, que incluyen pero no se limitan a, componentes, intervalos de composición de los mismos, sustituyentes, condiciones y etapas, que se van a seleccionar entre los diversos aspectos, modos de realización y ejemplos proporcionados en el presente documento.

15 Los aspectos y ventajas adicionales serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de una revisión de la siguiente descripción detallada. Si bien las composiciones y métodos son susceptibles de modos de realización en diversas formas, la descripción de aquí en adelante incluye modos de realización específicos entendiéndose que la divulgación es ilustrativa, y no pretende limitar la invención a los modos de realización específicos descritos en el presente documento. El alcance de la invención se define por las reivindicaciones.

### Descripción detallada

20 En el presente documento se divulgan películas hidrosolubles que incluyen una mezcla hidrosoluble de una resina hidrosoluble que comprende una resina de poli(alcohol vinílico), una enzima y un estabilizador enzimático que es un sustrato funcional para la enzima, en la que el sustrato enzimático se proporciona en una cantidad de al menos 1 phr. Opcionalmente, las películas hidrosolubles incluyen dos o más tipos de enzimas. Las películas hidrosolubles pueden ser en particular ventajosas porque se pueden diseñar de manera que un alto porcentaje de enzimas permanezca activo después de la formación de la película. Las películas hidrosolubles se pueden diseñar  
25 opcionalmente de manera que un alto porcentaje de enzimas permanezca activo cuando la película se almacena a temperaturas en un intervalo de aproximadamente 5 °C a aproximadamente 45 °C durante al menos 2 semanas, o en un intervalo de aproximadamente 2 semanas a 2 años, por ejemplo, 3 meses. Las películas hidrosolubles pueden tener una o más ventajas opcionales adicionales, que incluyen la recuperación inesperadamente alta de actividad enzimática en películas que contienen una proteasa y una segunda enzima, termoformable (por ejemplo, para dar una bolsita o paquete), una forma sólida para la administración de enzimas a un sustrato que no tiene polvo.

35 Las películas, los paquetes y sus métodos de fabricación y uso se contemplan para incluir modos de realización que incluyen cualquier combinación de uno o más de los elementos, características y etapas opcionales adicionales descritos adicionalmente a continuación (incluyendo los mostrados en cualquier figura), a menos que se indique lo contrario.

40 Como se usa en el presente documento, el término "que comprende" indica la posible inclusión de otros agentes, elementos, etapas o características, además de los especificados.

45 Como se usa en el presente documento y a menos que se especifique lo contrario, todas las mediciones de viscosidad en centipoises (cP) son de una solución al 4 % a 20 °C.

50 Como se usa en el presente documento, la "recuperación porcentual de enzima" se refiere al porcentaje de enzimas que permanecen activas después de una o más etapas de procesamiento o tiempo de almacenamiento, por ejemplo después de las etapas de procesamiento (por ejemplo, mezclado, colado y secado) de la composición hidrosoluble (por ejemplo, la película) y durante un período de almacenamiento de aproximadamente 1 mes a aproximadamente 5 °C. Por consiguiente, como se usa en el presente documento, la "recuperación de actividad enzimática" se refiere a la actividad de las enzimas en la composición hidrosoluble mantenida después de un método o tiempo de almacenamiento en comparación con la actividad enzimática original, por ejemplo, la actividad enzimática medida en una muestra representativa de la composición enzimática de materia prima que se añadió a una película. Así, por ejemplo, la recuperación de actividad enzimática puede ser la proporción de actividad enzimática después de las etapas de procesamiento para preparar la composición, por ejemplo, una película, y durante un período de almacenamiento de aproximadamente un mes a aproximadamente 5 °C con respecto a la actividad enzimática de la composición enzimática original añadida a la película. Las etapas de procesamiento contempladas incluyen cada una de las etapas descritas en el presente documento, individualmente o en combinaciones, por ejemplo, pero sin limitarse a, una etapa de calentamiento, una etapa de disolución, una etapa de mezclado (por ejemplo, una etapa de mezclado en húmedo) y una etapa de secado (por ejemplo, opcionalmente con aplicación de calor). La actividad enzimática se puede medir mediante cualquier método adecuado, siempre que se usen los mismos o métodos equivalentes para la medición de la materia prima enzimática y la medición de la composición procesada cargada con enzimas (por ejemplo, película que contiene enzimas). En un tipo de modo de realización, la actividad enzimática se puede determinar mediante un método colorimétrico. Las mediciones colorimétricas para la actividad de proteasa, amilasa y lipasa se describen a continuación en relación con los experimentos.

65 Como se usa en el presente documento y a menos que se especifique lo contrario, los términos "% en peso" pretenden referirse a la composición del elemento identificado en partes "secas" (sin agua) en peso de la película

completa (cuando corresponda) o en partes en peso de la composición completa encerrada dentro de una bolsita (cuando corresponda). Como se usa en el presente documento y a menos que se especifique lo contrario, el término "phr" pretende referirse a la composición del elemento identificado en partes por cien partes de resina de poli(alcohol vinílico) (PVOH) hidrosoluble.

Las películas hidrosolubles, los ingredientes opcionales para su uso en las mismas, y los métodos de elaboración de las mismas son bien conocidos en la técnica. En la invención reivindicada, la película hidrosoluble incluye PVOH. El PVOH es una resina sintética preparada en general por la alcoholólisis, habitualmente denominada hidrólisis o saponificación, de poli(acetato de vinilo). El PVOH completamente hidrolizado, en el que virtualmente todos los grupos acetato se han convertido en grupos alcohol, es un polímero altamente cristalino fuertemente unido por hidrógeno que se disuelve solo en agua caliente, a más de aproximadamente 140 °F (60 °C). Si se permite que permanezca una cantidad suficiente de grupos acetato después de la hidrólisis del poli(acetato de vinilo), el polímero de PVOH que se sabe que entonces está parcialmente hidrolizado, está más débilmente unido por hidrógeno y es menos cristalino y es soluble en agua fría, a menos de aproximadamente 50 °F (10 °C). Una película hidrosoluble fría/caliente intermedia puede incluir, por ejemplo, PVOH parcialmente hidrolizado intermedio (por ejemplo, con grados de hidrólisis de aproximadamente un 94 % a aproximadamente un 98 %), y es fácilmente soluble solo en agua tibia, por ejemplo, disolución rápida a temperaturas de aproximadamente 40 °C y mayores. Ambos tipos de PVOH total y parcialmente hidrolizados se denominan comúnmente homopolímeros de PVOH aunque el tipo parcialmente hidrolizado es técnicamente un copolímero de alcohol vinílico-acetato de vinilo.

El grado de hidrólisis del PVOH incluido en las películas hidrosolubles de la presente divulgación puede ser de aproximadamente un 75 % a aproximadamente un 99 %. A medida que se reduce el grado de hidrólisis, una película elaborada a partir de la resina tendrá una resistencia mecánica reducida pero una solubilidad más rápida a temperaturas por debajo de aproximadamente 20 °C. A medida que aumenta el grado de hidrólisis, una película elaborada a partir de la resina tenderá a ser mecánicamente más resistente y la termoformabilidad tenderá a disminuir. El grado de hidrólisis del PVOH se puede elegir de manera que la solubilidad en agua de la resina dependa de la temperatura y, así, también se influye en la solubilidad de una película elaborada a partir de la resina y los ingredientes adicionales. En una clase de modos de realización, la película es soluble en agua fría. Una película soluble en agua fría, hidrosoluble a una temperatura de menos de 10 °C, puede incluir PVOH con un grado de hidrólisis en un intervalo de aproximadamente un 75 % a aproximadamente un 90 %, o en un intervalo de aproximadamente un 80 % a aproximadamente un 90 %, o en un intervalo de aproximadamente un 85 % a aproximadamente un 90 %. En otra clase de modos de realización, la película es soluble en agua caliente. Una película soluble en agua caliente, hidrosoluble a una temperatura de al menos aproximadamente 60 °C, puede incluir PVOH con un grado de hidrólisis de al menos aproximadamente un 98 %.

Otras resinas formadoras de película para su uso además de PVOH pueden incluir, pero no se limitan a, poli(alcoholes vinílicos) modificados, poli(acrilatos), copolímeros de acrilato hidrosolubles, poli(acrilamidas), polivinilpirrolidona, pululano, polímeros naturales hidrosolubles, que incluyen, pero no se limitan a, goma guar, goma de xantano, carragenano y almidón, derivados de polímeros hidrosolubles que incluyen, pero no se limitan a, almidón etoxilado y almidón hidroxipropilado, poli(acrilamido-2-metilpropanosulfonato de sodio), polimonometilmaleato, copolímeros de los mismos y combinaciones de cualquiera de los anteriores. En una clase de modos de realización, la resina formadora de película es un terpolímero que consiste en alcohol vinílico, acetato de vinilo y acrilamido-2-metilpropanosulfonato de sodio. Inesperadamente, las películas hidrosolubles a base de un alcohol vinílico, acetato de vinilo y acrilamido-2-metilpropanosulfonato de sodio han demostrado un alto porcentaje de recuperación de actividad enzimática, tanto con como sin la inclusión de un sustrato enzimático en la película hidrosoluble.

La resina hidrosoluble se puede incluir en la película hidrosoluble en cualquier cantidad adecuada, por ejemplo, una cantidad en un intervalo de aproximadamente un 35 % en peso a aproximadamente un 90 % en peso. La proporción en peso preferente de la cantidad de la resina hidrosoluble en comparación con la cantidad combinada de todas las enzimas, estabilizadores enzimáticos y aditivos secundarios puede ser cualquier proporción adecuada, por ejemplo, una proporción en un intervalo de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 5, o aproximadamente 1 a 3, o aproximadamente 1 a 2.

Las resinas hidrosolubles para su uso en las películas descritas en el presente documento se pueden caracterizar por cualquier viscosidad adecuada para las propiedades de película deseadas, opcionalmente una viscosidad en un intervalo de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 30,0 cP, o aproximadamente 10,0 cP a aproximadamente 25 cP. La viscosidad de una resina de PVOH se determina midiendo una solución recién preparada usando un viscosímetro de tipo Brookfield LV con adaptador UL como se describe en la norma británica EN ISO 15023-2:2006, Anexo E: método de prueba Brookfield. Es una práctica internacional declarar la viscosidad de soluciones acuosas de poli(alcohol vinílico) al 4 % a 20 °C. Se debe entender que todas las viscosidades de PVOH especificadas en el presente documento en cP se refieren a la viscosidad de una solución acuosa de poli(alcohol vinílico) al 4 % a 20 °C, a menos que se especifique lo contrario.

Es bien sabido en la técnica que la viscosidad de una resina de PVOH se correlaciona con el peso molecular promedio en peso (*PM*) de la misma resina de PVOH, y a menudo la viscosidad se usa en sustitución de *PM*. Así, el

peso molecular promedio en peso de la resina hidrosoluble puede estar opcionalmente en un intervalo de aproximadamente 35.000 a aproximadamente 190.000, o aproximadamente 80.000 a aproximadamente 160.000. El peso molecular de la resina solo necesita ser suficiente para permitirle que se moldee mediante técnicas adecuadas para formar una película de plástico delgada.

5

### Enzimas

Se contempla que se puede usar cualquier tipo de enzimas deseado en las películas descritas en el presente documento.

10

Por ejemplo, dichas enzimas incluyen enzimas categorizadas en una cualquiera de las seis categorías convencionales de la Comisión de Enzimas (EC), es decir, las oxidorreductasas de EC 1 (que catalizan reacciones de oxidación/reducción), las transferasas de EC 2 (que transfieren un grupo funcional, por ejemplo, un grupo metilo o fosfato), las hidrolasas de EC 3 (que catalizan la hidrólisis de diversos enlaces), las liasas de EC 4 (que escinden diversos enlaces por medios distintos de la hidrólisis y la oxidación), las isomerasas de EC 5 (que catalizan los cambios de isomerización dentro de una molécula) y las ligasas de EC 6 (que unen dos moléculas con enlaces covalentes). Los ejemplos de dichas enzimas incluyen deshidrogenasas y oxidasas en EC 1, transaminasas y cinasas en EC 2, lipasas, celulasas, amilasas, mananasas y peptidasas (también conocidas como proteasas o enzimas proteolíticas) en EC 3, descarboxilasas en EC 4, isomerasas y mutasas en EC 5 y sintetasas y sintasas de EC 6.

20

### Oxidorreductasas

Las oxidorreductasas incluyen, pero no se limitan a: las que actúan sobre el grupo de donantes CH-OH; las que actúan sobre el grupo de donantes aldehído u oxo; las que actúan sobre el grupo de donantes CH-CH; las que actúan sobre el grupo de donantes CH-NH<sub>2</sub>; las que actúan sobre el grupo de donantes CH-NH; las que actúan sobre NADH o NADPH; las que actúan sobre otros compuestos nitrogenados como donantes; las que actúan sobre un grupo de donantes de azufre; las que actúan sobre un grupo de donantes hemo; las que actúan sobre difenoles y sustancias relacionadas como donantes; las que actúan sobre un peróxido como aceptador; las que actúan sobre el hidrógeno como donante; las que actúan sobre donantes únicos con incorporación de oxígeno molecular (oxigenasas); las que actúan sobre donantes emparejados, con incorporación o reducción de oxígeno molecular; las que actúan sobre radicales superóxido como aceptador; las que oxidan iones metálicos; las que actúan sobre grupos CH o CH<sub>2</sub>; las que actúan sobre proteínas de hierro-azufre como donantes; las que actúan sobre flavodoxina reducida como donante; las que actúan sobre el fósforo o el arsénico en donantes; las que actúan sobre X-H e Y-H para formar un enlace X-Y; y las que actúan sobre halógeno en donantes.

25

30

35

Las oxidorreductasas que actúan sobre el grupo de donantes CH-OH pueden incluir, pero no se limitan a, aquellas con NAD<sup>+</sup> o NADP<sup>+</sup> como aceptador (incluyendo alcohol deshidrogenasa, alcohol deshidrogenasa (NADP<sup>+</sup>), homoserina deshidrogenasa, (*R,R*)-butanodiol deshidrogenasa, glicerol deshidrogenasa, propanodiol-fosfato deshidrogenasa, glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (NAD<sup>+</sup>), D-xilulosa reductasa, L-xilulosa reductasa, D-arabinitol 4-deshidrogenasa, L-arabinitol 4-deshidrogenasa, L-arabinitol 2-deshidrogenasa, L-iditol 2-deshidrogenasa, D-iditol 2-deshidrogenasa, galactitol 2-deshidrogenasa, manitol-1-fosfato 5-deshidrogenasa, inositol 2-deshidrogenasa, glucuronato reductasa, glucuronolactona reductasa, aldehído reductasa, UDP-glucosa 6-deshidrogenasa, histidinal deshidrogenasa, quinato deshidrogenasa, shikimato deshidrogenasa, glioxilato reductasa, L-lactato deshidrogenasa, D-lactato deshidrogenasa, glicerato deshidrogenasa, 3-hidroxiobutirato deshidrogenasa, 3-hidroxiisobutirato deshidrogenasa, mevaldato reductasa, mevaldato reductasa (NADPH), hidroximetilglutaril-CoA reductasa (NADPH), 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa, acetoacetil-CoA reductasa, malato deshidrogenasa, malato deshidrogenasa (descarboxilante del oxalacetato), malato deshidrogenasa (descarboxilante), malato deshidrogenasa (descarboxilante del oxalacetato) (NADP<sup>+</sup>), isocitrato deshidrogenasa (NAD<sup>+</sup>), isocitrato deshidrogenasa (NADP<sup>+</sup>), fosfogluconato 2-deshidrogenasa, fosfogluconato deshidrogenasa (descarboxilante), L-gulonato 3-deshidrogenasa, L-arabinosa 1-deshidrogenasa, glucosa 1-deshidrogenasa, galactosa 1-deshidrogenasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, 3 $\alpha$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa (B-específica), 3(o 17) $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa, 3 $\alpha$ -hidroxicolanato deshidrogenasa, 3 $\alpha$ (o 20 $\beta$ )-hidroxiesteroide deshidrogenasa, alcohol alílico deshidrogenasa, lactaldehído reductasa (NADPH), ribitol 2-deshidrogenasa, fructuronato reductasa, tagaturonato reductasa, 3-hidroxiopropionato deshidrogenasa, 2-hidroxi-3-oxopropionato reductasa, 4-hidroxiobutirato deshidrogenasa, estradiol 17 $\beta$ -deshidrogenasa, testosterona 17 $\beta$ -deshidrogenasa, testosterona 17 $\beta$ -deshidrogenasa (NADP<sup>+</sup>), piridoxina 4-deshidrogenasa,  $\omega$ -hidroxidecanoato deshidrogenasa, manitol 2-deshidrogenasa, gluconato 5-deshidrogenasa, alcohol deshidrogenasa [NAD(P)<sup>+</sup>], glicerol deshidrogenasa (NADP<sup>+</sup>), octanol deshidrogenasa, (*R*)-aminopropanal deshidrogenasa, (*S,S*)-butanodiol deshidrogenasa, lactaldehído reductasa, metilglioxal reductasa (dependiente de NADH), glioxilato reductasa (NADP<sup>+</sup>), isopropanol deshidrogenasa (NADP<sup>+</sup>), hidroxipiruvato reductasa, malato deshidrogenasa (NADP<sup>+</sup>), D-malato deshidrogenasa (descarboxilante), dimetilmalato deshidrogenasa, 3-isopropilmalato deshidrogenasa, reductoisomerasa de ácido cetólico, homoisocitrato deshidrogenasa, hidroximetilglutaril-CoA reductasa, alcohol arílico deshidrogenasa, alcohol arílico deshidrogenasa (NADP<sup>+</sup>), oxaloglicolato reductasa (descarboxilante), tartrato deshidrogenasa, glicerol-3-fosfato deshidrogenasa [NAD(P)<sup>+</sup>], fosfoglicerato deshidrogenasa, diyodofenilpiruvato reductasa, alcohol 3-hidroxi-bencílico deshidrogenasa, deshidrogenasa del (*R*)-2-hidroxiácido graso, deshidrogenasa del (*S*)-2-hidroxiácido graso, reductasa de 3-oxoacil-

60

65

[proteína transportadora de acilo], acilglicerona-fosfato reductasa, 3-deshidroesfingina reductasa, L-treonina 3-deshidrogenasa, 4-oxoprolina reductasa, *todo-trans*-retinol deshidrogenasa (NAD<sup>+</sup>), pantoato 4-deshidrogenasa, piridoxal 4-deshidrogenasa, carnitina 3-deshidrogenasa, indol-lactato deshidrogenasa, 3-(imidazol-5-il)lactato deshidrogenasa, indanol deshidrogenasa, L-xilosa 1-deshidrogenasa, apiosa 1-reductasa, ribosa 1-deshidrogenasa (NADP<sup>+</sup>), D-arabinosa 1-deshidrogenasa, D-arabinosa 1-deshidrogenasa [NAD(P)<sup>+</sup>], glucosa 1-deshidrogenasa (NAD<sup>+</sup>), glucosa 1-deshidrogenasa (NADP<sup>+</sup>), galactosa 1-deshidrogenasa (NADP<sup>+</sup>), aldosa 1-deshidrogenasa, D-*treo*-aldosa 1-deshidrogenasa, sorbosa 5-deshidrogenasa (NADP<sup>+</sup>), fructosa 5-deshidrogenasa (NADP<sup>+</sup>), 2-desoxi-D-gluconato 3-deshidrogenasa, 2-deshidro-3-desoxi-D-gluconato 6-deshidrogenasa, 2-deshidro-3-desoxi-D-gluconato 5-deshidrogenasa, L-idonato 2-deshidrogenasa, L-treonato 3-deshidrogenasa, 3-deshidro-L-gulonato 2-deshidrogenasa, manuronato reductasa, GDP-manosa 6-deshidrogenasa, dTDP-4-deshidrorramnosa reductasa, dTDP-6-desoxi-L-talosa 4-deshidrogenasa, GDP-6-desoxi-D-talosa 4-deshidrogenasa, UDP-*N*-acetilglucosamina 6-deshidrogenasa, ribitol-5-fosfato 2-deshidrogenasa, manitol 2-deshidrogenasa (NADP<sup>+</sup>), sorbitol-6-fosfato 2-deshidrogenasa, 15-hidroxi prostaglandina deshidrogenasa (NAD<sup>+</sup>), D-pinitol deshidrogenasa, secuoyitol deshidrogenasa, alcohol perillíco deshidrogenasa, 3β-hidroxi-Δ<sup>5</sup>-esteroide deshidrogenasa, 11β-hidroxiesteroide deshidrogenasa, 16α-hidroxiesteroide deshidrogenasa, estradiol 17α-deshidrogenasa, 20α-hidroxiesteroide deshidrogenasa, 21-hidroxiesteroide deshidrogenasa (NAD<sup>+</sup>), 21-hidroxiesteroide deshidrogenasa (NADP<sup>+</sup>), 3α-hidroxi-5β-androstan-17-ona 3α-deshidrogenasa, sepiapterina reductasa, ureidoglicolato deshidrogenasa, glicerol 2-deshidrogenasa (NADP<sup>+</sup>), 3-hidroxi butiril-CoA deshidrogenasa, UDP-*N*-acetilmuramato deshidrogenasa, 7α-hidroxiesteroide deshidrogenasa, dihidrobunolol deshidrogenasa, colestanoetraol 26-deshidrogenasa, eritrola reductasa, ciclopentanol deshidrogenasa, hexadecanol deshidrogenasa, 2-alquin-1-ol deshidrogenasa, hidroxiciclohexanocarboxilato deshidrogenasa, hidroximalonato deshidrogenasa, 2-deshidropantolactona reductasa (A-específica), 2-deshidropantoato 2-reductasa, 3β-hidroxi-4α-metilcoleyenocarboxilato 3-deshidrogenasa (descarboxilante), 2-oxoadipato reductasa, L-ramnosa 1-deshidrogenasa, ciclohexano-1,2-diol deshidrogenasa, D-xilosa 1-deshidrogenasa, 12α-hidroxiesteroide deshidrogenasa, glicerol-3-fosfato 1-deshidrogenasa (NADP<sup>+</sup>), 3-hidroxi-2-metilbutiril-CoA deshidrogenasa, D-xilosa 1-deshidrogenasa (NADP<sup>+</sup>), colest-5-eno-3β,7α-diol 3β-deshidrogenasa, geraniol deshidrogenasa, carbonil reductasa (NADPH), L-glicol deshidrogenasa, dTDP-galactosa 6-deshidrogenasa, GDP-4-deshidro-D-ramnosa reductasa, prostaglandina-F sintasa, prostaglandina-E<sub>2</sub> 9-reductasa, indol-3-acetaldehído reductasa (NADH), indol-3-acetaldehído reductasa (NADPH), deshidrogenasa de alcohol de cadena larga, 5-amino-6-(5-fosforribosilamino)uracil reductasa, alcohol coniferílico deshidrogenasa, alcohol cinamílico deshidrogenasa, 15-hidroxi prostaglandina-D deshidrogenasa (NADP<sup>+</sup>), 15-hidroxi prostaglandina deshidrogenasa (NADP<sup>+</sup>), (+)-borneol deshidrogenasa, (S)-usnato reductasa, aldosa-6-fosfato reductasa (NADPH), 7β-hidroxiesteroide deshidrogenasa (NADP<sup>+</sup>), 1,3-propanodiol deshidrogenasa, uronato deshidrogenasa, IMP deshidrogenasa, tropinona reductasa I, (-)-mentol deshidrogenasa, (+)-neomentol deshidrogenasa, 3(o 17) α-hidroxiesteroide deshidrogenasa, 3β(o 20α)-hidroxiesteroide deshidrogenasa, 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa de cadena larga, reductasa de 3-oxoacil-[proteína transportadora de acilo] (NADH), 3α-hidroxiesteroide deshidrogenasa (A-específica), 2-deshidropantolactona reductasa (B-específica), gluconato 2-deshidrogenasa, farnesol deshidrogenasa, bencil-2-metilhidroxibutirato deshidrogenasa, morfina 6-deshidrogenasa, dihidrokaempferol 4-reductasa, 6-piruvoltetrahydropterina 2'-reductasa, vomifoliol 4'-deshidrogenasa, (*R*)-4-hidroxi fenilactato deshidrogenasa, isopiperitenol deshidrogenasa, manosa-6-fosfato 6-reductasa, clordecona reductasa, 4-hidroxiciclohexanocarboxilato deshidrogenasa, (-)-borneol deshidrogenasa, (+)-sabinol deshidrogenasa, 2-metil-3-oxosuccinato de dietilo reductasa, 3α-hidroxi glicirretinato deshidrogenasa, 15-hidroxi prostaglandina-I deshidrogenasa (NADP<sup>+</sup>), 15-hidroxiicosatetraenoato deshidrogenasa, *N*-acilmanosamina 1-deshidrogenasa, flavanona 4-reductasa, 8-oxocoformicina reductasa, tropinona reductasa II, hidroxifenilpiruvato reductasa, 12β-hidroxiesteroide deshidrogenasa, 3α(17β)-hidroxiesteroide deshidrogenasa (NAD<sup>+</sup>), *N*-acetilhexosamina 1-deshidrogenasa, 6-*endo*-hidroxicineola deshidrogenasa, carveol deshidrogenasa, metanol deshidrogenasa, ciclohexanol deshidrogenasa, pterocarpina sintasa, codeinona reductasa (NADPH), salutaridina reductasa (NADPH), D-arabinitol 2-deshidrogenasa, galactitol-1-fosfato 5-deshidrogenasa, tetrahidroxi naftaleno reductasa, (S)-carnitina 3-deshidrogenasa, manitol deshidrogenasa, fluoren-9-ol deshidrogenasa, 4-(hidroximetil) bencenosulfonato deshidrogenasa, 6-hidroxi hexanoato deshidrogenasa, 3-hidroxi pimeloil-CoA deshidrogenasa, sulcatona reductasa, *sn*-glicerol-1-fosfato deshidrogenasa, 4-hidroxi treonina-4-fosfato deshidrogenasa, 1,5-anhidro-D-fructosa reductasa, L-idonato 5-deshidrogenasa, 3-metilbutanal reductasa, dTDP-4-deshidro-6-desoxiglucosa reductasa, 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato reductoisomerasa, 2-(*R*)-hidroxipropil-CoM deshidrogenasa, 2-(*S*)-hidroxipropil-CoM deshidrogenasa, 3-ceto-esteroide reductasa, GDP-L-fucosa sintasa, deshidrogenasa del (*R*)-2-hidroxiácido, vellosimina deshidrogenasa, 2,5-dideshidrogluconato reductasa, (+)-*trans*-carveol deshidrogenasa, serina 3-deshidrogenasa, 3β-hidroxi-5β-esteroide deshidrogenasa, 3β-hidroxi-5α-esteroide deshidrogenasa, deshidrogenasa del éster de (*R*)-3-hidroxiácido, deshidrogenasa del éster de (*S*)-3-hidroxiácido, GDP-4-deshidro-6-desoxi-D-manosa reductasa, quinato/shikimato deshidrogenasa, metilglixal reductasa (dependiente de NADPH), *S*-(hidroximetil)glutación deshidrogenasa, 3"-desamino-3"-oxonicotianamina reductasa, isocitrato-homoisocitrato deshidrogenasa, D-arabinitol deshidrogenasa (NADP<sup>+</sup>), xantoxina deshidrogenasa, sorbosa reductasa, 4-fosfoeritronato deshidrogenasa, 2-hidroxi metilglutarato deshidrogenasa, 1,5-anhidro-D-fructosa reductasa (formadora de 1,5-anhidro-D-manitol), clorofil(*ida*) *b* reductasa, momilactona-A sintasa, dihidrocarveol deshidrogenasa, limoneno-1,2-diol deshidrogenasa, 3-hidroxi propionato deshidrogenasa (NADP<sup>+</sup>), malato deshidrogenasa [NAD(P)<sup>+</sup>], NADP-retinol deshidrogenasa, D-arabitol-fosfato deshidrogenasa, 5'-fosfato de 2,5-diamino-6-(ribosilamino)-4(3*H*)-pirimidinona reductasa, diacetil reductasa [formadora de (*R*)-acetoina], diacetil reductasa [formadora de (*S*)-acetoina], deshidrogenasa del ácido UDP-glucurónico (descarboxilante del ácido UDP-

- 4-ceto-hexaurónico), *S*-(hidroximetil)micotiol deshidrogenasa, D-xilosa reductasa, fosfonoacetaldehído reductasa (NADH), sulfopropanodiol 3-deshidrogenasa, (*S*)-sulfolactato deshidrogenasa, (*S*)-1-feniletanol deshidrogenasa, 2-hidroxi-4-carboximuconato semialdehído hemiacetal deshidrogenasa, sulfoacetaldehído reductasa, germacreno A alcohol deshidrogenasa y 11-*cis*-retinol deshidrogenasa); o con un citocromo como aceptador (incluyendo manitol deshidrogenasa (citocromo), L-lactato deshidrogenasa (citocromo), D-lactato deshidrogenasa (citocromo), D-lactato deshidrogenasa (citocromo c-553), poli(alcohol vinílico) deshidrogenasa (citocromo), metanol deshidrogenasa (citocromo c) y alcohol deshidrogenasa (citocromo c)); o con oxígeno como aceptador (incluyendo malato oxidasa, glucosa oxidasa, hexosa oxidasa, colesterol oxidasa, alcohol arílico oxidasa, L-gulonolactona oxidasa, galactosa oxidasa, piranosa oxidasa, L-sorbosa oxidasa, piridoxina 4-oxidasa, alcohol oxidasa, catecol oxidasa (dimerizante), oxidasa del (*S*)-2-hidroxiácido, ecdisona oxidasa, colina oxidasa, alcohol secundario oxidasa, 4-hidroximandelato oxidasa, oxidasa de alcohol de cadena larga, glicerol-3-fosfato oxidasa, tiamina oxidasa, hidroxifitanato oxidasa, nucleósido oxidasa, *N*-acilhexosamina oxidasa, poli(alcohol vinílico) oxidasa, D-arabinono-1,4-lactona oxidasa, alcohol vanilílico oxidasa, nucleósido oxidasa (formadora de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y D-manitol oxidasa, alditol oxidasa); o con un disulfuro como aceptador (incluyendo la vitamina-K-epóxido reductasa (sensible a la warfarina) o la vitamina K-epóxido reductasa (insensible a la warfarina)); o con una quinona o un compuesto similar como aceptador (incluyendo quinoproteína glucosa deshidrogenasa, glicerol-3-fosfato deshidrogenasa, malato deshidrogenasa (quinona), alcohol deshidrogenasa (quinona), formiato deshidrogenasa-N, alcohol cíclico deshidrogenasa (quinona) y quinato deshidrogenasa (quinina)); o con otros aceptadores conocidos (incluyendo alcohol deshidrogenasa (azurina) y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (coenzima-F<sub>420</sub>)); o con otros aceptadores (incluyendo colina deshidrogenasa, 2-hidroxi-glutarato deshidrogenasa, gluconato 2-deshidrogenasa (aceptadora), deshidrogluconato deshidrogenasa, deshidrogenasa del D-2-hidroxiácido, lactato-malato transhidrogenasa, piridoxina 5-deshidrogenasa, glucosa deshidrogenasa (aceptadora), fructosa 5-deshidrogenasa, sorbosa deshidrogenasa, glucósido 3-deshidrogenasa, glicolato deshidrogenasa, celobiosa deshidrogenasa (aceptadora), alcanol-1-ol deshidrogenasa (aceptadora), D-sorbitol deshidrogenasa (aceptadora), glicerol deshidrogenasa (aceptadora), transhidrogenasa de hidroxiácidos-oxoácidos, 3-hidroxiciclohexanona deshidrogenasa, (*R*)-pantolactona deshidrogenasa (flavina), glucosa-fructosa oxidorreductasa, piranosa deshidrogenasa (aceptadora), reductasa de 2-oxoácido, (*S*)-mandelato deshidrogenasa, L-sorbosa 1-deshidrogenasa, formiato deshidrogenasa (aceptadora), deshidrogenasa de glucosa de quinoproteína soluble, deshidrogenasa de alcohol dependiente de NDMA y deshidrogenasa de metanol dependiente de NDMA).
- Las oxidorreductasas que actúan sobre el grupo de donantes aldehído u oxo pueden incluir, pero no se limitan a, aquellas con NAD<sup>+</sup> o NADP<sup>+</sup> como aceptador (incluyendo formiato deshidrogenasa, aldehído deshidrogenasa (NAD<sup>+</sup>), aldehído deshidrogenasa (NADP<sup>+</sup>), aldehído deshidrogenasa [NAD(P)<sup>+</sup>], benzaldehído deshidrogenasa (NADP<sup>+</sup>), betaína-aldehído deshidrogenasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (NADP<sup>+</sup>), acetaldehído deshidrogenasa (acetilante), aspartato-semialdehído deshidrogenasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (fosforilante), gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (NADP<sup>+</sup>) (fosforilante), malonato-semialdehído deshidrogenasa, succinato-semialdehído deshidrogenasa [NAD(P)<sup>+</sup>], glioxilato deshidrogenasa (acilante), malonato-semialdehído deshidrogenasa (acetilante), aminobutiraldehído deshidrogenasa, glutarato-semialdehído deshidrogenasa, glicolaldehído deshidrogenasa, lactaldehído deshidrogenasa, 2-oxoaldehído deshidrogenasa (NAD<sup>+</sup>), succinato-semialdehído deshidrogenasa (NAD<sup>+</sup>), 2-oxoisovalerato deshidrogenasa (acilante), 2,5-dioxovalerato deshidrogenasa, metilmalonato-semialdehído deshidrogenasa (acilante), benzaldehído deshidrogenasa (NAD<sup>+</sup>), aril-aldehído deshidrogenasa, aril-aldehído deshidrogenasa (NADP<sup>+</sup>), L-aminoadipato-semialdehído deshidrogenasa, aminomuconato-semialdehído deshidrogenasa, (*R*)-deshidropantoato deshidrogenasa, retinal deshidrogenasa, *N*-acetil- $\gamma$ -glutamil-fosfato reductasa, fenilacetaldehído deshidrogenasa, 3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -trihidroxicolestan-26-al 26-oxidorreductasa, glutamato-5-semialdehído deshidrogenasa, hexadecanal deshidrogenasa (acilante), formiato deshidrogenasa (NADP<sup>+</sup>), cinamoil-CoA reductasa, formaldehído deshidrogenasa, 4-trimetilamoniobutiraldehído deshidrogenasa, deshidrogenasa de aldehído de cadena larga, 2-oxoaldehído deshidrogenasa (NADP<sup>+</sup>), reductasa de CoA al acilo graso de cadena larga, piruvato deshidrogenasa (NADP<sup>+</sup>), oxoglutarato deshidrogenasa (NADP<sup>+</sup>), 4-hidroxifenilacetaldehído deshidrogenasa,  $\gamma$ -guanidinobutiraldehído deshidrogenasa, butanal deshidrogenasa, fenilglioxilato deshidrogenasa (acilante), gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (NAD(P)<sup>+</sup>) (fosforilante), 5-carboximetil-2-hidroxi-muconato-semialdehído deshidrogenasa, 4-hidroxi-muconato-semialdehído deshidrogenasa, 4-formilbencenosulfonato deshidrogenasa, 6-oxohexanoato deshidrogenasa, 4-hidroxibenzaldehído deshidrogenasa, salicilaldehído deshidrogenasa, vainillina deshidrogenasa, coniferil-aldehído deshidrogenasa, fluoroacetaldehído deshidrogenasa, glutamil-ARNt reductasa, succinilglutamato-semialdehído deshidrogenasa, eritrosa-4-fosfato deshidrogenasa, sulfoacetaldehído deshidrogenasa, abietadienal deshidrogenasa, malonil-CoA reductasa (formadora de malonato-semialdehído), succinato-semialdehído deshidrogenasa (acetilante), 3,4-deshidroadipil-CoA-semialdehído deshidrogenasa (NADP<sup>+</sup>), 2-formilbenzoato deshidrogenasa, succinato-semialdehído deshidrogenasa (NADP<sup>+</sup>), reductasa de acil-[proteína transportadora de acilo] de cadena larga, sulfoacetaldehído deshidrogenasa (acilante), y  $\beta$ -apo-4'-carotenal oxigenasa); o con un citocromo como aceptador (incluyendo formiato deshidrogenasa (citocromo), formiato deshidrogenasa (citocromo-c-553) y monóxido de carbono deshidrogenasa (citocromo-*b*-561)); o con oxígeno como aceptador (incluyendo aldehído oxidasa, piruvato oxidasa, oxalato oxidasa, glioxilato oxidasa, piruvato oxidasa (acetilante de CoA), indol-3-acetaldehído oxidasa, piridoxal oxidasa, aril-aldehído oxidasa, retinal oxidasa, 4-hidroxifenilpiruvato oxidasa y aldehído abscísico oxidasa); o con un disulfuro como aceptador (incluyendo piruvato deshidrogenasa (transferente de acetilo), oxoglutarato deshidrogenasa (transferente de succinilo), y 3-metil-2-oxobutanoato deshidrogenasa (transferente de 2-metilpropanoilo)); o con una quinona o un compuesto similar como aceptador (incluyendo piruvato deshidrogenasa (quinona)); o con una proteína hierro-azufre como aceptadora

(incluyendo piruvato sintasa, 2-oxobutirato sintasa, 2-oxoglutarato sintasa, monóxido de carbono deshidrogenasa (ferredoxina), aldehído ferredoxina oxidorreductasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (ferredoxina), 3-metil-2-oxobutanoato deshidrogenasa (ferredoxina), indolpiruvato ferredoxina oxidorreductasa y oxalato oxidorreductasa); o con otras aceptadoras (incluyendo monóxido de carbono deshidrogenasa (aceptadora), aldehído deshidrogenasa (pirroloquinolinquinona), formaldehído dismutasa, formilmetanofurano deshidrogenasa, carboxilato reductasa y aldehído deshidrogenasa (independiente de FAD)).

Las oxidorreductasas que actúan sobre el grupo de donantes CH-CH pueden incluir, pero no se limitan a, aquellas con NAD<sup>+</sup> o NADP<sup>+</sup> como aceptador (por ejemplo, dihidropirimidina deshidrogenasa (NAD<sup>+</sup>), dihidropirimidina deshidrogenasa (NADP<sup>+</sup>),  $\Delta^4$ -3-oxoesteroide 5 $\beta$ -reductasa, cortisona  $\alpha$ -reductasa, cucurbitacina  $\Delta^{23}$ -reductasa, fumarato reductasa (NADH), *meso*-tartrato deshidrogenasa, acil-CoA deshidrogenasa (NADP<sup>+</sup>), reductasa de enoil-[proteína transportadora de acilo] (NADH), reductasa de enoil-[proteína transportadora de acilo] (NADPH, B-específica), 2-cumarato reductasa, prefenato deshidrogenasa, prefenato deshidrogenasa (NADP<sup>+</sup>), dihidroorotato deshidrogenasa (NAD<sup>+</sup>), dihidroorotato deshidrogenasa (NADP<sup>+</sup>),  $\beta$ -nitroacrilato reductasa, 3-metilenoxindol reductasa, quinurenato-7,8-dihidrodiol deshidrogenasa, *cis*-1,2-dihidrobenzeno-1,2-diol deshidrogenasa, *trans*-1,2-dihidrobenzeno-1,2-diol deshidrogenasa, 7-deshidrocolesterol reductasa, colesteno 5 $\alpha$ -reductasa, biliverdina reductasa, 1,6-dihidroxiciclohexa-2,4-dieno-1-carboxilato deshidrogenasa, dihidropicolinato reductasa, 2-hexadecenal reductasa, 2,3-dihidro-2,3-dihidroxibenzoato deshidrogenasa, *cis*-1,2-dihidro-1,2-dihidroxinaftaleno deshidrogenasa, progesterona 5 $\alpha$ -reductasa, 2-enoato reductasa, maleilacetato reductasa, protoclorofilida reductasa, 2,4-dienoil-CoA reductasa (NADPH), fosfatidilcolina desaturasa, geissosquizina deshidrogenasa, *cis*-2-enoil-CoA reductasa (NADPH), *trans*-2-enoil-CoA reductasa (NADPH), reductasa de enoil-[proteína transportadora de acilo] (NADPH, A-específica), 2-hidroxi-6-oxo-6-fenilhexa-2,4-dienoato reductasa, xantomatina reductasa, 12-oxofitodienoato reductasa, arogenato deshidrogenasa, *trans*-2-enoil-CoA reductasa (NAD<sup>+</sup>), 2'-hidroxiiisoflavona reductasa, biochanina-A reductasa,  $\alpha$ -santonina 1,2-reductasa, 15-oxoprostaglandina 13-oxidasa, *cis*-3,4-dihidrofenantreno-3,4-diol deshidrogenasa, 2'-hidroxidaidzeina reductasa, reductasa de 2-metil-enoil-CoA de cadena ramificada, (3*S*,4*R*)-3,4-dihidroxiciclohexa-1,5-dieno-1,4-dicarboxilato deshidrogenasa, precorina-6A reductasa, *cis*-2,3-dihidrobifenil-2,3-diol deshidrogenasa, floroglucinol reductasa, 2,3-dihidroxi-2,3-dihidro-*p*-cumato deshidrogenasa, dibenzotiofeno dihidrodiol deshidrogenasa, tereftalato 1,2-*cis*-dihidrodiol deshidrogenasa, pimeloil-CoA deshidrogenasa, 2,4-diclorobenzoil-CoA reductasa, ftalato 4,5-*cis*-dihidrodiol deshidrogenasa, 5,6-dihidroxi-3-metil-2-oxo-1,2,5,6-tetrahidroquinolin deshidrogenasa, *cis*-dihidroetilcatecol deshidrogenasa, *cis*-1,2-dihidroxi-4-metilciclohexa-3,5-dieno-1-carboxilato deshidrogenasa, 1,2-dihidroxi-6-metilciclohexa-3,5-dienocarboxilato deshidrogenasa, zeatina reductasa,  $\Delta^{14}$ -esterol reductasa,  $\Delta^{24(241)}$ -esterol reductasa,  $\Delta^{24}$ -esterol reductasa, 1,2-dihidrovomilenina reductasa, 2-alquenal reductasa, divinil clorofilida 8-vinil-reductasa, precorina-2 deshidrogenasa, antocianidina reductasa, arogenato deshidrogenasa (NADP<sup>+</sup>), arogenato deshidrogenasa [NAD(P)<sup>+</sup>], reductasa de los catabolitos de clorofila roja, (+)-pulegona reductasa, (-)-isopiperitenona reductasa, geranilgeranil difosfato reductasa, acrilil-CoA reductasa (NADPH), crotonil-CoA carboxilasa/reductasa, crotonil-CoA reductasa, 3-(*cis*-5,6-dihidroxiciclohexa-1,3-dien-1-il)propanoato deshidrogenasa, ARNt-dihidrouridina<sup>16/17</sup> sintasa [NAD(P)<sup>+</sup>], ARNt-dihidrouridina<sup>47</sup> sintasa [NAD(P)<sup>+</sup>], ARNt-dihidrouridina<sup>20a/20b</sup> sintasa [NAD(P)<sup>+</sup>] y ARNt-dihidrouridina<sup>20</sup> sintasa [NAD(P)<sup>+</sup>]) o con un citocromo como aceptador, por ejemplo, L-galactonolactona deshidrogenasa, o con oxígeno como aceptador (por ejemplo, coproporfirinógeno oxidasa, protoporfirinógeno oxidasa, bilirrubina oxidasa, acil-CoA oxidasa, dihidouracil oxidasa, tetrahydroberberina oxidasa, secologanina sintasa, triptófano  $\alpha,\beta$ -oxidasa, pirroloquinolin-quinona sintasa y L-galactonolactona oxidasa), o con una quinina o compuesto relacionado como aceptador (por ejemplo, succinato deshidrogenasa (ubiquinona), dihidroorotato deshidrogenasa (quinona), protoporfirinógeno IX deshidrogenasa (menaquinona), fumarato reductasa (menaquinona), 15-*cis*-fitoeno desaturasa y 9,9'-*dicis*- $\zeta$ -caroteno desaturasa), o con una proteína hierro-azufre como aceptadora (por ejemplo, 6-hidroxinicotinato reductasa, 15,16-dihidrobiliverdina:ferredoxina oxidorreductasa, ficoeritrobilina:ferredoxina oxidorreductasa, fitocromobilina:ferredoxina oxidorreductasa, ficocianobilina:ferredoxina oxidorreductasa, ficoeritrobilina sintasa, ferredoxina:protoclorofilida reductasa (dependiente de ATP), benzoil-CoA reductasa y 4-hidroxibenzoil-CoA reductasa) o con flavina como aceptadora (por ejemplo, butiril-CoA deshidrogenasa o 4,4'-diapofitoeno desaturasa), o con otras aceptadoras conocidas (por ejemplo, dihidroorotato deshidrogenasa (fumarato)), o con otras aceptadoras (por ejemplo, succinato deshidrogenasa, acil-CoA deshidrogenasa, 3-oxoesteroide 1-deshidrogenasa, 3-oxo-5 $\alpha$ -esteroide 4-deshidrogenasa, 3-oxo-5 $\beta$ -esteroide 4-deshidrogenasa, glutaril-CoA deshidrogenasa, 2-furoil-CoA deshidrogenasa, isovaleril-CoA deshidrogenasa, 2-metilacil-CoA deshidrogenasa, acil de cadena larga-CoA deshidrogenasa, ciclohexanona deshidrogenasa, isoquinolina 1-oxidorreductasa, quinolina 2-oxidorreductasa, quinaldato 4-oxidorreductasa, quinolin-4-carboxilato 2-oxidorreductasa, (*R*)-bencilsuccinil-CoA deshidrogenasa, coproporfirinógeno deshidrogenasa, *todo-trans*-retinol 13,14-reductasa, 2-amino-4-desoxicorismato deshidrogenasa, carvona reductasa, *todo-trans*- $\zeta$ -caroteno desaturasa, 1-hidroxicarotenoide 3,4-desaturasa, fitoeno desaturasa (formadora de neurosporeno), fitoeno desaturasa (formadora de  $\zeta$ -caroteno), fitoeno desaturasa (formadora de 3,4-dideshidrolicopeno) y fitoeno desaturasa (formadora de licopeno).

Las oxidorreductasas que actúan sobre el grupo de donantes CH-NH<sub>2</sub> pueden incluir, pero no se limitan a, aquellas con NAD<sup>+</sup> o NADP<sup>+</sup> como aceptador (por ejemplo, alanina deshidrogenasa, glutamato deshidrogenasa, glutamato deshidrogenasa [NAD(P)<sup>+</sup>], glutamato deshidrogenasa (NADP<sup>+</sup>), L-aminoácido deshidrogenasa, serina 2-deshidrogenasa, valina deshidrogenasa (NADP<sup>+</sup>), leucina deshidrogenasa, glicina deshidrogenasa, L-*eritro*-3,5-



5 diaminohexanoato deshidrogenasa, 2,4-diaminopentanoato deshidrogenasa, glutamato sintasa (NADPH), glutamato sintasa (NADH), lisina deshidrogenasa, diaminopimelato deshidrogenasa, N-metilalanina deshidrogenasa, lisina 6-deshidrogenasa, triptófano deshidrogenasa, fenilalanina deshidrogenasa y aspartato deshidrogenasa), o con un citocromo como aceptador (por ejemplo, glicina deshidrogenasa (citocromo)), o con oxígeno como aceptador (por ejemplo, D-aspartato oxidasa, L-aminoácido oxidasa, D-aminoácido oxidasa, amino oxidasa, 5'-fosfato de piridoxal sintasa, D-glutamato oxidasa, etanolamina oxidasa, putrescina oxidasa, L-glutamato oxidasa, ciclohexilamina oxidasa, proteína-lisina 6-oxidasa, L-lisina oxidasa, D-glutamato (D-aspartato) oxidasa, L-aspartato oxidasa, glicina oxidasa, L-lisina 6-oxidasa, amina primaria oxidasa, diamina oxidasa y 7-cloro-L-triptófano oxidasa), o con un disulfuro como aceptador (por ejemplo, glicina deshidrogenasa (descarboxilante)), o con una quinina o un compuesto similar como aceptador (por ejemplo, D-aminoácido deshidrogenasa (quinona)) o con una proteína hierro-azufre como aceptadora (por ejemplo, glutamato sintasa (ferredoxina)), o con una proteína de cobre como aceptadora (por ejemplo, metilamina deshidrogenasa (amicianina) y aralquilamina deshidrogenasa (azurina)), y con otras aceptadoras (por ejemplo, D-aminoácido deshidrogenasa, taurina deshidrogenasa y glicina deshidrogenasa (formadora de cianuro)).

15 Las oxidorreductasas que actúan sobre el grupo de donantes CH-NH pueden incluir, pero no se limitan a, aquellas con  $\text{NAD}^+$  o  $\text{NADP}^+$  como aceptador (por ejemplo, pirrolina-2-carboxilato reductasa, pirrolina-5-carboxilato reductasa, dihidrofolato reductasa, metilentetrahidrofolato deshidrogenasa ( $\text{NADP}^+$ ), formiltetrahidrofolato deshidrogenasa, sacaropina deshidrogenasa ( $\text{NAD}^+$ , formadora de L-lisina), sacaropina deshidrogenasa ( $\text{NADP}^+$ , formadora de L-lisina), sacaropina deshidrogenasa ( $\text{NAD}^+$ , formadora de L-glutamato), sacaropina deshidrogenasa ( $\text{NADP}^+$ , formadora de L-glutamato), D-octopina deshidrogenasa, 1-pirrolina-5-carboxilato deshidrogenasa, metilentetrahidrofolato deshidrogenasa ( $\text{NAD}^+$ ), D-lisopina deshidrogenasa, alanopina deshidrogenasa, efedrina deshidrogenasa, D-nopalina deshidrogenasa, metilentetrahidrofolato reductasa [ $\text{NAD(P)H}$ ],  $\Delta^1$ -piperideina-2-carboxilato reductasa, estrombina deshidrogenasa, taupina deshidrogenasa,  $\text{N}^{\beta}$ -(carboxietil)ornitina sintasa, tiomorfolina-carboxilato deshidrogenasa,  $\beta$ -alanopina deshidrogenasa, 1,2-deshidrorreticulino reductasa (NADPH), opina deshidrogenasa, flavina reductasa (NADPH), berberina reductasa, vomilenina reductasa, pteridina reductasa, 6,7-dihidropteridina reductasa, flavina reductasa (NADH), FAD reductasa (NADH), FMN reductasa (NADPH), FMN reductasa [ $\text{NAD(P)H}$ ], 8-hidroxi-5-desazaflavina:NADPH oxidorreductasa, riboflavina reductasa [ $\text{NAD(P)H}$ ] y FMN reductasa (NADH)), con oxígeno como aceptador (por ejemplo, sarcosina oxidasa, N-metil-L-aminoácido oxidasa,  $\text{N}^{\beta}$ -metil-lisina oxidasa, (S)-6-hidroxinicotina oxidasa, (R)-6-hidroxinicotina oxidasa, L-pipecolato oxidasa, dimetilglicina oxidasa, dihidrobenzofenantridina oxidasa,  $\text{N}^1$ -acetilpoliamina oxidasa, poliamina oxidasa (formadora de propano-1,3-diamina),  $\text{N}^{\beta}$ -acetilpermidina oxidasa (formadora de propano-1,3-diamina), espermina oxidasa, poliamina oxidasa no específica y L-sacaropina oxidasa), con un disulfuro como aceptador (por ejemplo, pirimidodiazepina sintasa), con una quinina o compuesto similar como aceptador (por ejemplo, deshidrogenasa de la flavoproteína transferidora de electrones), con una proteína hierro-azufre como receptora (por ejemplo, metilentetrahidrofolato reductasa (ferredoxina)), con una flavina como aceptadora (por ejemplo, dimetilamina deshidrogenasa y trimetilamina deshidrogenasa), y con otras aceptadoras (por ejemplo, sarcosina deshidrogenasa, dimetilglicina deshidrogenasa, L-pipecolato deshidrogenasa, nicotina deshidrogenasa, metilglutamato deshidrogenasa, espermidina deshidrogenasa, prolina deshidrogenasa, metilentetrahidrometanopterina deshidrogenasa, 5,10-metilentetrahidrometanopterina reductasa, fitocinina deshidrogenasa y D-prolina deshidrogenasa).

45 Las oxidorreductasas que actúan sobre NADH o NADPH pueden incluir, pero no se limitan a, aquellas con  $\text{NAD}^+$  o  $\text{NADP}^+$  como aceptador (por ejemplo,  $\text{NAD(P)}^+$  transhidrogenasa (B-específica) y  $\text{NAD(P)}^+$  transhidrogenasa (AB-específica)), con una proteína hemo como aceptadora (por ejemplo, citocromo- $b_5$  reductasa, NADPH-hemoproteína reductasa, NADPH-citocromo- $c_2$  reductasa y leghemoglobina reductasa), con oxígeno como aceptador (por ejemplo,  $\text{NAD(P)H}$  oxidasa), con una quinina o compuesto similar como aceptador (por ejemplo,  $\text{NAD(P)H}$  deshidrogenasa (quinona), NADH:ubiquinona reductasa (translocadora de  $\text{H}^+$ ), monodeshidroascorbato reductasa (NADH), NADPH:quinona reductasa, *p*-benzoquinona reductasa (NADPH), 2-hidroxi-1,4-benzoquinona reductasa, NADH:ubiquinona reductasa (transportadora de  $\text{Na}^+$ ), NADH:ubiquinona reductasa (no electrogénica) y NADPH deshidrogenasa (quinona)), con un grupo nitrogenado como aceptador (por ejemplo, trimetilamina-N-óxido reductasa), con una proteína hierro-azufre como aceptadora, con una flavina como aceptadora y con otras aceptadoras (por ejemplo, NADPH deshidrogenasa, NADH deshidrogenasa, NADH deshidrogenasa (quinona)).

55 Las oxidorreductasas que actúan sobre otros compuestos nitrogenados como donantes pueden incluir, pero no se limitan a, aquellas con  $\text{NAD}^+$  o  $\text{NADP}^+$  como aceptador (por ejemplo, nitrato reductasa (NADH), nitrato reductasa [ $\text{NAD(P)H}$ ], nitrato reductasa (NADPH), nitrito reductasa [ $\text{NAD(P)H}$ ], hiponitrito reductasa, azobenceno reductasa, GMP reductasa, nitroquinolina-N-óxido reductasa, hidroxilamina reductasa (NADH), 4-(dimetilamino)fenilazobenceno reductasa, N-hidroxi-2-acetamidofluoreno reductasa,  $\text{preQ}_1$  reductasa y óxido nítrico reductasa [ $\text{NAD(P)}$ , formadora de óxido nitroso]), con un citocromo como aceptador (por ejemplo, nitrito reductasa (formadora de NO), nitrito reductasa (citocromo, formadora de amoníaco), trimetilamina-N-óxido reductasa (citocromo c), óxido nitroso reductasa y óxido nítrico reductasa (citocromo c)), con oxígeno como aceptador (por ejemplo, nitroalcano oxidasa, acetilindoxil oxidasa, urato hidroxilasa independiente de factor, hidroxilamina oxidasa y 3-*aci*-nitropropanoato oxidasa), con una quinona o compuesto similar como aceptador (por ejemplo, nitrato reductasa (quinona) y óxido nítrico reductasa (menaquinol)), con un grupo nitrogenado como aceptador (por ejemplo, nitrito dismutasa), con una proteína hierro-azufre como aceptadora (por ejemplo, ferredoxina-nitrito

reductasa y ferredoxina-nitrato reductasa) y con otros aceptadores (por ejemplo, hidroxilamina reductasa, nitrato reductasa e hidracina oxidorreductasa).

5 Las oxidorreductasas que actúan sobre un grupo de donantes de azufre pueden incluir, pero no se limitan a, aquellas con  $\text{NAD}^+$  o  $\text{NADP}^+$  como aceptador (por ejemplo, sulfito reductasa ( $\text{NADPH}$ ), hipotaurina deshidrogenasa, dihidrolipoil deshidrogenasa, 2-oxopropil-CoM reductasa (carboxilante), cistina reductasa, glutatión-disulfuro reductasa, proteína-disulfuro reductasa, tiorredoxina-disulfuro reductasa, CoA-glutatión reductasa, asparagusato reductasa, tripanotión-disulfuro reductasa, bis- $\gamma$ -glutamilcistina reductasa, CoA-disulfuro reductasa, micotona reductasa, glutatión amida reductasa y dimetilsulfona reductasa), con un citocromo como aceptador (por ejemplo, sulfito deshidrogenasa, tiosulfato deshidrogenasa, sulfuro-citocromo-c reductasa (flavocitocromo c), y sulfuro de dimetilo:citocromo  $c_2$  reductasa), con oxígeno como aceptador (por ejemplo, sulfito oxidasa, tiol oxidasa, glutatión oxidasa, metanotiol oxidasa, prenilcisteína oxidasa y farnesilcisteína liasa), con un disulfuro como aceptador (por ejemplo, glutatión-homocistina transhidrogenasa, proteína-disulfuro reductasa (glutatión), glutatión-CoA-glutatión transhidrogenasa, glutatión-cistina transhidrogenasa, enzima-tiol transhidrogenasa (glutatión-disulfuro), fosfoadenil-sulfato reductasa (tiorredoxina), adenilil-sulfato reductasa (glutatión), adenilil-sulfato reductasa (tiorredoxina), péptido-(S)-S-óxido de metionina reductasa, péptido-(R)-S-óxido de metionina reductasa, (S)-S-óxido de L-metionina reductasa, y (R)-S-óxido de L-metionina reductasa), con una quinina o un compuesto similar como aceptador (por ejemplo, glutatión deshidrogenasa (ascorbato), tiosulfato deshidrogenasa (quinona), dimetilsulfóxido reductasa y sulfuro:quinona reductasa), con un grupo nitrogenado como aceptador, con una proteína hierro-azufre como aceptadora (por ejemplo, sulfito reductasa (ferredoxina) y ferredoxina:tiorredoxina reductasa), con otros aceptadores conocidos (por ejemplo, CoB-CoM heterodisulfuro reductasa y sulfurredoxina) y con otros aceptadores (por ejemplo, sulfito reductasa, adenilil-sulfato reductasa e hidrogenosulfito reductasa).

25 Las oxidorreductasas que actúan sobre un grupo de donantes hemo pueden incluir, pero no se limitan a, aquellas con oxígeno como aceptador (por ejemplo, citocromo-c oxidasa), con un grupo nitrogenado como aceptador (por ejemplo, nitrato reductasa (citocromo)) y con otros aceptadores (por ejemplo, hierro-citocromo-c reductasa).

30 Las oxidorreductasas que actúan sobre difenoles y sustancias relacionadas como donantes pueden incluir, pero no se limitan a, aquellas con  $\text{NAD}^+$  o  $\text{NADP}^+$  como aceptador (por ejemplo, *trans*-acenafteno-1,2-diol deshidrogenasa), con un citocromo como aceptador (por ejemplo, L-ascorbato-citocromo- $b_5$  reductasa y ubiquinol-citocromo-c reductasa), con oxígeno como aceptador (por ejemplo, catecol oxidasa, lacasa, L-ascorbato oxidasa, o-aminofenol oxidasa, 3-hidroxiantranilato oxidasa, rifamicina-B oxidasa, fotosistema II, ubiquinol oxidasa (transportadora de  $\text{H}^+$ ), ubiquinol oxidasa y menaquinol oxidasa (transportadora de  $\text{H}^+$ )), y con otros aceptadores (por ejemplo, plastoquinol-plastocianina reductasa, ribosildihidronicotinamida deshidrogenasa (quinona) y violaxantina desepoxidasa).

35 Las oxidorreductasas que actúan sobre peróxido como aceptador pueden incluir, pero no se limitan a, peroxidases (por ejemplo,  $\text{NADH}$  peroxidasa,  $\text{NADPH}$  peroxidasa, peroxidasa de ácidos grasos, citocromo-c peroxidasa, catalasa, peroxidasa, yoduro peroxidasa, glutatión peroxidasa, cloruro peroxidasa, L-ascorbato peroxidasa, fosfolípido-hidroperóxido glutatión peroxidasa, manganeso peroxidasa, lignina peroxidasa, peroxirredoxina, peroxidasa versátil, glutatión peroxidasa dependiente de amida, bromuro peroxidasa, peroxidasa decolorante de colorante, prostamida/prostaglandina  $F_2\alpha$  sintasa, catalasa-peroxidasa) y aquellas con  $\text{H}_2\text{O}_2$  como aceptador, del que se incorpora un átomo de oxígeno en el producto (por ejemplo, peroxigenasa no específica, mieloperoxidasa, peroxigenasa de semilla vegetal y peroxigenasa de ácidos grasos).

45 Las oxidorreductasas que actúan sobre el hidrógeno como donante pueden incluir, pero no se limitan a, aquellas con  $\text{NAD}^+$  o  $\text{NADP}^+$  como aceptador (por ejemplo, hidrógeno deshidrogenasa, hidrógeno deshidrogenasa ( $\text{NADP}^+$ ) e hidrogenasa ( $\text{NAD}^+$ , ferredoxina)), con un citocromo como aceptador (por ejemplo citocromo- $c_3$  hidrogenasa), con un quinina o compuesto similar como aceptador (por ejemplo, hidrógeno:quinona oxidorreductasa), con una proteína hierro-azufre como aceptadora (por ejemplo, ferredoxina hidrogenasa), con otros aceptadores conocidos (por ejemplo, coenzima  $F_{420}$  hidrogenasa, 5,10-meteniltetrahidrometanopterina hidrogenasa, y *Methanosarcina*-fenacina hidrogenasa), y con otros aceptadores (por ejemplo, hidrogenasa (aceptadora)).

55 Las oxidorreductasas que actúan sobre donantes únicos con incorporación de oxígeno molecular (oxigenasas) pueden incluir, pero no se limitan a, aquellas con incorporación de dos átomos de oxígeno (por ejemplo, catecol 1,2-dioxigenasa, catecol 2,3-dioxigenasa, protocatecuato 3,4-dioxigenasa, gentisato 1,2-dioxigenasa, homogentisato 1,2-dioxigenasa, 3-hidroxiantranilato 3,4-dioxigenasa, protocatecuato 4,5-dioxigenasa, 2,5-dihidroxipiridina 5,6-dioxigenasa, 7,8-dihidroxiquinurenato 8,8a-dioxigenasa, triptófano 2,3-dioxigenasa, linoleato 13S-lipoxigenasa, ascorbato 2,3-dioxigenasa, 2,3-dihidroxibenzoato 3,4-dioxigenasa, 3,4-dihidroxifenilacetato 2,3-dioxigenasa, 3-carboxietilcatecol 2,3-dioxigenasa, indol 2,3-dioxigenasa, azufre dioxigenasa, cisteamina dioxigenasa, cisteína dioxigenasa, cafeína 3,4-dioxigenasa, 2,3-dihidroxiindol 2,3-dioxigenasa, quercetina 2,3-dioxigenasa, 3,4-dihidroxi-9,10-secoandrostano-1,3,5(10)-trieno-9,17-diona 4,5-dioxigenasa, péptido-triptófano 2,3-dioxigenasa, 4-hidroxifenilpiruvato dioxigenasa, 2,3-dihidroxibenzoato 2,3-dioxigenasa, estizolobato sintasa, estizolobinato sintasa, araquidonato 12-lipoxigenasa, araquidonato 15-lipoxigenasa, araquidonato 5-lipoxigenasa, pirogalol 1,2-oxigenasa, cloridazona-catecol dioxigenasa, hidroxiquinol 1,2-dioxigenasa, 1-hidroxi-2-naftoato 1,2-dioxigenasa, bifenil-2,3-diol 1,2-dioxigenasa, araquidonato 8-lipoxigenasa, 2,4'-dihidroxiacetofenona dioxigenasa, lignostilbeno  $\alpha\beta$ -dioxigenasa, linoleato diol sintasa, linoleato 11-lipoxigenasa, 4-hidroxi-mandelato sintasa, 3-hidroxi-4-oxoquinolina 2,4-dioxigenasa,

3-hidroxi-2-metil-quinolin-4-ona 2,4-dioxigenasa, clorito O<sub>2</sub>-liasa, enzima de escisión de acetilacetona, 9-*cis*-epoxicarotenoide dioxigenasa, indolamina 2,3-dioxigenasa, acirreductona dioxigenasa (que requiere Ni<sup>2+</sup>), acirreductona dioxigenasa [que requiere hierro(II)], azufre oxigenasa/reductasa, 1,2-dihidroxi-naftaleno dioxigenasa, galato dioxigenasa, linoleato 9*S*-lipoxigenasa y toruleno dioxigenasa), con incorporación de un átomo de oxígeno (monooxigenasas internas u oxidasas de función mixta internas) (por ejemplo, arginina 2-monooxigenasa, lisina 2-monooxigenasa, triptófano 2-monooxigenasa, lactato 2-monooxigenasa, *Renilla*-luciferina 2-monooxigenasa, *Cypridina*-luciferina 2-monooxigenasa, *Photinus*-luciferina 4-monooxigenasa (hidrolización del ATP), *Watasenia*-luciferina 2-monooxigenasa, fenilalanina 2-monooxigenasa, apo-β-carotenoide-14',13'-dioxigenasa, *Oplophorus*-luciferina 2-monooxigenasa, 3,4-dihidroxi-fenilalanina desaminasa oxidativa, nitronato monooxigenasa, dicloroarcirriaflavina A sintasa, luciferasa de dinoflagelados y 2-oxoglutarato dioxigenasa (formadora de etileno)), inositol oxigenasa y triptófano 2'-dioxigenasa.

Las oxidorreductasas que actúan sobre donantes emparejados, con incorporación o reducción de oxígeno molecular pueden incluir, pero no se limitan a, aquellas con ascorbato como un donante, con pteridina reducida como un donante, con 2-oxoglutarato como un donante, e incorporación de un átomo de oxígeno cada una en ambos donantes (por ejemplo, γ-butirotbetaína dioxigenasa, procolágeno-prolina dioxigenasa, pirimidina-desoxinucleósido 2'-dioxigenasa, procolágeno-lisina 5-dioxigenasa, timina dioxigenasa, procolágeno-prolina 3-dioxigenasa, trimetilisina dioxigenasa, flavanona 3-dioxigenasa, pirimidina-desoxinucleósido 1'-dioxigenasa, hiosciamina (6*S*)-dioxigenasa, giberelina-44 dioxigenasa, giberelina 2β-dioxigenasa, 6β-hidroxi-hiosciamina epoxidasa, giberelina 3β-dioxigenasa, péptido-aspartato β-dioxigenasa, taurina dioxigenasa, fitanoil-CoA dioxigenasa, leucocianidina oxigenasa, desacetoxivindolina 4-hidroxilasa, clavaminato sintasa, flavona sintasa, flavonol sintasa, 2'-dioxigenasa del ácido 2'-desoximugineico, 3-dioxigenasa del ácido mugineico, desacetoxicefalosporina-C hidroxilasa, [histona-H3]-lisina-36 desmetilasa, prolina 3-hidroxilasa, dioxigenasa del factor inducible por hipoxia-prolina, dioxigenasa del factor inducible por hipoxia-asparagina, tebaína 6-*O*-desmetilasa, codeína 3-*O*-desmetilasa, desmetilasa oxidativa del ADN y 2-oxoglutarato/L-arginina monooxigenasa/descarboxilasa (formadora de succinato)), con NADH o NADPH como un donante, e incorporación de dos átomos de oxígeno en un donante (por ejemplo, antranilato 1,2-dioxigenasa (desaminante, descarboxilante), benceno 1,2-dioxigenasa, 3-hidroxi-2-metilpiridincarboxilato dioxigenasa, 5-piridoxato dioxigenasa, ftalato 4,5-dioxigenasa, 4-sulfobenzoato 3,4-dioxigenasa, 4-clorofenilacetato 3,4-dioxigenasa, benzoato 1,2-dioxigenasa, tolueno dioxigenasa, naftaleno 1,2-dioxigenasa, 2-clorobenzoato 1,2-dioxigenasa, 2-aminobenzenosulfonato 2,3-dioxigenasa, tereftalato 1,2-dioxigenasa, 2-hidroxi-quinolina 5,6-dioxigenasa, óxido nítrico dioxigenasa, bifenil 2,3-dioxigenasa, 3-fenilpropionato dioxigenasa, feoforbida a oxigenasa, benzoi-CoA 2,3-dioxigenasa y carbazol 1,9a-dioxigenasa), con NADH o NADPH como un donante, e incorporación de un átomo de oxígeno (por ejemplo, salicilato 1-monooxigenasa, 4-hidroxibenzoato 3-monooxigenasa, melilotato 3-monooxigenasa, imidazolacetato 4-monooxigenasa, orcinol 2-monooxigenasa, fenol 2-monooxigenasa, monooxigenasa que contiene flavina, quinurenina 3-monooxigenasa, 2,6-dihidroxipiridina 3-monooxigenasa, *trans*-cinamato 4-monooxigenasa, benzoato 4-monooxigenasa, calcidiol 1-monooxigenasa, *trans*-cinamato 2-monooxigenasa, colestano-triol 26-monooxigenasa, ciclopentanona monooxigenasa, colesterol 7α-monooxigenasa, 4-hidroxifenilacetato 1-monooxigenasa, taxifolina 8-monooxigenasa, 2,4-diclorofenol 6-monooxigenasa, flavonoide 3'-monooxigenasa, ciclohexanona monooxigenasa, 3-hidroxibenzoato 4-monooxigenasa, 3-hidroxibenzoato 6-monooxigenasa, metano monooxigenasa (soluble), fosfatidilcolina 12-monooxigenasa, 4-aminobenzoato 1-monooxigenasa, 3,9-dihidroxiptero-carpano 6a-monooxigenasa, 4-nitrofenol 2-monooxigenasa, leucotrieno-B<sub>4</sub> 20-monooxigenasa, 2-nitrofenol 2-monooxigenasa, albendazol monooxigenasa, 4-hidroxibenzoato 3-monooxigenasa [NAD(P)H], leucotrieno-E<sub>4</sub> 20-monooxigenasa, antranilato 3-monooxigenasa (desaminante), 5-*O*-(4-cumaroil)-D-quinato 3'-monooxigenasa, metiltetrahidroprotoberberina 14-monooxigenasa, anhidrotetraciclina monooxigenasa, óxido nítrico sintasa, antraniloil-CoA monooxigenasa, tirosina *N*-monooxigenasa, cuestina monooxigenasa, 2-hidroxibifenil 3-monooxigenasa, (-)-mentol monooxigenasa, (S)-limoneno 3-monooxigenasa, (S)-limoneno 6-monooxigenasa, (S)-limoneno 7-monooxigenasa, pentaclorofenol monooxigenasa, 6-oxocineol deshidrogenasa, isoflavona 3'-hidroxilasa, 4'-metoxiisoflavona 2'-hidroxilasa, oxoesteroide monooxigenasa, protopina 6-monooxigenasa, dihidrosanguinarina 10-monooxigenasa, dihidroquelirrubina 12-monooxigenasa, benzoi-CoA 3-monooxigenasa, L-lisina 6-monooxigenasa (NADPH), 27-hidroxicolesterol 7α-monooxigenasa, 2-hidroxi-quinolina 8-monooxigenasa, 4-hidroxi-quinolina 3-monooxigenasa, 3-hidroxifenilacetato 6-hidroxilasa, 4-hidroxibenzoato 1-hidroxilasa, 2-hidroxiciclohexanona 2-monooxigenasa, quinina 3-monooxigenasa, 4-hidroxifenilacetaldéhidó oxima monooxigenasa, alqueno monooxigenasa, esteroil 14-desmetilasa, *N*-metilcoclaurina 3'-monooxigenasa, metilesterol monooxigenasa, tabersonina 16-hidroxilasa, 7-desoxiloganina 7-hidroxilasa, vinorina hidroxilasa, taxano 10β-hidroxilasa, taxano 13a-hidroxilasa, *ent*-kaureno oxidasa, oxidasa del ácido *ent*-kaurenoico, (*R*)-limoneno 6-monooxigenasa, ciclase del éster monometílico (oxidativo) de la magnesio-protoporfirina IX, vainillato monooxigenasa, precorrina-3B sintasa, 4-hidroxiacetofenona monooxigenasa, gliceolina sintasa, 2-hidroxiisoflavanona sintasa, licodiona sintasa, flavonoide 3',5'-hidroxilasa, isoflavona 2'-hidroxilasa, zeaxantina epoxidasa, desoxisarpagina hidroxilasa, fenilacetona monooxigenasa, 8'-hidroxilasa del ácido (+)-abscísico, litocolato 6β-hidroxilasa, 7α-hidroxicolest-4-en-3-ona 12α-hidroxilasa, 5β-colestano-3α,7α-diol 12α-hidroxilasa, tauroquenodesoxicolato 6α-hidroxilasa, colesterol 24-hidroxilasa, 24-hidroxicolesterol 7α-hidroxilasa, 25-hidroxicolesterol 7α-hidroxilasa, senecionina *N*-oxigenasa, psoraleno sintasa, 8-dimetilalilnaringenina 2'-hidroxilasa, (+)-mentofurano sintasa, monooxigenasa de la cetona de monoterpene monocíclico, *epi*-isozizaeno 5-monooxigenasa, limoneno 1,2-monooxigenasa, abietadieno hidroxilasa, abietadienol hidroxilasa, geranilgeraniol 18-hidroxilasa, metanosulfonato monooxigenasa, 3-*epi*-6-desoxocatasterona 23-monooxigenasa, urato dependiente de

FAD hidroxilasa, 6-hidroxicotinato 3-monooxigenasa, angelicina sintasa, geranilhidroquinona 3"-hidroxilasa, isoleucina *N*-monooxigenasa, valina *N*-monooxigenasa, 5-epiaristoloueno 1,3-dihidroxilasa, costunólido sintasa, premnaspirodieno oxigenasa, clorofilida-*a* oxigenasa, germacreno A hidroxilasa, fenilalanina *N*-monooxigenasa, triptófano *N*-monooxigenasa, vitamina D<sub>3</sub> 24-hidroxilasa, 3-(3-hidroxifenil)propanoato hidroxilasa, 7-metilxantina desmetilasa, β-caroteno 3-hidroxilasa, pirrol-2-carboxilato monooxigenasa, dimetilsulfuro monooxigenasa y escualeno monooxigenasa, con flavina reducida o flavoproteína como un donante, e incorporación de un átomo de oxígeno (por ejemplo, monooxigenasa no específica, alcanal monooxigenasa (unida a FMN), alcanosulfonato monooxigenasa, triptófano 7-halogenasa, antranilato 3-monooxigenasa (FAD), 4-hidroxifenilacetato 3-monooxigenasa y nitrilotriacetato monooxigenasa), con proteína hierro reducido-azufre como un donante, e incorporación de un átomo de oxígeno (por ejemplo, alcanfor 5-monooxigenasa, alcanfor 1,2-monooxigenasa, alcanol 1-monooxigenasa, esteroide 11β-monooxigenasa, corticosterona 18-monooxigenasa, colesterol monooxigenasa (escisión de cadena lateral), colina monooxigenasa y esteroide 15β-monooxigenasa), con pteridina reducida como un donante, e incorporación de un átomo de oxígeno (por ejemplo, fenilalanina 4-monooxigenasa, tirosina 3-monooxigenasa, antranilato 3-monooxigenasa, triptófano 5-monooxigenasa, alquilglicerol monooxigenasa y mandelato 4-monooxigenasa), con ascorbato reducido como un donante, e incorporación de un átomo de oxígeno (por ejemplo, dopamina β-monooxigenasa, peptidilglicina monooxigenasa y aminociclopropanocarboxilato oxidasa), con otro compuesto como un donante, e incorporación de un átomo de oxígeno (por ejemplo, monofenol monooxigenasa, CMP-*N*-acetilneuraminato monooxigenasa y metano monooxigenasa (partículas)), con oxidación de un par de donantes que da como resultado la reducción de oxígeno molecular a dos moléculas de agua (por ejemplo, estearoil-CoA 9-desaturasa, acil-[proteína transportadora de acilo] desaturasa, linoleoil-CoA desaturasa, desaturasa de los ácidos grasos Δ<sup>8</sup>, desaturasa de los ácidos grasos Δ<sup>11</sup>, desaturasa de los ácidos grasos A<sup>12</sup> y epoxidasa del ácido (*S*)-2-hidroxi-propilfosfónico), con 2-oxoglutarato como un donante, y el otro deshidrogenado (por ejemplo, desacetoxicefalosporina-C sintasa), con NADH o NADPH como un donante, y el otro deshidrogenado (por ejemplo, (*S*)-estilopina sintasa, (*S*)-queilantifolina sintasa, berbaminina sintasa, salutaridina sintasa, (*S*)-canadina sintasa, latosterol oxidasa, biflaviolina sintasa, pseudobaptigenina sintasa), y otras que incluyen prostaglandina-endoperóxido sintasa, quinurenina 7,8-hidroxilasa, hemo oxigenasa, progesterona monooxigenasa, esteroide 17α-monooxigenasa, esteroide 21-monooxigenasa, estradiol 6β-monooxigenasa, 4-androsten-3,17-diona monooxigenasa, progesterona 11α-monooxigenasa, 4-metoxibenzoato monooxigenasa (*O*-desmetilante), plasmaniletanolamina desaturasa, filoquinona monooxigenasa (2,3-epoxidante), *L*atia-luciferina monooxigenasa (desmetilante), ecdisona 20-monooxigenasa, 3-hidroxibenzoato 2-monooxigenasa, esteroide 9α-monooxigenasa, 2-hidroxipiridina 5-monooxigenasa, juglona 3-monooxigenasa, linalool 8-monooxigenasa, desoxihipusina monooxigenasa, miristoil-CoA 11-(*E*) desaturasa, miristoil-CoA 11-(*Z*) desaturasa, deshidrogenasa de los ácidos grasos Δ<sup>12</sup>, monoprenil isoflavona epoxidasa, tiofeno-2-carbonil-CoA monooxigenasa, β-caroteno 15,15-monooxigenasa, taxadieno 5α-hidroxilasa, colesterol 25-hidroxilasa, amoniaco monooxigenasa, 5,6-dimetilbencimidazol sintasa, *todo-trans*-8'-apo-β-carotenal 15,15'-oxigenasa, zeaxantina 7,8-dioxigenasa, β-amirina 24-hidroxilasa, diapolicopeno oxigenasa y caroteno ε-monooxigenasa.

Las oxidorreductasas que actúan sobre superóxido como aceptador pueden incluir, pero no se limitan a, superóxido dismutasa y superóxido reductasa.

Las oxidorreductasas que actúan sobre iones metálicos pueden incluir, pero no se limitan a, aquellas con NAD<sup>+</sup> o NADP<sup>+</sup> como aceptador (por ejemplo, mercurio(II) reductasa, transferrina diférrica reductasa, acuacobalamina reductasa, cob(II)alamina reductasa, acuacobalamina reductasa (NADPH), cianocobalamina reductasa (eliminadora de cianuro), reductasa de quelato férrico (NADH), [metionina sintasa] reductasa y reductasa de quelato férrico (NADPH)), con oxígeno como aceptador (por ejemplo, ferroxidasa), con quinona o compuesto similar como aceptador (por ejemplo, ascorbato ferrirreductasa (transmembrana)), con flavina como aceptador (por ejemplo, *a,c*-diamida del ácido cob(II)irínico reductasa), con otros aceptadores (por ejemplo, hierro:rusticianina reductasa).

Las oxidorreductasas que actúan sobre los grupos CH o CH<sub>2</sub> pueden incluir, pero no se limitan a, aquellas con NAD<sup>+</sup> o NADP<sup>+</sup> como aceptador (por ejemplo, CDP-4-deshidro-6-desoxiglucosa reductasa, 4-hidroxi-3-metilbut-2-enil difosfato reductasa, leucoantocianidina reductasa, xantina deshidrogenasa y nicotinato deshidrogenasa), con un citocromo como aceptador (por ejemplo, nicotinato deshidrogenasa (citocromo)), con oxígeno como aceptador (por ejemplo, pteridina oxidasa, xantina oxidasa y 6-hidroxicotinato deshidrogenasa), con un disulfuro como aceptador (por ejemplo, ribonucleósido-difosfato reductasa y ribonucleósido-trifosfato reductasa), con una quinina o compuesto similar como aceptador (por ejemplo, fenilacetil-CoA deshidrogenasa y cafeína deshidrogenasa), con una proteína hierro-azufre como aceptadora (por ejemplo, (*E*)-4-hidroxi-3-metilbut-2-enil-difosfato sintasa) y con otros aceptadores (por ejemplo, 4-metilfenol deshidrogenasa (hidroxilante), etilbenceno hidroxilasa, 3α,7α,12α-trihidroxi-5β-colestanol-CoA 24-hidroxilasa, uracilo/timina deshidrogenasa y 7α-deshidroxilasa del ácido biliar).

Las oxidorreductasas que actúan sobre las proteínas hierro-azufre como donantes pueden incluir, pero no se limitan a, aquellas con NAD<sup>+</sup> o NADP<sup>+</sup> como aceptador (por ejemplo, rubredoxina-NAD<sup>+</sup> reductasa, ferredoxina-NADP<sup>+</sup> reductasa, ferredoxina-NAD<sup>+</sup> reductasa y rubredoxina-NAD(P)<sup>+</sup> reductasa), con H<sup>+</sup> como aceptador, y con dinitrógeno como aceptador (por ejemplo, nitrogenasa).

Las oxidorreductasas que actúan sobre flavodoxina reducida como donante pueden incluir, pero no se limitan a,

aquellas con dinitrógeno como aceptador (por ejemplo, nitrogenasa (flavodoxina)).

Las oxidorreductasas que actúan sobre fósforo o arsénico en donantes pueden incluir, pero no se limitan a, aquellas con NAD(P)<sup>+</sup> como aceptador (por ejemplo, fosfonato deshidrogenasa), con un citocromo como aceptador (por ejemplo, arseniato reductasa (citocromo c)), con disulfuro como aceptador (por ejemplo, arseniato reductasa (glutarredoxina), metilarsonato reductasa y micorredoxina), con una proteína de cobre como aceptadora (por ejemplo, arseniato reductasa (azurina)) y con otros aceptadores (por ejemplo, arseniato reductasa (donante)).

Las oxidorreductasas que actúan sobre X-H e Y-H para formar un enlace X-Y pueden incluir, pero no se limitan a, aquellas con oxígeno como aceptador (por ejemplo, isopenicilina-N sintasa, columbamina oxidasa, reticulina oxidasa, sulocrina oxidasa [formadora de (+)-bisdesclorogeodina], sulocrina oxidasa [formadora de (-)-bisdesclorogeodina] y aureusidina sintasa), con un disulfuro como aceptador (por ejemplo, D-prolina reductasa (ditiol), glicina reductasa, sarcosina reductasa y betaína reductasa), y con otros aceptadores (por ejemplo, β-ciclopiazonato deshidrogenasa).

Las oxidorreductasas que actúan sobre halógeno en los donantes pueden incluir, pero no se limitan a, aquellas con NAD<sup>+</sup> o NADP<sup>+</sup> como aceptador (por ejemplo, yodotirosina desyodasa).

Otras oxidorreductasas pueden incluir, pero no se limitan a, clorato reductasa, pirogalol hidroxiltransferasa, azufre reductasa, enzima activadora de la [formiato-C-acetiltransferasa], deshalogenasa reductiva de tetracloroetano, selenato reductasa, tiroxina 5'-desyodasa, tiroxina 5-desyodasa y fotosistema I).

Las oxidorreductasas adecuadas incluyen diversas oxidasas, lacasas, peroxidadas y haloperoxidasas de azúcares.

#### Glucosilasas

Las glucosilasas incluyen glucosidasas, es decir, enzimas que hidrolizan compuestos de O- y S-glucosilo, que incluyen, pero no se limitan a, α-amilasa, β-amilasa, glucano 1,4-α-glucosidasa, celulasa, endo-1,3(4)-β-glucanasa, inulinasa, endo-1,4-β-xilanasa, oligo-1,6-glucosidasa, dextranasa, quitinasa, poligalacturonasa, lizozima, exo-α-sialidasa, α-glucosidasa, β-glucosidasa, α-galactosidasa, β-galactosidasa, α-manosidasa, β-manosidasa, β-fructofuranosidasa, α,α-trehalasa, β-glucuronidasa, endo-1,3-β-xilanasa, amilo-1,6-glucosidasa, hialuronoglucosaminidasa, hialuronoglucuronidasa, xilano 1,4-β-xilosidasa, β-D-fucosidasa, glucano endo-1,3-β-D-glucosidasa, α-L-ramnosidasa, pululanasa, GDP-glucosidasa, β-L-ramnosidasa, fucoidanasa, glucosilceramidasa, galactosilceramidasa, galactosilgalactosilglucosilceramidasa, sacarosa α-glucosidasa, α-N-acetilgalactosaminidasa, α-N-acetilglucosaminidasa, α-L-fucosidasa, β-L-N-acetilhexosaminidasa, β-N-acetilgalactosaminidasa, ciclomaltodextrinasa, α-N-arabinofuranosidasa, glucuronosil-disulfoglucosamina glucuronidasa, isopululanasa, glucano 1,3-β-glucosidasa, glucano endo-1,3-α-glucosidasa, glucano 1,4-α-maltotetraohidrolasa, micodextranasa, glicosilceramidasa, 1,2-α-L-fucosidasa, 2,6-β-fructan 6-levanbiohidrolasa, levanasa, quercitrinasa, galacturano 1,4-α-galacturonidasa, isoamilasa, glucano 1,6-α-glucosidasa, glucano endo-1,2-β-glucosidasa, xilano 1,3-β-xilosidasa, liqueninasa, glucano 1,4-β-glucosidasa, glucano endo-1,6-β-glucosidasa, L-iduronidasa, manano 1,2-(1,3)-α-manosidasa, manano endo-1,4-β-manosidasa, fructano β-fructosidasa, β-agarasa, exo-poli-α-galacturonosidasa, κ-carrageninasa, glucano 1,3-α-glucosidasa, 6-fosfo-β-galactosidasa, 6-fosfo-β-glucosidasa, polisacárido capsular endo-1,3-α-galactosidasa, β-L-arabinosidasa, arabinogalactano endo-1,4-β-galactosidasa, celulosa 1,4-β-celobiosidasa (extremo no reductor), peptidoglucano β-N-acetilmuramidasa, α,α-fosfotrehalasa, glucano 1,6-α-isomaltosidasa, dextrano 1,6-α-isomaltotriosidasa, manosil-glucoproteína endo-β-N-acetilglucosaminidasa, endo-α-N-acetilgalactosaminidasa, glucano 1,4-α-maltohexaosidasa, arabinan endo-1,5-α-L-arabinanasa, manano 1,4-manobiosidasa, manano endo-1,6-α-manosidasa, endo-1,4-β-galactosidasa de la sustancia del grupo sanguíneo, sulfato de queratano endo-1,4-β-galactosidasa, esteril-β-glucosidasa, estrictosidina β-glucosidasa, manosil-oligosacárido glucosidasa, proteína-glucosilgalactosilhidroxilisina glucosidasa, lactasa, endogalactosaminidasa, 1,3-α-L-fucosidasa, 2-desoxiglucosidasa, manosil-oligosacárido 1,2-α-manosidasa, manosil-oligosacárido 1,3-1,6-α-manosidasa, dextrano ramificado exo-1,2-α-glucosidasa, glucano 1,4-α-maltotriohidrolasa, amigdalina β-glucosidasa, prunasina β-glucosidasa, vicianina β-glucosidasa, oligoxiloglucano β-glucosidasa, polimanuronato hidrolasa, maltosa-6'-fosfato glucosidasa, endoglicosilceramidasa, 3-desoxi-2-oculosonidasa, raucafricina β-glucosidasa, coniferina β-glucosidasa, 1,6-α-L-fucosidasa, glicirricinato β-glucuronidasa, endo-α-sialidasa, glucoproteína endo-α-1,2-manosidasa, xilano α-1,2-glucuronosidasa, quitosanasa, glucano 1,4-α-maltohidrolasa, anhídrido de difructosa sintasa, neopululanasa, glucuronoarabinoxilano endo-1,4-β-xilanasa, manano exo-1,2-1,6-α-manosidasa, α-glucuronidasa, lacto-N-biosidasa, 4-α-D-((1→4)-α-D-glucano)trehalosa trehalohidrolasa, dextrinasa límite, poli(ADP-ribosa) glucohidrolasa, 3-desoxioctulosonasa, galactano 1,3-β-galactosidasa, β-galactofuranosidasa, tioglucosidasa, β-primeverosidasa, celobiohidrolasa específica del extremo reductor de oligoxiloglucano, endo-β-1,4-glucanasa específica de xiloglucano, manosilglucoproteína endo-β-manosidasa, fructano β-(2,1)-fructosidasa, fructano β-(2,6)-fructosidasa, exo-β-1,4-glucanasa específica de xiloglucano, xilanasa del extremo reductor de oligosacárido, ι-carrageninasa, α-agarasa, α-neoagaro-oligosacárido hidrolasa, β-apiosil-β-glucosidasa, λ-carrageninasa, 1,6-α-D-manosidasa, galactano endo-1,6-β-galactosidasa, exo-1,4-β-D-glucosaminidasa, heparanasa, baicaleína-β-D-

glucuronidasa, hesperidina 6-*O*- $\alpha$ -L-ramnosil- $\beta$ -D-glucosidasa, proteína *O*-GlcNAcasa, manosilglicerato hidrolasa, ramnogalacturonano hidrolasa, ramnogalacturonil insaturado hidrolasa, ramnogalacturonano galacturonohidrolasa, ramnogalacturonano hamnohidrolasa, abscisato de  $\beta$ -D-glucopiranosil  $\beta$ -glucosidasa, celulosa 1,4- $\beta$ -celobiosidasa (extremo reductor),  $\alpha$ -D-xilósido xilohidrolasa y  $\beta$ -porfiranasa.

5 Las glucosilasas también incluyen la hidrólisis de compuestos de *N*-glucosilo, que incluyen, pero no se limitan a, purina nucleosidasa, inosina nucleosidasa, uridina nucleosidasa, AMP nucleosidasa, NAD<sup>+</sup> nucleosidasa, NAD(P)<sup>+</sup> nucleosidasa, adenosina nucleosidasa, ribosilpirimidina nucleosidasa, adenosilhomocisteína nucleosidasa, pirimidina-5'-nucleótido nucleosidasa,  $\beta$ -aspartil-*N*-acetilglucosaminidasa, inosinato nucleosidasa, 1-metiladenosina nucleosidasa, NMN nucleosidasa, ADN-desoxiinosina glucosilasa, metiltioadenosina nucleosidasa, desoxirribodipirimidina endonucleosidasa, ADP-ribosilarginina hidrolasa, ADN-3-metiladenina glucosilasa I, ADN-3-metiladenina glucosilasa II, ARNr *N*-glucosilasa, ADN-formamidopirimidina glucosilasa, hidrolasa de la ADP-ribosil-  
10 [dinitrógeno reductasa], *N*-metil nucleosidasa, fualosina hidrolasa, uracil-ADN glucosilasa, uracil-ADN bicatenario glucosilasa y timina-ADN glucosilasa, y la hidrólisis de compuestos de *S*-glucosilo.

### 15 Hidrolasas

Las hidrolasas de EC 3 incluyen, pero no se limitan a: las que actúan sobre enlaces éster; glucosilasas, las que actúan sobre enlaces éter; las que actúan sobre enlaces peptídicos (peptidasas/proteasas); las que actúan sobre  
20 enlaces carbono-nitrógeno, distintos de los enlaces peptídicos; las que actúan sobre anhídridos de ácido; las que actúan sobre enlaces carbono-carbono; las que actúan sobre enlaces de haluro; las que actúan sobre enlaces fósforo-nitrógeno; las que actúan sobre enlaces azufre-nitrógeno; las que actúan sobre enlaces carbono-fósforo; las que actúan sobre enlaces azufre-azufre; y las que actúan sobre enlaces carbono-azufre.

25 Las hidrolasas de EC 3 que actúan sobre enlaces éster pueden incluir, pero no se limitan a, éster carboxílico hidrolasas (por ejemplo lipasas que incluyen triacilglicerol lipasa, fosfolipasa A<sub>1</sub>, fosfolipasa A<sub>2</sub>, lisofosfolipasa, acilglicerol lipasa, galactolipasa, lipoproteína lipasa; y diéster fosfórico hidrolasas incluyendo fosfolipasa C, fosfolipasa D, fosfoinositido fosfolipasa C, glucosilfosfatidilinositol fosfolipasa D y fosfolipasa D que hidroliza *N*-acetilfosfatidiletanolamina) y glucosilasas, incluyendo glucosidasas, es decir, enzimas que hidrolizan compuestos de  
30 *O*- y *S*-glucosilo, por ejemplo amilasas (incluyendo alfa-amilasa, beta-amilasa e isoamilasa), celulosas y mananasas.

Las lipasas y cutinasas adecuadas incluyen las de origen bacteriano o fúngico. Se incluyen mutantes modificados químicamente o de ingeniería proteínica. Los ejemplos incluyen lipasa de *Thermomyces*, por ejemplo, de *T. lanuginosus* (anteriormente denominada *Humicola lanuginosa*) como se describe en el documento EP 258 068 (y la patente de EE. UU. n.º 4.810.414) y el documento EP 305 216 (y las patentes de EE. UU. n.ºs 5.766.912; 5.874.558; 5.965.384; 7.517.668; 5.536.661 y 5.863.759), cutinasa de *Humicola*, por ejemplo *H. insolens* como se describe en el documento WO 96/13580, una lipasa de *Pseudomonas*, por ejemplo, de *P. alcaligenes* o *P. pseudoalcaligenes* (documento EP 218 272, patentes de EE. UU. n.ºs 5.766.912; 5.863.759; 5.874.558; 5.965.384; 7.517.668 y 5.536.661), *P. cepacia* (documento EP 331 376 y patente de EE. UU. n.º 5.290.694), *P. stutzeri* (documento GB 1.372.034), *P. fluorescens*, cepa SD 705 de *Pseudomonas sp.* (documento WO 95/06720, patente de EE. UU. n.º 5.827.718, documento WO 96/27002 y patente de EE. UU. n.º 5.942.431), *P. wisconsinensis* (documento WO 96/12012), una lipasa de *Bacillus*, por ejemplo, de *B. subtilis* (Dartois *et al.*, 1993, Biochemica et Biophysica Acta, 1131: 253-360), *B. stearothermophilus* (documento JP 64/744992) o *B. pumilus* (documento WO 91/16422 y la patente de EE. UU. n.º 5.427.936). Otros ejemplos son variantes de lipasa tales como las descritas en los documentos WO 92/05249, WO 94/01541, EP 407 225, EP 260 105, WO 95/35381, WO 96/00292, WO 95/30744, WO 94/25578, WO 95/14783, WO 95/22615, WO 97/04079, WO 97/07202, WO 00/060063, WO2007/087508, WO 2009/109500 y las patentes de EE. UU. n.ºs 5.892.013; 5.869.438; 5.976.855; 6.020.180; 6.074.863; 5.658.871; 4.760.025; 5.155.033; 5.182.204; 5.185.258; 5.204.015; 5.244.791; 5.264.366; 5.310.675; 5.316.941; 5.346.823; 5.352.594; 5.371.008; 5.371.190; 5.411.873; 5.441.882; 5.472.855; 5.652.136; 5.700.676; 5.763.257; 5.801.038; 5.939.315; 5.955.340; 5.972.682; 6.465.235; y RE34.606. Las enzimas lipasas disponibles en el mercado preferentes incluyen Lipolase™, Lipolase Ultra™ y Lipex™; Lecitase™, Lipolex™; Lipoclean™, Lipoprime™ (Novozymes A/S). Otras lipasas disponibles en el mercado incluyen Lumafast (Genencor Int Inc); Lipomax (Gist-Brocades/Genencor Int Inc) y lipasa de *Bacillus sp* de Solvay.

55 Las amilasas adecuadas ( $\alpha$  y/o  $\beta$ ) incluyen las de origen bacteriano o fúngico. Se incluyen mutantes modificados químicamente o de ingeniería proteínica. Las amilasas incluyen, por ejemplo,  $\alpha$ -amilasas obtenidas de *Bacillus*, por ejemplo, una cepa especial de *Bacillus licheniformis*, descrita con más detalle en el documento GB 1.296.839. Los ejemplos de amilasas útiles son las variantes descritas en los documentos WO 94/02597, WO 94/18314, WO 96/23873, WO 97/43424, las patentes de EE. UU. n.ºs 5.824.532; 5.849.549; 6.297.037; 6.093.562; 6.297.038; 6.867.031; y las publicaciones de EE. UU. n.ºs 2002/0098996; 2003/0064908; 2004/0253676; 2005/0059131; 2005/0250664; 2006/0035323; 2009/0280527; 2010/0099597; 2010/0099598; y 2011/0177990, especialmente las variantes con sustituciones en una o más de las siguientes posiciones: 15, 23, 105, 106, 124, 128, 133, 154, 156, 181, 188, 190, 197, 202, 208, 209, 243, 264, 304, 305, 391, 408 y 444. Las amilasas disponibles en el mercado son Duramyl™, Termamyl™, Fungamyl™ y BAN™ (Novozymes A/S), Rapidase™ y Purastar™ (de Genencor  
65 International Inc.).

Las celulasas adecuadas incluyen las de origen bacteriano o fúngico. Se incluyen mutantes modificados químicamente o de ingeniería proteínica. Las celulasas adecuadas incluyen celulasas de los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Humicola*, *Fusarium*, *Thielavia*, *Acremonium*, por ejemplo, las celulasas fúngicas producidas a partir de *Humicola insolens*, *Myceliophthora thermophila* y *Fusarium oxysporum* divulgadas en las patentes de EE. UU. n.ºs 4.435.307; 5.648.263; 5.691.178; 5.776.757 y el documento WO 89/09259. Las celulasas especialmente adecuadas son las celulasas alcalinas o neutras que tienen beneficios de cuidado de color. Los ejemplos de dichas celulasas son las celulasas descritas en los documentos EP 0 495 257, EP 0 531 372, WO 96/11262, WO 96/29397, WO 98/08940, las patentes de EE. UU. n.ºs 5.520.838; 5.443.750; 5.668.073; 5.948.672; 6.423.524; 5.919.691; 6.071.735; 6.001.639; 6.387.690; 6.855.531; 7.226.773; y las publicaciones de EE. UU. n.ºs 2001/0036910; 2003/0119167; 2003/0054539; 2005/0070003; 2008/0145912; y 2010/0107342. Otros ejemplos son variantes de celulasa tales como las descritas en los documentos WO 94/07998, EP 0 531 315, WO 95/24471, WO 98/12307, PCT/DK98/00299, las patentes de EE. UU. n.ºs 5.457.046; 5.686.593; 5.763.254; 5.792.641; 6.114.296; 5.457.046; 5.912.157; 6.117.664; 7.993.898; 8.017.372; y las publicaciones de EE. UU. n.ºs 2003/0092097; 2005/0009166; 2008/0206836; 2009/0170747 y 2011/0250674. Las celulasas disponibles en el mercado incluyen Celluzyme™ y Carezyme™ (Novozymes A/S), Clazinase™ y Puradax HA™ (Genencor International Inc.), y KAC-500(B)™ (Kao Corporation).

### Peptidasas/proteasas

Las hidrolasas de EC 3 que actúan sobre enlaces peptídicos (peptidasas/proteasas) pueden incluir, pero no se limitan a, aminopeptidasas (incluyendo leucil aminopeptidasa, alanil aminopeptidasa de membrana, cistinil aminopeptidasa, tripéptido aminopeptidasa, prolil aminopeptidasa, arginil aminopeptidasa, glutamil aminopeptidasa, Xaa-Pro aminopeptidasa, leucil aminopeptidasa bacteriana, clostridial aminopeptidasa, citosol alanil aminopeptidasa, lisil aminopeptidasa, Xaa-Trp aminopeptidasa, triptofanil aminopeptidasa, metionil aminopeptidasa, aminopeptidasa D-estereoespecífica, aminopeptidasa Ey, aspartil aminopeptidasa, aminopeptidasa I, PepB aminopeptidasa, aminopeptidasa S, beta-peptidil aminopeptidasa y peptidasa de escisión intermedia 55); dipeptidasas (incluyendo Xaa-Arg dipeptidasa, Xaa-metil-His dipeptidasa, Glu-Glu dipeptidasa, Xaa-Pro dipeptidasa, Met-Xaa dipeptidasa, dipeptidasa no estereoespecífica, dipeptidasa no específica de citosol, dipeptidasa de membrana, beta-Ala-His dipeptidasa, dipeptidasa E y D-Ala-D-Ala dipeptidasa); dipeptidil-peptidasas y tripeptidil-peptidasas (incluyendo dipeptidil-peptidasa I, dipeptidil-peptidasa II, dipeptidil-peptidasa III, dipeptidil-peptidasa IV, dipeptidildipeptidasa, tripeptidil-peptidasa I, tripeptidil-peptidasa II, Xaa-Pro dipeptidil-peptidasa y prolil tripeptidil aminopeptidasa); peptidil-dipeptidasas (incluyendo peptidil-dipeptidasa A, peptidil-dipeptidasa B, peptidil-dipeptidasa Dcp y cianoficinas); carboxipeptidasas de tipo serina (incluyendo Pro-Xaa carboxipeptidasa lisosómica, D-Ala-D-Ala carboxipeptidasa de tipo serina, carboxipeptidasa C, y carboxipeptidasa D); metalocarboxipeptidasas (incluyendo carboxipeptidasa A, carboxipeptidasa B, lisina carboxipeptidasa, Gly-Xaa carboxipeptidasa, alanina carboxipeptidasa, muramoilpentapéptido carboxipeptidasa, carboxipeptidasa E, glutamato carboxipeptidasa, carboxipeptidasa M, muramoiltetrapéptido carboxipeptidasa, cinc D-Ala-D-Ala carboxipeptidasa, carboxipeptidasa A2, Pro-Xaa carboxipeptidasa de membrana, tubulinil-Tyr carboxipeptidasa, carboxipeptidasa T, carboxipeptidasa Taq, carboxipeptidasa U, glutamato carboxipeptidasa II, metalocarboxipeptidasa D y enzima convertidora de la angiotensina 2); carboxipeptidasas de tipo cisteína, que incluyen catepsina X; omega peptidasas (incluyendo acilaminoacil-peptidasas, peptidil-glicinamidasa, piroglutamil-peptidasa I, beta-aspartil-peptidasas, piroglutamil-peptidasa II, N-formilmietion-peptidasa, gamma-glutamil hidrolasa, gamma-D-glutamil-meso-diaminopimelato peptidasa I y ubiquitinil hidrolasa 1); serina endopeptidasas (incluyendo quimotripsina, quimotripsina C, metridina, tripsina, trombina, factor de coagulación Xa, plasmina, enteropeptidasa, acrosina, endopeptidasa alfa-lítica, glutamil endopeptidasa, catepsina G, factor de coagulación VIIa, factor de coagulación IXa, cucumisina, prolil oligopeptidasa, factor de coagulación XIa, braquiurano, calicreína plasmática, calicreína tisular, elastasa pancreática, elastasa leucocitaria, factor de coagulación XIIa, quimasa, subcomponente del complemento C<sup>1r</sup>, subcomponente del complemento C<sup>1s</sup>, C3/C5 convertasa de vía clásica del complemento, factor del complemento I, factor del complemento D, C3/C5 convertasa de vía alternativa del complemento, cerevisina, hipodermina C, lisil endopeptidasa, endopeptidasa La, gamma-renina, venombina AB, leucil endopeptidasa, triptasa, escutelarina, kexina, subtilisina, orizina, peptidasa K, termomicolina, termitasa, endopeptidasa So, activador t-plasminógeno, proteína C (activada), endopeptidasa pancreática E, elastasa pancreática II, serina endopeptidasa específica de IgA, activador del plasminógeno u, venombina A, furina, mieloblastina, semenogelasa, granzima A, granzima B, estreptogrisina A, estreptogrisina B, glutamil endopeptidasa II, oligopeptidasa B, factor de coagulación del limulus C, factor de coagulación del limulus B, enzima de coagulación del limulus, represor LexA, peptidasa señal I, togavirina, flavivirina, endopeptidasa Clp, proproteína convertasa 1, proproteína convertasa 2, activador del factor V del veneno de serpiente, lactocepina, asemblina, hepacivirina, espermosina, sedolisina, xantomonalisina, peptidasas de proceso en el extremo C, fisarolisina, proteasa-2 de la serina asociada a lectina de unión a manano, proteasa romboidal, hepsina, peptidasa Do, peptidasa HtrA2, matriptasa, peptidasa C5a, acualisina 1, proteasa de sitio 1, peptidasa de la poliproteína del pestivirus NS3, peptidasa de la serina del virus de la arteritis equina, peptidasa del birnavirus Vp4 de la necrosis pancreática infecciosa, SpoIVB peptidasa, enzima quimotripsínica del estrato córneo, calicreína 8, calicreína 13 y oviductina); cisteína endopeptidasas (incluyendo catepsina B, papaína, ficaina, quimopapaína, asclepaina, clostripaina, estreptopaina, actinidaina, catepsina L, catepsina H, catepsina T, glicil endopeptidasa, procoagulante del cáncer, catepsina S, picornaina 3C, picornaina 2A, caricaína, ananaina, bromelaina del tallo, bromelaina de la fruta, legumaina, histolisaina, caspasa-1, gingipaina R, catepsina K, adenaina, bleomicina

hidrolasa, catepsina F, catepsina V, catepsina O, endopeptidasa de inclusión nuclear a, proteinasa del componente auxiliar, L-peptidasa, gingipaína K, estafoapaína, separasa, V-cat endopeptidasa, cruzipaína, calpaína-1, calpaína-2, calpaína-3, caspasa-2, caspasa-3, caspasa-4, caspasa-5, caspasa-6, caspasa-7, caspasa-8, caspasa-9, caspasa-10, caspasa-11, peptidasa 1 (ácaro), calicivirina, zingipaína, Ulp1 peptidasa, proteinasa principal del coronavirus del SARS, sortasa A y sortasa B); endopeptidasas aspárticas (incluyendo pepsina A, pepsina B, gastricsina, quimosina, catepsina D, nepentesina, renina, VIH-1 retropepsina, enzima convertidora de la proopiomelanocortina, aspergiloepsina I, aspergiloepsina II, peniciloepsina, rizopuspepsina, endotiapepsina, mucorpepsina, candidapepsina, sacaropepsina, rodotorlapepsina, acrocilindropepsina, poliporoepsina, picnoroepsina, escitalidoepsina A, escitalidoepsina B, catepsina E, barrierpepsina, señal peptidasa II, plasmepsina I, plasmepsina II, fitepsina, yapsina 1, termopsina, prepilina peptidasa, nodavirus endopeptidasa, memapsina 1, memapsina 2, VIH-2 retropepsina, activador del plasminógeno, Pla, omptina, endopeptidasa del retrovirus endógeno humano K y Hycl peptidasa); metaloendopeptidasas (incluyendo atrolisina A, collagenasa microbiana, leucolisina, collagenasa intersticial, neprilisina, envelisina, metaloendopeptidasa específica de IgA, procolágeno N-endopeptidasa, timet oligopeptidasa, neurolisina, estromelina 1, meprina A, procolágeno C-endopeptidasa, peptidil-Lys metaloendopeptidasa, astacina, estromelina 2, matrilisina, gelatinasa A, vibriolisina, pseudolisina, termolisina, bacilosina, aureolisina, cocolisina, micolisina, metaloendopeptidasa  $\beta$ -lítica, peptidil-Asp metaloendopeptidasa, neutrófilo collagenasa, gelatinasa B, leishmanolisina, sacarolisina, gametolisina, deuterolisina, serralisina, atrolisina B, atrolisina C, atroxasa, atrolisina E, atrolisina F, adamalisina, horrilisina, ruberlisina, botropasina, botrolisina, opiolisina, trimerelisina I, trimerelisina II, mucrolisina, pitrilisina, insulisina, O-sialoglucoproteína endopeptidasa, ruselisina, peptidasa intermediaria mitocondrial, dactilisina, nardilisina, magnolisina, meprina B, peptidasa de proceso mitocondrial, macrófago elastase, coriolisina L, coriolisina H, tentoxilisina, bontoxilisina, oligopeptidasa A, enzima convertidora de endotelina, fibrolasa, jararhagina, fragilisina, lisostafina, flavastacina, esnapalisina, gpr endopeptidasa, papalysina-1, metaloproteínasa-1 de matriz de tipo membrana, ADAM10 endopeptidasa, ADAMTS-4 endopeptidasa, endopeptidasa de la mutación letal del carbunco, Ste24 endopeptidasa, S2P endopeptidasa, ADAM 17 endopeptidasa y ADAMTS13 endopeptidasa); y treonina endopeptidasas (incluyendo el complejo proteasoma endopeptidasa y HslU—HslV peptidasa).

Las proteasas adecuadas incluyen las de origen animal, vegetal o microbiano. Se prefiere el origen microbiano. Se incluyen mutantes modificados químicamente o de ingeniería proteínica. La proteasa puede ser una serina proteasa o una metaloproteasa, preferentemente una proteasa microbiana alcalina o una proteasa de tipo tripsina. Los ejemplos de proteasas alcalinas son las subtilisinas, especialmente las derivadas de *Bacillus*, por ejemplo, subtilisina Novo, subtilisina Carlsberg, subtilisina 309, subtilisina 147 y subtilisina 168 (descrita en el documento WO 89/06279, las patentes de EE. UU. n.ºs 6.506.589; 6.808.913; 6.835.821; y las publicaciones de EE. UU. n.ºs 2003/0148495; 2003/0175933; 2003/0186378 y 2005/0003986). Los ejemplos de proteasas de tipo tripsina son tripsina (por ejemplo, de origen porcino o bovino) y la proteasa de *Fusarium* descrita en los documentos WO 89/06270, WO 94/25583 y las patentes de EE. UU. n.ºs 5.288.627 y 5.693.520. Los ejemplos de proteasas útiles son las variantes descritas en los documentos WO 92/19729, WO 98/20115, WO 98/20116, WO 98/34946 y las patentes de EE. UU. n.ºs 5.858.757; 6.300.116; 7.098.017; 6.159.731; y la publicación de EE. UU. n.º 2002/0102702, especialmente las variantes con sustituciones en una o más de las siguientes posiciones: 27, 36, 57, 76, 87, 97, 101, 104, 120, 123, 167, 170, 194, 206, 218, 222, 224, 235 y 274. Las enzimas proteasa preferidas disponibles en el mercado incluyen Alcalase™, Savinase™, Primase™, Duralase™, Esperase™ y Kannase™, (Novozymes A/S), Maxatase™, Maxacal™, Maxapem™, Properase™, Purafect™, Purafect OxP™, FN2™ y FN3™ (Genencor International Inc.).

Las enzimas para su uso en aplicaciones de lavado de ropa y lavado de vajillas pueden incluir una o más de las enzimas proteasa, amilasa, lipasa, deshidrogenasa, transaminasa, cinasa, celulasa, mananasa, peptidasa, descarboxilasa, isomerasa, mutasa, ligasa, sintasa y oxidorreductasa, incluyendo las enzimas oxidorreductasas que catalizan la formación de agentes blanqueadores.

Se contempla que una enzima para su uso en una composición descrita en el presente documento puede provenir de cualquier fuente o combinación de fuentes adecuada, por ejemplo fuentes bacterianas, fúngicas, vegetales o animales. En un tipo de modo de realización, una mezcla de dos o más enzimas provendrá de al menos dos tipos diferentes de fuentes. Por ejemplo, una mezcla de proteasa y lipasa puede provenir de fuentes bacterianas (proteasa) y fúngicas (lipasa).

En un tipo de modo de realización, se contempla que la enzima para su uso en una composición descrita en el presente documento no es amilasa. En otro tipo de modo de realización, cuando solo se incluye un tipo de enzima en la composición, la enzima no es amilasa. En todavía otro tipo de modo de realización, cuando se incluyen dos o más tipos de enzimas en la composición, las dos o más enzimas no son amilasa. En aún otro tipo de modo de realización, cuando se incluyen dos o más tipos de enzimas en la composición, un tipo de enzima es amilasa y otro tipo de enzima no es amilasa.

Opcionalmente, una enzima para su uso en el presente documento, que incluye pero no se limita a cualquier clase o miembro de enzima descrita en el presente documento, es una que funciona en condiciones de pH alcalinas, por ejemplo para su uso en aplicaciones detergentes que incluyen detergente para ropa y/o detergente para vajillas, por ejemplo pero no limitado a un pH en un intervalo de aproximadamente 7 a aproximadamente 12, o mayor de 7 a aproximadamente 12, o aproximadamente 8 a aproximadamente 12, o aproximadamente 8 a aproximadamente 11.



Opcionalmente, una enzima para su uso en el presente documento, que incluye pero no se limita a cualquier clase o miembro de enzima descrita en el presente documento, es una que funciona a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 5 °C a aproximadamente 45 °C.

5 Es bien conocido en la técnica que la cantidad de enzima usada en cualquier aplicación es una función de la actividad de la enzima específica. Si bien la actividad de la enzima es el parámetro importante, se aprecia fácilmente que esta no es una unidad de medida que se puede usar fácilmente en la producción. Por lo tanto, es conocido en la técnica caracterizar la enzima de acuerdo con la actividad por gramo de la mezcla de enzima seca. La mezcla de enzima seca puede tener alta pureza y esencialmente un 100 % de enzima activa o puede contener subproductos de fermentación. Por lo tanto, una mezcla de enzima disponible en el mercado puede tener un amplio intervalo de pureza, pero aún se puede usar en una formulación basada en una actividad informada por peso unitario. Como se usa en el presente documento, la frase "mezcla de enzima" se referirá a la mezcla seca de enzima activa y productos de fermentación residuales opcionales. La cantidad total de enzima activa (u opcionalmente, la mezcla de dos o más enzimas) incluida en la película hidrosoluble puede ser al menos de aproximadamente 0,1 phr, opcionalmente en un intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 20 phr, o a aproximadamente 2 phr, 4 phr, 5 phr, 10 phr o 15 phr, incluyendo dichos valores individuales y cualquier combinación de intervalos formados por dichos valores. En modos de realización que incluyen tanto una proteasa como una segunda enzima diferente, la proporción de actividad de proteasa con respecto a la actividad de la segunda enzima puede estar en cualquier intervalo adecuado, por ejemplo en un intervalo de aproximadamente 0,2:1 a aproximadamente 10:1, o aproximadamente 0,25:1 a aproximadamente 10:1, o aproximadamente 0,2:1 a aproximadamente 3:1, por ejemplo. La manipulación de polvos secos de enzima no siempre es deseable, en particular debido a los riesgos de seguridad de manipulación de polvos de enzima. Con frecuencia, las mezclas de enzima se obtienen como líquidos con la enzima disuelta en un disolvente vehículo. Las soluciones enzimáticas se caracterizan por la actividad enzimática por peso (o volumen) unitario que permite un peso o volumen específico de mezcla de enzima por lote. Las enzimas activas adecuadas están disponibles en el mercado como soluciones de proveedores que incluyen Novozymes, Genencor Int Inc., Kao Corporation y Gist-Brocades.

#### Sustrato enzimático

30 Las películas hidrosolubles de acuerdo con la presente divulgación incluyen un estabilizador enzimático que es un sustrato funcional para una o más enzimas en la composición enzimática. El sustrato enzimático se proporciona en una cantidad de al menos 1 phr. Se ha demostrado que los modos de realización de sustratos enzimáticos, cuando se incluyen en películas hidrosolubles de acuerdo con la presente divulgación, dan como resultado un porcentaje de recuperación de enzimas en un intervalo de aproximadamente un 20 % a un 100 % de recuperación. En un tipo de modo de realización, la inclusión de sustrato enzimático puede dar como resultado una recuperación de actividad enzimática de al menos un 70 %. Es decir, al menos un 70 % de actividad enzimática se mantuvo después de la formación de la película. En otro aspecto, la inclusión de un sustrato enzimático puede dar como resultado un aumento en la recuperación de enzimas de al menos un 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 % o más, por ejemplo de hasta un 250 % o más, con relación a películas sin sustrato enzimático incluido, como se demuestra en los ejemplos a continuación.

Los sustratos enzimáticos serán evidentes para el experto en la técnica a la vista de la presente divulgación. Por ejemplo, se pueden seleccionar los sustratos a partir de las clases donantes y aceptadoras descritas anteriormente en relación con los tipos de enzimas. Como ejemplos específicos, los sustratos para amilasas incluirán azúcares y almidones complejos, los sustratos para lipasas incluirán lípidos, por ejemplo, monooleato de glicerol, los sustratos para proteasas incluirán proteínas, por ejemplo, una proteína de soja, los sustratos para celulasas incluirán celulosas, por ejemplo, metilcelulosa, y los sustratos para mananasas incluirán manano, por ejemplo, una goma guar.

50 El sustrato enzimático se proporciona en la película hidrosoluble del primer aspecto en una cantidad de al menos 1 phr. Dentro de esta limitación, la cantidad de sustrato enzimático incorporado en la película puede ser cualquier cantidad adecuada para proporcionar a la enzima material de sustrato funcional durante el procesamiento y almacenamiento de la película. Por lo tanto, la cantidad de sustrato enzimático que se va a incorporar en la película es una cantidad eficaz para aumentar la estabilidad de la enzima y así aumentar la recuperación de actividad enzimática, después del procesamiento, por ejemplo, la formación de película. En un tipo de modo de realización, opcionalmente, la cantidad de sustrato enzimático no sobrepasa en gran medida la cantidad eficaz para aumentar la estabilidad de la enzima; por ejemplo, la cantidad de sustrato enzimático en los modos de realización puede ser no más de 1,5 veces la cantidad eficaz, o no más de 2 veces la cantidad eficaz, o no más de 3 veces la cantidad eficaz. Como alternativa, la composición puede contener un exceso de sustrato enzimático para asegurar una cantidad suficiente para la carga enzimática en la composición, siempre que la cantidad en exceso no comprometa otras propiedades deseadas de la composición (por ejemplo, la resistencia de la película). Por ejemplo, se puede incorporar el sustrato enzimático en la película en una cantidad de al menos 2 phr, opcionalmente, en un intervalo de 2 a 8 phr. En otros modos de realización, se puede incorporar la cantidad de sustrato enzimático en la composición o película en una cantidad de 2 phr o menos, o 2,5 phr o menos, o 3 phr o menos, o 3,5 phr o menos, o 4 phr o menos, o 4,5 phr o menos, o 5 phr o menos, o 5,5 phr o menos, o 6 phr o menos, o 6,5 phr o menos, o 7 phr o menos, o 7,5 phr o menos, u 8 phr o menos, u 8,5 phr o menos, o 9 phr o menos. La proporción de sustrato con

respecto a mezcla de enzima puede ser cualquier cantidad adecuada consistente con la divulgación en el presente documento, por ejemplo, al menos 0,5:1,0, o al menos 2,0:1,0, en un intervalo de 0,5:1,0 a 2,0:1,0, o al menos 0,5:1,0 a 10:1, por ejemplo. Sin pretender imponer ninguna teoría en particular, se cree que la cantidad de sustrato que se necesita para estabilizar las enzimas en las composiciones hidrosolubles puede depender de una o más variables, que incluyen, pero no se limitan al peso del sustrato, la concentración molar, la disponibilidad estérica y las temperaturas de procesamiento. Las cantidades de enzima adecuadas en la composición y las proporciones adecuadas de sustrato con respecto a enzima se pueden determinar mediante experimentación rutinaria, por ejemplo, usando la técnica de medición de actividad enzimática descrita en el presente documento. Así, por ejemplo, cuando se usa un monooleato de glicerol como sustrato con una lipasa, se puede proporcionar el monooleato de glicerol en una proporción del peso del monooleato de glicerol con respecto a actividad enzimática. De forma alternativa, por ejemplo, cuando se usa un dioleato de glicerol como sustrato con una lipasa, se puede proporcionar el dioleato de glicerol en una proporción de la mitad del peso del dioleato de glicerol con respecto a actividad enzimática (es decir, dos sitios de unión disponibles), sin embargo, puede ser necesario más si uno de los sitios de unión es estéricamente inaccesible. De forma similar, en el caso de una interacción proteína-proteasa, por ejemplo, se cree que con una proporción en peso dada de proteína con respecto a actividad enzimática, una proteína de bajo peso molecular puede proporcionar mejor protección que una proteína de peso molecular medio (es decir, habrá más proteínas disponibles para la interacción con una proteína de bajo peso molecular). En el caso de una proteína de alto peso molecular, la protección ofrecida puede ser mejor que la de una proteína de peso molecular medio para una proporción de peso dada de proteína con respecto a actividad enzimática (es decir, la proteína más grande puede estar disponible estéricamente para más de una enzima).

En una clase de modos de realización, el sustrato enzimático no proporcionará ninguna otra función en la película aparte de servir como sustrato para la actividad enzimática. Así, por ejemplo, en un tipo de modo de realización, el sustrato enzimático no actuará como tensioactivo. En otro tipo de modo de realización no exclusivo, el sustrato enzimático no actuará como plastificante.

En otra clase de modos de realización, el sustrato enzimático puede ser del tipo que proporcionaría una funcionalidad secundaria a la película distinta de servir como sustrato para la actividad enzimática, y en esta clase de modos de realización, el sustrato enzimático se puede incluir en cantidades menores a las necesarias para la función secundaria, o en exceso de las necesarias para proporcionar la función secundaria. Así, por ejemplo, si bien los almidones pueden afectar el rendimiento de la película como agentes de composición, se puede incluir un almidón en una película en el presente documento en una cantidad que no tendría un efecto práctico sobre las propiedades mecánicas de la película, sino en una cantidad que sería suficiente para actuar como un estabilizador enzimático funcionando como un sustrato para la actividad enzimática.

Sin pretender imponer ninguna teoría en particular, se cree que el sustrato enzimático mejora la recuperación de actividad enzimática mediante uno o ambos de dos mecanismos. En primer lugar, se cree que cuando se proporciona a la enzima un sustrato sobre el que actuar, y así la enzima forma complejos con el sustrato, es menos probable que la enzima se desnaturalice por uno o más de diversos mecanismos (por ejemplo, calor, ácido, álcali, radiación). En segundo lugar, se cree que cuando se proporciona a una enzima un sustrato sobre el que actuar, y así la enzima forma complejos con el sustrato, es menos probable que la enzima se someta a lisis por las enzimas proteasas debido a que el/los sitio(s) de unión para la lisis está(n) ocupado(s) o de otro modo estéricamente obstaculizado(s). Así, por ejemplo, en el ejemplo 6 a continuación, la lipasa (una enzima fúngica) aparentemente no tiene resistencia inherente a la enzima proteasa (una enzima bacteriana), por lo que la recuperación de actividad enzimática lipasa era indetectable. Sin embargo, proporcionar un sustrato de lipasa en la película dio lugar a una recuperación sorprendente y sustancial de actividad enzimática lipasa.

Las películas hidrosolubles de acuerdo con la presente divulgación pueden incluir otros ingredientes aditivos opcionales que incluyen, pero no se limitan a, plastificantes, tensioactivos, antiespumantes, formadores de película, agentes antibloqueantes, sosas cáusticas, agentes de liberación interna, agentes antiamarilleamiento, colorantes, que incluyen pero no se limitan a tintes y pigmentos, y otros ingredientes funcionales, que incluyen pero no se limitan a vehículos y/o encapsulados que contienen componentes de perfume, agentes blanqueadores o catalizadores de blanqueo, por ejemplo en cantidades adecuadas para su propósito previsto.

El agua se reconoce como un plastificante muy eficiente para PVOH y otros polímeros; que incluyen pero no se limitan a polímeros hidrosolubles, sin embargo, la volatilidad del agua limita su utilidad ya que las películas de polímero necesitan tener al menos alguna resistencia (robustez) a una variedad de condiciones ambientales que incluyen baja y alta humedad relativa. La glicerina es mucho menos volátil que el agua y se ha establecido bien como un plastificante eficaz para PVOH y otros polímeros. La glicerina u otros dichos plastificantes líquidos por sí mismos pueden provocar "sudoración" y untuosidad en la superficie si el nivel usado en la formulación de la película es demasiado alto. Esto puede dar lugar a problemas en una película tales como sensación inaceptable en la mano del consumidor e incluso bloqueo de la película en el rollo o en pilas de hojas si la sudoración no se mitiga de alguna manera, tal como el polvoreamiento de la superficie. Esto se podría caracterizar como sobreplastificado. Sin embargo, si se añade muy poco plastificante a la película, la película puede carecer de suficiente ductilidad y flexibilidad para muchos usos finales, por ejemplo, para convertirse en un formato de uso final tal como bolsitas.

5 Los plastificantes para su uso en películas hidrosolubles de la presente divulgación incluyen, pero no se limitan a, sorbitol, glicerol, diglicerol, propilenglicol, etilenglicol, dietilenglicol, trietilenglicol, tetraetilenglicol, polietilenglicoles de hasta PM 400, 2-metil-1,3-propanodiol, ácido láctico, monoacetina, triacetina, citrato de trietilo, 1,3-butanodiol, trimetilolpropano (TMP), poliéter triol y combinaciones de los mismos. A medida que se usa menos plastificante, la película se puede volver más frágil, mientras que a medida que se usa más plastificante, la película puede perder resistencia a la tracción. Se pueden incluir plastificantes en las películas hidrosolubles en una cantidad en un intervalo de aproximadamente 25 phr a aproximadamente 50 phr, o de desde aproximadamente 30 phr a aproximadamente 45 phr, o de desde aproximadamente 32 phr a aproximadamente 42 phr, por ejemplo.

10 Los tensioactivos para su uso en películas hidrosolubles son bien conocidos en la técnica. Opcionalmente, se incluyen tensioactivos para ayudar en la dispersión de la solución de resina tras el colado. Los tensioactivos adecuados para películas hidrosolubles de la presente divulgación incluyen, pero no se limitan a, dialquil sulfosuccinatos, ésteres de ácidos grasos lactilados de glicerol y propilenglicol, ésteres lactílicos de ácidos grasos, alquilsulfatos de sodio, polisorbato 20, polisorbato 60, polisorbato 65, polisorbato 80, polietilenglicoléteres de alquilo, 15 lecitina, ésteres de ácidos grasos acetilados de glicerol y propilenglicol, laurilsulfato de sodio, ésteres acetilados de ácidos grasos, óxido de miristildimetilamina, cloruro de trimetil-seboalquilamonio, compuestos de amonio cuaternario, sales de los mismos y combinaciones de cualquiera de los anteriores. Demasiado poco tensioactivo a veces puede dar como resultado una película que tiene orificios, mientras que demasiado tensioactivo puede dar como resultado que la película tenga una sensación grasosa u oleosa por el exceso de tensioactivo presente en la 20 superficie de la película. Así, se pueden incluir tensioactivos en las películas hidrosolubles en una cantidad de menos de aproximadamente 2 phr, por ejemplo, menos de aproximadamente 1 phr, o menos de aproximadamente 0,5 phr, por ejemplo.

25 Un tipo de componente secundario contemplado para su uso es un antiespumante. Los antiespumantes pueden ayudar a unir las burbujas de espuma. Los antiespumantes adecuados para su uso en películas hidrosolubles de acuerdo con la presente divulgación incluyen, pero no se limitan a, sílices hidrófobas, por ejemplo, dióxido de silicio o sílice pirógena en tamaños de partícula fina, incluyendo antiespumantes Foam Blast® disponibles de Emerald Performance Materials, incluyendo Foam Blast® 327, Foam Blast® UVD, Foam Blast® 163, Foam Blast® 269, Foam Blast® 338, Foam Blast® 290, Foam Blast® 332, Foam Blast® 349, Foam Blast® 550 y Foam Blast® 339, que son 30 antiespumantes de aceite no mineral patentados. En modos de realización, se pueden usar antiespumantes en una cantidad de 0,5 phr, o menos, por ejemplo, 0,05 phr, 0,04 phr, 0,03 phr, 0,02 phr, o 0,01 phr. Preferentemente, se evitarán cantidades significativas de dióxido de silicio, a fin de evitar el blanqueamiento por tensión.

35 Los métodos para elaborar artículos hidrosolubles, que incluyen películas, incluyen colado, moldeo por soplado, extrusión y extrusión por soplado, son conocidos en la técnica. Una clase contemplada de modos de realización se caracteriza por que la película hidrosoluble descrita en el presente documento se forma por colado, por ejemplo, mezclando los ingredientes descritos en el presente documento con agua para crear una mezcla acuosa, por ejemplo, una solución con sólidos dispersados opcionalmente, aplicando la mezcla a una superficie, y secando el agua para crear una película. De forma similar, se pueden formar otras composiciones secando la mezcla mientras 40 está confinada en una forma deseada.

Los espesores de composición (es decir, en su punto de delgadez o espesor promedio) pueden tener cualquier intervalo deseado, incluyendo valores e intervalos de al menos 0,1 µm, al menos 10 µm, al menos 50 µm, al menos 100 µm, al menos 1 mm, al menos 2 mm, al menos 3 mm, al menos 4 µm, al menos 5 mm, al menos 10 mm, y en un 45 intervalo de 0,1 µm a 100 µm o de 0,1 µm a 1000 µm, por ejemplo.

En una clase contemplada de modos de realización, la película hidrosoluble se forma por colado de una mezcla hidrosoluble en la que la mezcla hidrosoluble se prepara de acuerdo con las etapas de:

- 50 (a) proporcionar una mezcla de resina hidrosoluble, agua, sustrato enzimático y cualquier aditivo opcional, excluyendo enzimas;
- (b) hervir la mezcla durante 30 minutos;
- 55 (c) desgasificar la mezcla en un horno a una temperatura de al menos 40 °C; opcionalmente en un intervalo de 40 °C a 70 °C, por ejemplo, aproximadamente 65 °C;
- (d) añadir al menos una enzima, opcionalmente al menos un plastificante, y opcionalmente agua adicional a la 60 mezcla a una temperatura de 65 °C o menos, en la que el sustrato enzimático en la mezcla es un sustrato para dicha enzima; y
- (e) agitar la mezcla, opcionalmente sin vórtice, hasta que la mezcla tenga un color y una consistencia sustancialmente uniformes; opcionalmente durante un período de tiempo en un intervalo de 30 minutos a 90 minutos, opcionalmente al menos 1 hora; y
- 65 colar la mezcla rápidamente después del período de tiempo de agitación (por ejemplo, en el transcurso de 4 horas, o

2 horas, o en el transcurso de 1 hora o menos). Si la enzima se añade a la mezcla demasiado pronto, por ejemplo, con los aditivos secundarios o la resina, el nivel de actividad enzimática recuperado puede ser bajo. Sin pretender imponer ninguna teoría en particular, se cree que la ebullición de la mezcla con la enzima da lugar a la desnaturalización de la enzima y el almacenamiento en solución durante períodos de tiempo prolongados también da lugar a una reducción en la actividad enzimática recuperada.

En una clase de modos de realización, se mantiene una alta actividad enzimática en las películas hidrosolubles de acuerdo con la presente divulgación secando las películas rápidamente en condiciones de moderadas a suaves. Como se usa en el presente documento, secar rápidamente se refiere a un tiempo de secado de menos de 24 horas, opcionalmente menos de 12 horas, opcionalmente menos de 8 horas, opcionalmente menos de 2 horas, opcionalmente menos de 1 hora, opcionalmente menos de 45 minutos, opcionalmente menos de 30 minutos, opcionalmente menos de 20 minutos, opcionalmente menos de 10 minutos, por ejemplo, en un intervalo de aproximadamente 6 minutos a aproximadamente 10 minutos, u 8 minutos. Como se usa en el presente documento, las condiciones de moderadas a suaves se refieren a temperaturas de secado de menos de 170 °F (77 °C), opcionalmente en un intervalo de aproximadamente 150 °F a aproximadamente 170 °F (aproximadamente 66 °C a aproximadamente 77 °C), por ejemplo, 165 °F (74 °C). A medida que aumenta la temperatura de secado, las enzimas tienden a desnaturalizarse más rápidamente, mientras que a medida que la temperatura de secado disminuye, el tiempo de secado aumenta, exponiendo así las enzimas a la solución durante un período de tiempo prolongado.

La película es útil para crear un paquete que contenga una composición, por ejemplo, composiciones de lavado de ropa o lavado de vajillas, formando de este modo una bolsita. La película descrita en el presente documento también se puede usar para elaborar un paquete con dos o más compartimentos elaborados de la misma película o en combinación con películas de otros materiales poliméricos. Se pueden obtener películas adicionales, por ejemplo, mediante colado, moldeo por soplado, extrusión o extrusión por soplado del mismo material polimérico o de uno diferente, como se conoce en la técnica. En un tipo de modo de realización, los polímeros, copolímeros o derivados de los mismos adecuados para su uso como la película adicional se seleccionan entre poli(alcoholes vinílicos), polivinilpirrolidona, óxidos de polialquileno, ácido poliacrílico, celulosa, éteres de celulosa, ésteres de celulosa, amidas de celulosa, acetatos de polivinilo, ácidos policarboxílicos y sales, poliaminoácidos o péptidos, poliamidas, poliacrilamida, copolímeros de ácidos maleico/acrílico, polisacáridos incluyendo almidón y gelatina, gomas naturales tales como xantano, y carragenanos. Por ejemplo, se pueden seleccionar polímeros entre poli(acrilatos y copolímeros de acrilato hidrosolubles, metilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio, dextrina, etilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, maltodextrina, polimetacrilatos y combinaciones de los mismos, o se seleccionan entre poli(alcoholes vinílicos), copolímeros de poli(alcohol vinílico) e hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) y combinaciones de los mismos.

Las bolsitas y/o paquetes de la presente divulgación comprenden al menos un compartimento sellado. Así, las bolsitas pueden comprender un compartimento único o múltiples compartimentos. Las bolsitas pueden tener regiones con y sin enzimas. En modos de realización que incluyen múltiples compartimentos, cada compartimento puede contener composiciones idénticas y/o diferentes. A su vez, las composiciones pueden tomar cualquier forma adecuada que incluye, pero no se limita a líquido, sólido y combinaciones de los mismos (por ejemplo, un sólido suspendido en un líquido). En algunos modos de realización, las bolsitas comprenden un primer, segundo y tercer compartimento, cada uno de los cuales contiene respectivamente una primera, segunda y tercera composición diferentes. En algunos modos de realización, las composiciones pueden ser visualmente distintas como se describe en la solicitud de patente europea número 09161692.0 (presentada el 2 de junio de 2009 y otorgada a Procter & Gamble Company), publicada como EP 2258820 (y su homóloga publicación de solicitud de patente de EE. UU. n.º 2010/0305020).

Los compartimentos de bolsitas y/o paquetes multicompartimentales pueden tener el mismo o diferente(s) tamaño(s) y/o volumen/volumenes. Los compartimentos de las presentes bolsitas multicompartimentales se pueden separar o unir de cualquier manera adecuada. En algunos modos de realización, el segundo y/o tercer y/o subsiguientes compartimentos están superpuestos sobre el primer compartimento. En un modo de realización, el tercer compartimento se puede superponer sobre el segundo compartimento, que a su vez se superpone sobre el primer compartimento en una configuración intercalada. De forma alternativa, el segundo y tercer compartimentos se pueden superponer sobre el primer compartimento. Sin embargo, también se prevé igualmente que el primer, segundo y opcionalmente tercer y subsiguientes compartimentos se puedan fijar entre sí en una relación lado a lado. Los compartimentos se pueden envasar en una sarta, siendo cada compartimento separable de manera individual por una línea de perforación. De ahí que, se pueda arrancar cada compartimento de manera individual del resto de la sarta por el usuario final.

En algunos modos de realización, las bolsitas y/o paquetes multicompartimentales incluyen tres compartimentos que consisten en un primer compartimento grande y dos compartimentos más pequeños. El segundo y tercer compartimentos más pequeños se superponen sobre el primer compartimento más grande. El tamaño y la geometría de los compartimentos se eligen de manera que se pueda lograr esta disposición. La geometría de los compartimentos puede ser la misma o diferente. En algunos modos de realización, el segundo y opcionalmente el tercer compartimento tienen cada uno una geometría y una forma diferentes en comparación con el primer

compartimento. En estos modos de realización, el segundo y opcionalmente tercer compartimentos están dispuestos en un diseño sobre el primer compartimento. El diseño puede ser decorativo, educativo o ilustrativo, por ejemplo, para ilustrar un concepto o instrucción, y/o usarse para indicar el origen del producto. En algunos modos de realización, el primer compartimento es el compartimento más grande que tiene dos caras grandes selladas alrededor del perímetro, y el segundo compartimento es más pequeño cubriendo menos de aproximadamente un 75 %, o menos de aproximadamente un 50 % del área superficial de una cara del primer compartimento. En modos de realización en los que hay un tercer compartimento, la estructura mencionada anteriormente puede ser la misma pero el segundo y tercer compartimentos cubren menos de aproximadamente un 60 %, o menos de aproximadamente un 50 %, o menos de aproximadamente un 45 % del área superficial de una cara del primer compartimento.

Las bolsitas y/o paquetes de la presente divulgación pueden comprender una o más películas diferentes. Por ejemplo, en modos de realización de compartimento único, el paquete se puede elaborar a partir de una pared que se pliega sobre sí misma y se sella en los bordes, o de forma alternativa, dos paredes que se sellan juntas en los bordes. En los modos de realización de múltiples compartimentos, el paquete se puede elaborar a partir de una o más películas de manera que cualquier compartimento de paquete dado pueda comprender paredes elaboradas de una única película o múltiples películas que tienen composiciones diferentes. En un modo de realización, una bolsita multicompartimental comprende al menos tres paredes: una pared superior externa; una pared inferior externa; y una pared divisoria. La pared superior externa y la pared inferior externa son en general opuestas y forman el exterior de la bolsita. La pared divisoria está en el interior de la bolsita y está sujeta a las paredes externas en general opuestas a lo largo de una línea de sellado. La pared divisoria separa el interior de la bolsita multicompartimental en al menos un primer compartimento y un segundo compartimento. En una clase de modos de realización, la pared divisoria puede ser la única película que contiene enzima, minimizando de este modo la exposición del consumidor a las enzimas.

Las bolsitas y los paquetes se pueden elaborar usando cualquier equipo y método adecuados. Por ejemplo, las bolsitas de compartimento único se pueden elaborar usando técnicas de llenado de forma vertical, llenado de forma horizontal o llenado en tambor giratorio, comúnmente conocidas en la técnica. Dichos métodos pueden ser continuos o bien intermitentes. La película se puede humedecer, y/o calentar para aumentar la maleabilidad de la misma. El método también puede implicar el uso de vacío para estirar la película en un molde adecuado. El vacío que estira la película en el molde se puede aplicar durante aproximadamente 0,2 a aproximadamente 5 segundos, o aproximadamente 0,3 a aproximadamente 3, o aproximadamente 0,5 a aproximadamente 1,5 segundos, una vez que la película está en la parte horizontal de la superficie. Este vacío puede ser tal que proporcione una presión insuficiente en un intervalo de 1 kPa (10 mbar) a 100 kPa (1000 mbar), o en un intervalo de 10 kPa (100 mbar) a 60 kPa (600 mbar), por ejemplo.

Los moldes, en los que se pueden elaborar los paquetes, pueden tener cualquier forma, longitud, ancho y profundidad, dependiendo de las dimensiones requeridas de las bolsitas. Los moldes también pueden variar en tamaño y forma de uno a otro, si se desea. Por ejemplo, el volumen de las bolsitas finales puede ser de aproximadamente 5 ml a aproximadamente 300 ml, o de aproximadamente 10 a 150 ml, o de aproximadamente 20 a aproximadamente 100 ml, y que los tamaños de molde se ajusten en consecuencia.

En un modo de realización, el paquete incluye un primer y un segundo compartimento sellado. El segundo compartimento está en una relación en general superpuesta con el primer compartimento sellado de manera que el segundo compartimento sellado y el primer compartimento sellado comparten una pared divisoria en el interior de la bolsita.

En un modo de realización, el paquete que incluye un primer y un segundo compartimento incluye adicionalmente un tercer compartimento sellado. El tercer compartimento sellado está en una relación en general superpuesta con el primer compartimento sellado de manera que el tercer compartimento sellado y el primer compartimento sellado comparten una pared divisoria en el interior de la bolsita.

En diversos modos de realización, la primera composición y la segunda composición se seleccionan entre una de las siguientes combinaciones: líquido, líquido; líquido, polvo; líquido, gel; líquido, pasta; polvo, polvo; polvo, líquido; polvo, gel; polvo; pasta; gel, líquido; gel, polvo; gel, gel; gel, pasta; pasta, líquido; pasta, polvo; pasta, gel; y pasta, pasta.

En diversos modos de realización, la primera, segunda y tercera composiciones se seleccionan entre una de las siguientes combinaciones:

polvo, líquido, líquido; polvo, líquido, polvo; polvo, líquido, gel; polvo, líquido, pasta; polvo, polvo, líquido; polvo, polvo, polvo; polvo, polvo, gel; polvo, polvo, pasta; polvo, gel, líquido; polvo, gel, polvo; polvo, gel, gel; polvo, gel, pasta; polvo, pasta, líquido; polvo, pasta, polvo; polvo, pasta, gel; polvo, pasta, pasta; líquido, líquido, líquido; líquido, líquido, polvo; líquido, líquido, gel; líquido, líquido, pasta; líquido, polvo, líquido; líquido, polvo, polvo; líquido, polvo, gel; líquido, polvo, pasta; líquido, gel, líquido; líquido, gel, gel; líquido, gel, pasta; líquido, líquido, pasta, líquido; líquido, pasta, polvo; líquido, pasta, gel; líquido, pasta, pasta; gel, líquido, líquido; gel, líquido, polvo; gel,

líquido, gel; gel, líquido, pasta; gel, polvo, líquido; gel, polvo, polvo; gel, polvo, gel; gel, polvo, pasta; gel, gel, líquido; gel, gel, polvo; gel, gel, gel; gel, gel, pasta; gel, pasta, líquido; gel, pasta, polvo; gel, pasta, gel; gel, pasta, pasta; pasta, líquido, líquido; pasta, líquido, polvo; pasta, líquido, gel; pasta, líquido, pasta; pasta, polvo, líquido; gel, polvo, polvo; gel, polvo, gel; gel, polvo, pasta; pasta, gel, líquido; pasta, gel, polvo; pasta, gel, gel; pasta, gel, pasta; pasta, pasta, líquido; pasta, pasta, polvo; pasta, pasta, gel; y pasta, pasta, pasta.

En un modo de realización, el compartimento único o la pluralidad de compartimentos sellados contiene una composición. La pluralidad de compartimentos puede contener cada uno la misma composición o una diferente. La composición se selecciona entre un líquido, un polvo, un gel, una pasta o una combinación de los mismos.

Se puede aplicar calor a la película en el método comúnmente conocido como termoformado. Se puede aplicar calor usando cualquier medio adecuado. Por ejemplo, se puede calentar la película directamente haciéndola pasar por debajo de un elemento calefactor o a través de aire caliente, antes de alimentarla sobre una superficie o una vez en una superficie. De forma alternativa, se puede calentar indirectamente, por ejemplo, calentando la superficie o aplicando un objeto caliente sobre la película. Se puede calentar la película usando una luz infrarroja. Se puede calentar la película hasta una temperatura de al menos 50 °C, por ejemplo de aproximadamente 50 a aproximadamente 150 °C, de aproximadamente 50 a aproximadamente 120 °C, de aproximadamente 60 a aproximadamente 130 °C, de aproximadamente 70 a aproximadamente 120 °C, o de aproximadamente 60 a aproximadamente 90 °C.

De forma alternativa, se puede humedecer la película por cualquier medio adecuado, por ejemplo, directamente rociando sobre la película un agente humectante (incluyendo agua, una solución de la composición de película, un plastificante para la composición de película o cualquier combinación de los anteriores), antes de alimentarla sobre la superficie o una vez en la superficie, o indirectamente humedeciendo la superficie o aplicando un objeto húmedo sobre la película.

Una vez que se ha calentado y/o humedecido una película, se puede estirar en un molde apropiado, preferentemente usando vacío. Se puede termoformar la película con una proporción de estiramiento de al menos aproximadamente 1,5, por ejemplo, y opcionalmente hasta una proporción de estiramiento de 2, por ejemplo. El llenado de la película moldeada se puede llevar a cabo utilizando cualquier medio adecuado. En algunos modos de realización, el método más preferente dependerá de la forma del producto y de la velocidad de llenado requerida. En algunos modos de realización, la película moldeada se llena mediante técnicas de llenado en línea. Los paquetes abiertos, llenos se cierran a continuación formando las bolsitas, usando una segunda película, por cualquier método adecuado. Esto se puede llevar a cabo mientras están en posición horizontal y en movimiento continuo y constante. El cierre puede ser llevado a cabo alimentando continuamente una segunda película, preferentemente una película hidrosoluble, alrededor y sobre los paquetes abiertos y a continuación sellando preferentemente la primera y la segunda película juntas, típicamente en el área entre los moldes y, así, entre los paquetes.

Se puede utilizar cualquier método adecuado de sellado del paquete y/o los compartimentos individuales del mismo. Los ejemplos no limitantes de dichos medios incluyen sellado por calor, soldadura con disolvente, sellado en disolvente o en húmedo, y combinaciones de los mismos. El paquete hidrosoluble y/o los compartimentos individuales del mismo se pueden sellar por calor a una temperatura de al menos 200 °F (93 °C), por ejemplo en un intervalo de aproximadamente 220 °F (aproximadamente 105 °C) a aproximadamente 290 °F (aproximadamente 145 °C), o de aproximadamente 230 °F (aproximadamente 110 °C) a aproximadamente 280 °F (aproximadamente 140 °C). Típicamente, solo el área que va a formar el sello se trata con calor o disolvente. El calor o disolvente se puede aplicar por cualquier método, típicamente sobre el material de cierre, y típicamente solo sobre las áreas que van a formar el sello. Si se usa sellado o soldadura con solvente o en húmedo, se puede preferir que también se aplique calor. Los métodos preferentes de sellado/soldadura en húmedo o con disolvente incluyen aplicar selectivamente disolvente sobre el área entre los moldes, o sobre el material de cierre, por ejemplo, rociando o imprimiendo este sobre estas áreas, y a continuación aplicando presión sobre estas áreas, para formar el sello. Por ejemplo, se pueden usar rodillos y correas de sellado como se describió anteriormente (opcionalmente también proporcionando calor).

Las bolsitas formadas se pueden cortar a continuación con un dispositivo de corte. El corte se puede llevar a cabo usando cualquier método conocido. Se puede preferir que el corte también se realice de manera continua, y preferentemente con velocidad constante y preferentemente mientras están en posición horizontal. El dispositivo de corte puede ser, por ejemplo, un objeto afilado, un objeto caliente o un láser, por lo que en estos últimos casos, el objeto caliente o el láser "quemar" a través de la película/área de sellado.

Los diferentes compartimentos de las bolsitas multicompartimentales se pueden elaborar juntos en un estilo de lado a lado, en el que las bolsitas unidas resultantes se pueden separar o no mediante corte. De forma alternativa, los compartimentos se pueden elaborar por separado.

En algunos modos de realización, las bolsitas se pueden elaborar de acuerdo con un método que incluye las etapas de:

- 5
- a) formar un primer compartimento (como se describió anteriormente);
  - b) formar un rebajo dentro de parte o todo el compartimento cerrado formado en la etapa (a), para generar un segundo compartimento moldeado superpuesto encima del primer compartimento;
  - c) llenar y cerrar los segundos compartimentos por medio de una tercera película;
  - d) sellar la primera, segunda y tercera películas; y
  - 10 e) cortar las películas para producir una bolsita multicompartmental.

El rebajo formado en la etapa (b) se puede lograr aplicando vacío al compartimento preparado en la etapa (a).

15 En algunos modos de realización, el segundo y/o tercer compartimento(s) se puede(n) elaborar en una etapa separada y a continuación combinarse con el primer compartimento como se describe en la solicitud de patente europea número 08101442.5 o WO 2009/152031 (presentada el 13 de junio de 2008 y otorgada a la empresa Procter & Gamble).

20 En otros modos de realización, las bolsitas se pueden elaborar de acuerdo con un método que incluye las etapas de:

- 25
- a) formar un primer compartimento, opcionalmente usando calor y/o vacío, usando una primera película en una primera perfiladora;
  - b) llenar el primer compartimento con una primera composición;
  - c) en una segunda perfiladora, deformar una segunda película, opcionalmente usando calor y vacío, para elaborar un segundo y opcionalmente un tercer compartimento moldeado;
  - d) llenar el segundo y opcionalmente tercer compartimentos;
  - 30 e) sellar el segundo y opcionalmente tercer compartimento usando una tercera película;
  - f) colocar el segundo y opcionalmente tercer compartimentos sellados sobre el primer compartimento;
  - 35 g) sellar el primer, segundo y opcionalmente tercer compartimentos; y
  - h) cortar las películas para producir una bolsita multicompartmental.

40 La primera y segunda perfiladoras se pueden seleccionar basado en su idoneidad para realizar el método anterior. En algunos modos de realización, la primera perfiladora es preferentemente una perfiladora horizontal, y la segunda perfiladora es preferentemente una perfiladora de tambor giratorio, preferentemente situada encima de la primera perfiladora.

45 Se debe entender que mediante el uso de estaciones de alimentación apropiadas, puede ser posible fabricar bolsitas multicompartmentales que incorporen un número de composiciones diferentes o distintivas y/o composiciones en polvo, líquido, gel o pasta diferentes o distintivas.

50 Las películas hidrosolubles de acuerdo con la divulgación se pueden entender mejor a la luz de los siguientes ejemplos, que pretenden meramente ilustrar las películas hidrosolubles y los paquetes hidrosolubles y no están destinados a limitar el alcance de los mismos de ninguna manera.

### Ejemplos

#### Medición colorimétrica de la actividad de proteasa

55 Se sabe que la proteasa usada hidroliza N,N-dimetilcaseína (DMC). Mediante la hidrólisis de enlaces peptídicos, se produjeron ácidos carboxílicos y aminas primarias. Las aminas producidas reaccionaron en condiciones alcalinas con ácido trinitrobenzenosulfónico (TNBS) para formar un complejo coloreado. El complejo coloreado se detectó a 405 nm. Se supuso que la reacción entre las aminas primarias y los TNB era más rápida que la escisión de DMC.

60 Por lo tanto, se puede suponer que la reacción en presencia de un exceso de sustrato es función de la concentración de enzima solamente.

65 La actividad de proteasa se determinó con relación a un patrón de enzima. El patrón era una muestra de la composición de proteasa de materia prima que se usó para preparar la composición de película de acuerdo con los ejemplos en el presente documento. Se informa del resultado en unidades convenientes de actividad enzimática, por ejemplo catales (Eur. J. Biochemistry, vol. 97, 319-320, 1979). Se preparó un conjunto de patrones mediante

diluciones en serie usando una enzima de actividad conocida. Los patrones se tamponaron a pH 8,3, se agitaron durante 9 minutos a 40 °C y se midió la absorbancia a 405 nm. La absorbancia se corrigió para tomar en consideración un blanco, y se obtuvo una curva de calibración (lineal) graficando la actividad frente a la absorbancia corregida. La curva de calibración se aceptó si  $r^2$  era mayor que 0,995. Se pesó una muestra de película que contenía enzima de acuerdo con el ejemplo correspondiente y se disolvió en una solución patrón de DMC y TNBS, se tamponó a pH 8,3 y se agitó durante 9 minutos a 40 °C. Se midió la absorbancia a 405 nm a 40 °C. Usando el valor de absorbancia, se determinó la actividad por gramo de película. Cada composición de película se sometió a prueba en múltiples repeticiones, y se informa del valor promedio en el presente documento.

10 Medición colorimétrica de la actividad de amilasa

El sustrato 4,6-etilideno-(G7)-p-nitrofenil-(G1)-  $\alpha$ -D-maltoheptaosida (etilideno-G7pNP) se hidrolizó por  $\alpha$ -amilasa en G2pNP, G3pNP y G4pNP. Estos fragmentos se hidrolizaron totalmente en p-nitrofenol (pNP) y glucosa por una  $\alpha$ -glucodiasa. La intensidad del pNP formado fue proporcional a la actividad de  $\alpha$ -amilasa de la muestra. El pNP se detectó a 405 nm.

La actividad de  $\alpha$ -amilasa se determinó con relación a un patrón de enzima. El patrón era una muestra de la composición de amilasa en bruto que se usó para preparar la composición de película de acuerdo con los ejemplos en el presente documento. Los patrones se prepararon a un pH de 7,35, se agitaron durante 4 minutos a 27 °C y se midió la absorbancia a 405 nm. Se obtuvo una curva de calibración (lineal), como se describió anteriormente. Se pesó una muestra de película que contenía enzima del ejemplo correspondiente y se disolvió en una solución patrón de etilideno-G7pNP y  $\alpha$ -glucodiasa, se tamponó a pH 7,35 y se agitó durante 4 minutos a 27 °C. Se midió la absorbancia a 405 nm a 27 °C. Usando el valor de absorbancia, se determinó la actividad por gramo de película. Cada composición de película se sometió a prueba en múltiples repeticiones, y se informa del valor promedio en el presente documento.

Medición colorimétrica de la actividad de lipasa

Se sabe que la lipasa usada hidroliza p-nitrofenol-valerato (pNP-val). La hidrólisis escindió el enlace éster entre valerato y p-nitrofenol (pNP). La intensidad del pNP formado fue proporcional a la actividad de lipasa de la muestra. El pNP se detectó a 405 nm.

La actividad de lipasa se determinó con relación a un patrón de enzima. El patrón era una muestra de la composición de lipasa en bruto que se usó para preparar la composición de película. Los patrones se prepararon a un pH de 7,70, se agitaron durante 4,2 minutos a 40 °C y se midió la absorbancia a 405 nm. Se obtuvo una curva de calibración (lineal), como se describió anteriormente. Se pesó una muestra de película que contenía enzima del ejemplo correspondiente y se disolvió en una solución patrón de pNP-val, se tamponó a pH 7,70 y se agitó durante 4,2 minutos a 40 °C. Se midió la absorbancia a 405 nm a 40 °C. Usando el valor de absorbancia, se determinó la actividad por gramo de película. Cada composición de película se sometió a prueba en múltiples repeticiones, y se informa del valor promedio en el presente documento.

Ejemplo 1

Se preparó un conjunto de películas hidrosolubles con los ingredientes identificados en la tabla y la descripción a continuación, en las cantidades mostradas. A menos que se especifique lo contrario, las cantidades están en phr.

Componente	Nombre químico	Descripción	1 (referencia)	2
Resina de PVOH	PVOH	88 % hidrolizada, viscosidad 23,0-27,0	100	100
Alfa-amilasa (actividad de amilasa /100 partes de resina de PVOH)		Mezcla enzimática de amilasa	458	458
Proteasa (actividad de proteasa /100 partes de resina de PVOH)		Mezcla enzimática de proteasa	759	759
Pro-Fam 974 (phr)	Aislado de proteína de soja	Sustrato de proteasa	0,00	2,56
Actividad de proteasa (% de recuperación)			44	72
Actividad			115	116
de amilasa (% de recuperación)				



Cada película también incluía aproximadamente 35 phr de plastificantes, 390 phr de agua y pequeñas cantidades de uno o más coadyuvantes de procesamiento que no se cree que afecten la recuperación de enzimas, por ejemplo, agentes antibloqueantes, tensioactivos, sosa cáustica, formadores de película, agentes antiespumantes, agentes antiamarilleamiento, etc., en una cantidad que totaliza menos de aproximadamente 2,5 phr. La película hidrosoluble de acuerdo con la fórmula 1 (ejemplo de referencia) se preparó como sigue. En un vaso de precipitado, se agitaron los coadyuvantes de procesamiento y el agua durante 10 minutos. Se añadió la resina hidrosoluble a la mezcla y se calentó la mezcla. Se agitó la solución durante 30 minutos. Se desgasificó la solución durante la noche en un horno a 65 °C. Se mezclaron las enzimas, los plastificantes y el agua adicional en la solución a una temperatura no superior a 65 °C. Se agitó la mezcla durante 1 hora y se coló inmediatamente la mezcla de acuerdo con la fórmula 1 (ejemplo de referencia). Se preparó la película hidrosoluble de acuerdo con la fórmula 2 mediante el mismo procedimiento, con la excepción de la adición del sustrato de proteasa de proteína de soja. Se introdujo la proteína de soja en el sistema con los coadyuvantes de procesamiento y el agua.

Se coló la película usando una rasqueta en un lecho de colado calentado y se secó durante aproximadamente 8 minutos a aproximadamente 74 °C. A continuación, se retiró la película hidrosoluble resultante del lecho de colado, se cortó en hojas de aproximadamente 8,5 in por 12 in (21,59 cm por 30,48 cm) y se selló en bolsas herméticas para su almacenamiento. Las hojas individuales se colocaron en bolsas plásticas con cierre de tipo cremallera resellable, o bien en bolsitas de aluminio a las que se les extrajo el aire suavemente, a continuación se sellaron con calor y se almacenaron en un refrigerador a 5 °C hasta que se sometió a prueba su actividad.

El porcentaje de recuperaciones de la actividad enzimática en las películas hidrosolubles a base de PVOH se determinó como se describió anteriormente. El porcentaje de recuperación de las enzimas es el porcentaje de las enzimas que permanecieron activas después de la combinación de métodos de mezclado, colado, secado y almacenamiento. La película hidrosoluble que no contenía sustrato enzimático, película 1 (ejemplo de referencia), demostró una recuperación de un 44 % de actividad de proteasa. La película hidrosoluble que contenía un sustrato de proteasa, película 2, demostró una recuperación de un 72 % de actividad de proteasa. En este ejemplo, la inclusión del sustrato de proteasa dio lugar a un aumento de un 63 % en actividad de proteasa recuperada.

Ejemplo 2

Se preparó un conjunto de películas hidrosolubles con los ingredientes identificados en la tabla y la descripción a continuación, en las cantidades mostradas. A menos que se especifique lo contrario, las cantidades están en phr.

Componente	Nombre químico	Descripción	3 (referencia)	4
Resina de PVOH modificada	Copolímero de VOH/MA	PVOH >99 % hidrolizado; viscosidad 17,0-23,0; 8,8-10,0 % en peso de MA	100	100
Alfa-amilasa (actividad de amilasa /100 partes de resina de PVOH)		Mezcla enzimática de amilasa	458	458
Proteasa (actividad de proteasa /100 partes de resina de PVOH)		Mezcla enzimática de proteasa	759	759
Pro-Fam 974 (phr)	Aislado de proteína de soja	Sustrato de proteasa	0,00	2,60
Actividad de proteasa (% de recuperación)			41	84
Actividad de amilasa (% de recuperación)			106	116

Cada película también incluía aproximadamente 35 phr de plastificantes, 400 phr de agua y pequeñas cantidades de uno o más coadyuvantes de procesamiento que no se cree que afecten la recuperación de enzimas, por ejemplo, agentes antibloqueantes, tensioactivos, sosa cáustica, formadores de película, agentes antiespumantes, agentes antiamarilleamiento, etc., en una cantidad que totaliza menos de aproximadamente 6 phr. Se siguió el procedimiento del ejemplo 1. El porcentaje de recuperaciones de la actividad enzimática en las películas hidrosolubles a base de copolímero de alcohol vinílico/acrilato de metilo se determinó como se describió anteriormente. La película hidrosoluble que no contenía sustrato enzimático, película 3 (ejemplo de referencia), demostró una recuperación de un 41 % de actividad de proteasa. La película hidrosoluble que contenía un sustrato de proteasa, película 4, demostró una recuperación de un 84 % de actividad de proteasa. En este ejemplo, la inclusión del sustrato de proteasa casi duplicó el % de recuperación de actividad de proteasa.

Ejemplo 3

Se preparó un conjunto de películas hidrosolubles con los ingredientes identificados en la tabla y la descripción a continuación, en las cantidades mostradas. A menos que se especifique lo contrario, las cantidades están en phr.

Componente	Nombre químico	Descripción	5 (referencia)	6
Resina de PVOH modificada	Terpolímero de VOH/VA/NaAMPS	PVOH >95 % hidrolizado; viscosidad 10,0 -14,0; 4 % en moles (total) de VA y NaAMPS	100	100
Alfa-amilasa (actividad de amilasa /100 partes de resina de PVOH)		Mezcla enzimática de amilasa	458	458
Proteasa (actividad de proteasa /100 partes de resina de PVOH)		Mezcla enzimática de proteasa	759	759
Pro-Fam 974 (phr)	Aislado de proteína de soja	Sustrato de proteasa	0,00	2,56
Actividad de proteasa (% de recuperación)			87	99
Actividad de amilasa (% de recuperación)			115	113

5 Cada película también incluía aproximadamente 35 phr de plastificantes, 390 phr de agua y pequeñas cantidades de uno o más coadyuvantes de procesamiento que no se cree que afecten la recuperación de enzimas, por ejemplo, agentes antibloqueantes, tensioactivos, sosa cáustica, formadores de película, agentes antiespumantes, agentes antiamarilleamiento, etc., en una cantidad que totaliza menos de aproximadamente 2,5 phr. Se siguió el procedimiento del ejemplo 1. El porcentaje de recuperaciones de la actividad enzimática en las películas hidrosolubles a base de terpolímero de alcohol vinílico/acetato de vinilo/acrilamido-2-metilpropanosulfonato se determinó como se describió anteriormente. La película hidrosoluble que no contenía sustrato enzimático, película 5 (ejemplo de referencia), demostró una recuperación de un 87 % de actividad de proteasa. La película hidrosoluble que contenía un sustrato de proteasa, película 6, demostró una recuperación de un 99 % de actividad de proteasa. En este ejemplo, la inclusión del sustrato de proteasa dio lugar a un aumento de un 14 % en actividad de proteasa recuperada.

15 Ejemplo 4

Se preparó un conjunto de películas hidrosolubles con los ingredientes identificados en la tabla y la descripción a continuación, en las cantidades mostradas. A menos que se especifique lo contrario, las cantidades están en phr.

Componente	Nombre químico	Descripción	7 (referencia)	8
PVOH modificado	Terpolímero de VOH/VA/NaMMM	PVOH 89-93 % hidrolizado; viscosidad 21,0-26,0; 2 % en moles (total) de VA y NaMMM	100	100
Alfa-amilasa (actividad de amilasa /100 partes de resina de PVOH)		Mezcla enzimática de amilasa	458	458
Proteasa (actividad de proteasa /100 partes de resina de PVOH)		Mezcla enzimática de proteasa	759	759
Pro-Fam 974 (phr)	Aislado de proteína de soja	Sustrato de proteasa	0,00	2,56
Actividad de proteasa (% de recuperación)			79	83
Actividad de amilasa (% de recuperación)			116	113

20 Cada película también incluía aproximadamente 35 phr de plastificantes, 390 phr de agua y pequeñas cantidades de uno o más coadyuvantes de procesamiento que no se cree que afecten la recuperación de enzimas, por ejemplo, agentes antibloqueantes, tensioactivos, sosa cáustica, formadores de película, agentes antiespumantes, agentes antiamarilleamiento, etc., en una cantidad que totaliza menos de aproximadamente 2,5 phr. Se siguió el procedimiento del ejemplo 1. El porcentaje de recuperaciones de la actividad enzimática en las películas hidrosolubles a base de terpolímero de alcohol vinílico/acetato de vinilo/monometilmaleato se determinó como se describió anteriormente. La película hidrosoluble que no contenía sustrato enzimático, película 7 (ejemplo de referencia), demostró una recuperación de un 79 % de actividad de proteasa. La película hidrosoluble que contenía un sustrato de proteasa, película 8, demostró una recuperación de un 83 % de actividad de proteasa. En este ejemplo, la inclusión del sustrato de proteasa dio lugar a un aumento de un 5 % en actividad de proteasa recuperada.

Ejemplo 5

5 Se preparó un conjunto de películas hidrosolubles con los ingredientes identificados en la tabla y la descripción a continuación, en las cantidades mostradas. A menos que se especifique lo contrario, las cantidades están en phr.

Componente	Nombre químico	Descripción	9 (referencia)	10
PVOH modificado	Terpolímero de VOH/VA/NaMMM	PVOH 89-93 % hidrolizado; viscosidad 21,0-26,0; 2 % en moles (total) de VA y NaMMM	100	100
Alfa-amilasa (actividad de amilasa /100 partes de resina de PVOH)		Mezcla enzimática de amilasa	358	358
Proteasa (actividad de proteasa /100 partes de resina de PVOH)		Mezcla enzimática de proteasa	520	520
Pro-Fam 974 (phr)	Aislado de proteína de soja	Sustrato de proteasa	0,00	2,33
Actividad de proteasa (% de recuperación)			41	103
Actividad de amilasa (% de recuperación)			110	111

10 Cada película también incluía aproximadamente 25 phr de plastificantes, 380 phr de agua y pequeñas cantidades de uno o más coadyuvantes de procesamiento que no se cree que afecten la recuperación de enzimas, por ejemplo, agentes antibloqueantes, tensioactivos, sosa cáustica, formadores de película, agentes antiespumantes, agentes antiamarilleamiento, etc., en una cantidad que totaliza menos de aproximadamente 4 phr. Se siguió el procedimiento del ejemplo 1. El porcentaje de recuperaciones de la actividad enzimática en las películas hidrosolubles a base de terpolímero de alcohol vinílico/acetato de vinilo/monometilmaleato se determinó como se describió anteriormente. La película hidrosoluble que no contenía sustrato enzimático, película 9 (ejemplo de referencia), demostró una recuperación de un 41 % de actividad de proteasa. La película hidrosoluble que contenía un sustrato de proteasa, película 10, demostró una recuperación nominal de un 103 % de actividad de proteasa. En este ejemplo, la inclusión del sustrato de proteasa dio lugar a un aumento en la actividad de proteasa recuperada de aproximadamente un 240 %.

20 Ejemplo 6

Se preparó un conjunto de películas hidrosolubles con los ingredientes identificados en la tabla y la descripción a continuación, en las cantidades mostradas. A menos que se especifique lo contrario, las cantidades están en phr.

Componente	Nombre químico	Descripción	11 (referencia)	12
Resina de PVOH	PVOH	88 % hidrolizada, viscosidad 23,0-27,0	100	100
Lipasa (actividad de lipasa /100 partes de resina de PVOH)		Mezcla enzimática de lipasa	2507	2507
Proteasa (actividad de proteasa /100 partes de resina de PVOH)		Mezcla enzimática de proteasa	1935	1935
Monooleato de glicerol (phr)	Lípido	Sustrato de lipasa	0,00	2,67
Actividad de proteasa (% de recuperación)			89	89
Actividad de lipasa (% de recuperación)			0	22

25 Cada película también incluía aproximadamente 35 phr de plastificantes, 410 phr de agua y pequeñas cantidades de uno o más coadyuvantes de procesamiento que no se cree que afecten la recuperación de enzimas, por ejemplo, agentes antibloqueantes, tensioactivos, sosa cáustica, formadores de película, agentes antiespumantes, agentes antiamarilleamiento, etc., en una cantidad que totaliza menos de aproximadamente 4 phr. Se siguió el procedimiento del ejemplo 1. El porcentaje de recuperaciones de la actividad enzimática en las películas hidrosolubles a base de PVOH se determinó como se describió anteriormente. La película hidrosoluble que no contenía sustrato enzimático, película 11 (ejemplo de referencia), no demostró recuperación de actividad de lipasa. La película hidrosoluble que

30

5 contenía un sustrato de lipasa, película 12, demostró una recuperación de un 22 % de actividad de lipasa. En este ejemplo, la inclusión del sustrato de lipasa dio lugar sorprendentemente a la recuperación de lipasa activa en una cantidad sustancial. La recuperación de proteasa no se vio afectada. Sin pretender imponer ninguna teoría en particular, se cree que la lipasa estaba sirviendo como un sustrato enzimático para la estabilización frente a la autodegradación de la proteasa.

Ejemplo 7

10 En los ejemplos a continuación, las condiciones a las que se exponen las enzimas durante el mezclado pueden afectar la actividad de las enzimas en la composición final, tal como una película. Se preparó un conjunto de películas hidrosolubles con los ingredientes identificados en la tabla y la descripción a continuación, en las cantidades mostradas. A menos que se especifique lo contrario, las cantidades están en phr.

Componente	Nombre químico	Descripción	13 A	13 B
Resina de PVOH modificada	Terpolímero de VOH/VA/NaMMM	PVOH 89-93 % hidrolizado; viscosidad 21,0-26,0; 2 % en moles (total) de VA y NaMMM	100	100
Alfa-amilasa (actividad de amilasa /100 partes de resina de PVOH)		Mezcla enzimática de amilasa	358	358
Proteasa (actividad de proteasa /100 partes de resina de PVOH)		Mezcla enzimática de proteasa	520	520
Pro-Fam 974 (phr)	Aislado de proteína de soja	Sustrato de proteasa	2,33	2,33
Actividad de proteasa (% de recuperación)			103	1
Actividad de amilasa (% de recuperación)			111	93

15 La película también incluía aproximadamente 25 phr de plastificantes, 380 phr de agua y pequeñas cantidades de uno o más coadyuvantes de procesamiento que no se cree que afecten la recuperación de enzimas, por ejemplo, agentes antibloqueantes, tensioactivos, sosa cáustica, formadores de película, agentes antiespumantes, agentes antiamarilleamiento, etc., en una cantidad que totaliza menos de aproximadamente 4 phr.

20 **Método A**

25 En un vaso de precipitado, se agitaron los coadyuvantes de procesamiento, proteína de soja y agua durante 10 minutos. Se añadió el terpolímero de alcohol vinílico/acetato de vinilo/monometilmaleato a la mezcla y se calentó la mezcla. Se agitó la solución durante 30 minutos. Se desgasificó la solución durante la noche en un horno a 65 °C. Se mezclaron las enzimas, los plastificantes y el agua adicional en la solución a una temperatura no superior a 65 °C. Se agitó la mezcla durante 1 hora y se coló inmediatamente la mezcla de acuerdo con la fórmula 13 para formar la película A hidrosoluble.

30 **Método comparativo B**

35 En un vaso de precipitado, se agitaron las enzimas, los plastificantes, los coadyuvantes de procesamiento, la proteína de soja y el agua durante 10 minutos. Se añadió el terpolímero de alcohol vinílico/acetato de vinilo/monometilmaleato a la mezcla y se calentó la mezcla. Se agitó la solución durante 30 minutos. Se desgasificó la solución durante la noche en un horno a 65 °C. Se coló la mezcla de acuerdo con la fórmula 13 para formar la película B hidrosoluble.

40 Se colaron las películas usando una rasqueta en un lecho de colado calentado y se secaron durante aproximadamente 8 minutos a aproximadamente 74 °C. A continuación, se retiró la película hidrosoluble resultante, nominalmente de 3 mil (0,076 mm) de espesor, del lecho de colado, se cortó en hojas de aproximadamente 8,5 in por 12 in (21,59 cm por 30,48 cm) y se selló en bolsas herméticas para su almacenamiento. Las hojas individuales se colocaron en bolsas plásticas con cierre de tipo cremallera resellable, o bien en bolsitas de aluminio a las que se les extrajo el aire suavemente, a continuación se sellaron con calor y se almacenaron en un refrigerador a 5 °C hasta que se sometió a prueba su actividad.

45 El porcentaje de recuperaciones de la actividad enzimática en las películas hidrosolubles se determinó como se describió anteriormente. El método A dio como resultado una película hidrosoluble que demostró una recuperación nominal de un 103 % de actividad de proteasa y una recuperación nominal de un 111 % de actividad de amilasa. Por el contrario, la película hidrosoluble preparada de acuerdo con el método B demostró una recuperación de un 1 % de actividad de proteasa y una recuperación de un 93 % de actividad de amilasa. Estos ejemplos demuestran que  
50 mezclar las enzimas en la mezcla hidrosoluble inmediatamente antes del colado da como resultado una mayor

actividad enzimática en la película hidrosoluble resultante en comparación con las películas hidrosolubles formadas mezclando las enzimas al principio del método de mezclado y por lo tanto exponiendo las enzimas a condiciones extremas de calentamiento, en particular para las enzimas proteasas.

5 Ejemplo de referencia 8

10 En los ejemplos a continuación, el método de secado de las películas hidrosolubles puede afectar la actividad enzimática de las películas resultantes. Se preparó un conjunto de películas hidrosolubles con los ingredientes identificados en la tabla y la descripción a continuación, en las cantidades mostradas. A menos que se especifique lo contrario, las cantidades están en phr.

Componente	Nombre químico	Descripción	14 (Condiciones de secado 1)	14 (Condiciones de secado 2)	14 (Condiciones de secado 3)
PVOH modificado	Terpolímero de VOH/VA/NaMMM	PVOH 89-93 % hidrolizado; viscosidad 21,0-26,0; 2 % en moles (total) de VA y NaMMM	100	100	100
Alfa-amilasa (actividad de amilasa /100 partes de resina de PVOH)		Mezcla enzimática de amilasa	358	358	358
Proteasa (actividad de proteasa /100 partes de resina de PVOH)		Mezcla enzimática de proteasa	520	520	520
Actividad de proteasa (% de recuperación)			41	19	1
Actividad de amilasa (% de recuperación)			110	103	15

15 La película también incluía aproximadamente 25 phr de plastificantes, 380 phr de agua y pequeñas cantidades de uno o más coadyuvantes de procesamiento que no se cree que afecten la recuperación de enzimas, por ejemplo, agentes antibloqueantes, tensioactivos, sosa cáustica, formadores de película, agentes antiespumantes, agentes antiamarilleamiento, etc., en una cantidad que totaliza menos de aproximadamente 4 phr. Las películas se prepararon como se describe en el método A del ejemplo 7. Las películas se colaron usando una rasqueta y se secaron en tres condiciones diferentes.

20 Condiciones de secado 1

La película se coló sobre un lecho de colado que se precalentó a 165 °F (74 °C) y se secó durante aproximadamente 8 minutos a aproximadamente 74 °C.

25 Condiciones de secado 2 (ambiente)

La mezcla de película hidrosoluble se coló sobre película de Mylar en condiciones ambientales. A continuación, se secó la mezcla de película hidrosoluble en condiciones ambientales de laboratorio (de desde aproximadamente 20 °C a aproximadamente 25 °C) durante 16 horas.

30 Condiciones de secado 3 (severas)

La película se coló sobre un lecho de colado que se precalentó a 200 °F (94 °C) y se secó durante aproximadamente 45 minutos a 94 °C.

35 El porcentaje de recuperaciones de las enzimas en las películas hidrosolubles se determinó como se describió anteriormente. Los resultados se reproducen en la tabla a continuación.

Condiciones de secado	Proteasa (% de recuperación)	Amilasa (% de recuperación)
1	41	110
2	19	103
3	1	15

40 Los resultados muestran que las actividades de las enzimas en la película hidrosoluble resultante se mejoraron

enormemente cuando la película se secó en las condiciones moderadas descritas en el presente documento, con relación al secado en condiciones ambientales suaves o en condiciones severas. También ventajosamente, se minimizó el tiempo que la película estuvo expuesta al calor.

- 5 A lo largo de la presente memoria descriptiva y las reivindicaciones que siguen, a menos que el contexto requiera lo contrario, se ha de entender que la palabra “comprende” y variaciones, tales como “comprenden” y “que comprende” implican la inclusión de un número entero o etapa o grupo de números enteros o etapas indicadas pero no la exclusión de ningún otro número entero o etapa o grupo de números enteros o etapas.
- 10 A lo largo de la memoria descriptiva, cuando las composiciones se describen como que incluyen componentes o materiales, se contempla que las composiciones también pueden consistir esencialmente en, o consisten en, cualquier combinación de los componentes o materiales enumerados, a menos que se describa lo contrario. La invención ilustrativamente divulgada en el presente documento se puede poner en práctica adecuadamente en ausencia de cualquier elemento o etapa que no se divulgue específicamente en el presente documento.
- 15 La práctica de un método divulgado en el presente documento, y las etapas individuales del mismo, se pueden realizar manualmente y/o con la ayuda de o la automatización proporcionada por un equipo electrónico. Aunque se han descrito los métodos con referencia a modos de realización particulares, un experto en la técnica apreciará fácilmente que se pueden usar otras formas de realizar los actos asociados con los métodos. Por ejemplo, se puede cambiar el orden de las diversas etapas sin apartarse del alcance del método, a menos que se describa lo contrario. Además, algunas de las etapas individuales se pueden combinar, omitir o subdividir adicionalmente en etapas adicionales. Las reivindicaciones definen el alcance de la invención.
- 20

**REIVINDICACIONES**

1. Una película hidrosoluble, que comprende una mezcla hidrosoluble de:
- 5 una resina hidrosoluble que comprende una resina de poli(alcohol vinílico),  
una enzima, y  
un sustrato enzimático para dicha enzima,  
10 en la que el sustrato enzimático se proporciona en una cantidad de al menos 1 phr.
2. La película hidrosoluble de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la enzima se selecciona del grupo que consiste en:
- 15 (a) amilasa, lipasa, proteasa, oxidorreductasa, celulasa, mananasa y combinaciones de las mismas; o  
(b) amilasa, lipasa, proteasa y combinaciones de las mismas.
- 20 3. La película hidrosoluble de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que:
- (a) el componente enzimático consiste en una única enzima y la enzima no es amilasa; y/o  
(b) la enzima es una proteasa; y/o  
25 (c) la recuperación de actividad enzimática en la película después de la formación es al menos un 70 % de la actividad enzimática original en la materia prima de la composición enzimática usada para elaborar la película.
- 30 4. La película hidrosoluble de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-2 o 3(b), que comprende adicionalmente una segunda enzima en la película.
5. La película hidrosoluble de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la cantidad total de enzima incluida en la película hidrosoluble es de al menos 0,1 phr, opcionalmente en un intervalo de 0,1 a 20 phr, por ejemplo, 2 phr.
- 35 6. La película hidrosoluble de acuerdo con la reivindicación 4 como dependiente de la reivindicación 3(b), o la reivindicación 5 como dependiente de las reivindicaciones 3(b) y 4, en la que la proporción de actividad de proteasa con respecto a actividad de la segunda enzima está en un intervalo de 0,2:1 a 10:1.
- 40 7. La película hidrosoluble de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que:
- (a) la enzima comprende una proteasa y el sustrato enzimático comprende una proteína, opcionalmente una proteína de soja; o la enzima comprende una lipasa y el sustrato enzimático comprende un lípido, opcionalmente monooleato de glicerol; o la enzima comprende una amilasa y el sustrato comprende un hidrato de carbono complejo, opcionalmente un almidón; o la enzima comprende una celulasa y el sustrato comprende una celulosa, opcionalmente metilcelulosa; o la enzima comprende una mananasa y el sustrato comprende un manano, opcionalmente una goma guar; y/o  
45 (b) el sustrato enzimático es una proteína de soja; y/o  
(c) el sustrato enzimático está presente en la película en una cantidad de al menos 2 phr, opcionalmente en un intervalo de 2 a 8 phr.
- 50 8. La película hidrosoluble de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la resina hidrosoluble:
- (a) comprende, además de resina de poli(alcohol vinílico), una resina formadora de película seleccionada del grupo que consiste en poli(alcoholes vinílicos) modificados, copolímeros de acrilato hidrosolubles, poliacrilatos, poliacrilamidas, polivinilpirrolidona, pululano, goma guar, goma de xantano, carragenano, almidón, almidón etoxilado, almidón hidroxipropilado, poli(acrilamida-2-metilpropanosulfonato de sodio), polimonometilmaleato, copolímeros de los mismos y combinaciones de cualquiera de los anteriores; y/o  
60 (b) está presente en la película hidrosoluble en una cantidad de al menos un 35 % en peso, opcionalmente en un intervalo de un 35 % en peso a un 90 % en peso, basado en el peso total de la película.
- 65

9. La película hidrosoluble de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la resina hidrosoluble consiste en un terpolímero de alcohol vinílico/acetato de vinilo/metilacrilato.
- 5 10. La película hidrosoluble de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende adicionalmente un plastificante.
11. La película hidrosoluble de acuerdo con la reivindicación 10, en la que:
- 10 (a) el plastificante se selecciona del grupo que consiste en sorbitol, glicerol, diglicerol, propilenglicol, etilenglicol, dietilenglicol, trietilenglicol, tetraetilenglicol, polietilenglicoles de hasta un PM de 400, 2 metil-1,3-propanodiol, ácido láctico, monoacetina, triacetina, citrato de trietilo, 1,3-butanodiol, trimetilolpropano (TMP), polietertriol y combinaciones de los mismos; y/o
- 15 (b) el plastificante o combinación de plastificantes está presente en una cantidad de al menos 25 phr, opcionalmente en un intervalo de 25 a 50 phr.
12. La película hidrosoluble de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende adicionalmente un tensioactivo.
- 20 13. La película hidrosoluble de acuerdo con la reivindicación 12, en la que:
- 25 (a) el tensioactivo se selecciona del grupo que consiste en sulfosuccinato de dialquilo, ésteres de ácidos grasos lactilados de glicerol y propilenglicol, ésteres lactílicos de ácidos grasos, alquilsulfatos de sodio, polisorbato 20, polisorbato 60, polisorbato 65, polisorbato 80, éteres de alquilpolietilenglicol, lecitina, ésteres de ácidos grasos acetilados de glicerol y propilenglicol, laurilsulfato de sodio, ésteres acetilados de ácidos grasos, óxido de miristildimetilamina, cloruro de trimetil-seboalquilamonio, compuestos de amonio cuaternario, sales de los mismos y combinaciones de cualquiera de los anteriores; y/o
- 30 (b) el tensioactivo está presente en la película hidrosoluble en una cantidad de al menos 0,05 phr, opcionalmente en un intervalo de 0,05 a 2 phr.
14. Un método de formación de una película hidrosoluble, que comprende
- 35 proporcionar una mezcla hidrosoluble como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, disuelta en agua;
- colar la mezcla disuelta sobre una superficie precalentada a una temperatura de menos de 77 °C, opcionalmente en un intervalo de 66 °C a 77 °C, o 74 °C;
- 40 secar el agua de la mezcla colada durante un período de menos de 24 horas, opcionalmente menos de 12 horas, opcionalmente menos de 8 horas, opcionalmente menos de 2 horas, opcionalmente menos de 1 hora, opcionalmente menos de 45 minutos, opcionalmente menos de 30 minutos, opcionalmente menos de 20 minutos, opcionalmente menos de 10 minutos, por ejemplo en un intervalo de 6 minutos a 10 minutos, u 8 minutos, para formar una película hidrosoluble.
- 45 15. Un método de formación de una película hidrosoluble como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en el que la película hidrosoluble se cuele a partir de una mezcla hidrosoluble preparada de acuerdo con las etapas de:
- 50 proporcionar una mezcla de resina hidrosoluble que comprende una resina de poli(alcohol vinílico), agua, sustrato enzimático y aditivos opcionales excluyendo enzimas;
- hervir la mezcla durante al menos 30 minutos;
- 55 desgasificar la mezcla en un horno a una temperatura de al menos 40 °C; opcionalmente en un intervalo de 40 °C a 70 °C, por ejemplo, 65 °C;
- añadir al menos una enzima, opcionalmente al menos un plastificante, y opcionalmente agua adicional a la mezcla a una temperatura de 65 °C o menos, en la que el sustrato enzimático en la mezcla es un sustrato para dicha enzima; y
- 60 agitar la mezcla, opcionalmente sin vórtice, hasta que la mezcla tenga un color y una consistencia sustancialmente uniformes; opcionalmente durante un período de tiempo en un intervalo de 30 minutos a 90 minutos, opcionalmente al menos 1 hora; y
- 65 colar la mezcla rápidamente después del período de tiempo de agitación, de manera de formar una película



hidrosoluble como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-13.