(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 684 606**

(51) Int. CI.:

C11D 3/386 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.04.2015 PCT/EP2015/057883**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **15.10.2015 WO15155350**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.04.2015 E 15715275 (2)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.06.2018 EP 3129457**

(54) Título: **Composición detergente**

(30) Prioridad:

11.04.2014 EP 14164424
02.05.2014 EP 14166842
28.05.2014 EP 14170342
16.06.2014 EP 14172544
10.02.2015 EP 15154471

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.10.2018

(73) Titular/es:

NOVOZYMES A/S (100.0%)
Krogshoejvej 36
2880 Bagsvaerd, DK

(72) Inventor/es:

GORI, KLAUS;
ALLESEN-HOLM, MARIE;
BALTSEN, LILIAN EVA TANG;
NOERGAARD, ALLAN y
LEHMBECK, JAN

(74) Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

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

Composición detergente

Referencia a un listado de secuencias

[0001] Esta solicitud contiene un listado de secuencias en formato legible por ordenador, que se incorpora en este documento por referencia.

Campo de la invención

[0002] La presente invención se refiere a una composición detergente y farmacéutica que comprende una desoxirribonucleasa (DNasa), donde la DNasa se obtiene a partir de una fuente fúngica. Además, se refiere a un método de lavado y al uso de DNasa. La presente invención se refiere además a polipéptidos que tienen actividad de DNasa, nucleótidos que codifican el polipéptido, al igual que métodos de producción de los polipéptidos.

Antecedentes de la invención

[0003] Los microorganismos viven generalmente fijados a superficies en muchos ambientes naturales, industriales y médicos, encapsulados por sustancias extracelulares que incluyen biopolímeros y macromoléculas. La capa resultante de limo de microorganismo encapsulado se denomina una biopelícula. Las biopelículas son el modo predominante de crecimiento de bacterias en el ambiente natural, y las bacterias que crecen en biopelículas exhiben propiedades fisiológicas diferentes. En comparación con sus equivalentes que han crecido planctónicamente, las bacterias de una biopelícula son más resistentes a los antibióticos, la irradiación UV, los detergentes y la respuesta inmune del huésped.

[0004] Una biopelícula puede incluir uno o más microorganismos, que incluyen bacterias grampositivas y gramnegativas, algas, protozoos, y/o levadura u hongos filamentosos y virus y/o bacteriófagos. Ejemplos de biopelículas problemáticas son placa dental, infecciones en implantes médicos, pero también la contaminación inicial en cascos de los barcos. Las biopelículas se atribuyen a las patogénesis de muchas infecciones en seres humanos y son un problema significativo en la industria en cuanto a biocontaminación de superficies expuestas, donde la colonización en biopelícula puede formar el componente de base de un ecosistema localizado que puede interrumpir e interferir en procesos y componentes industriales.

[0005] Cuando se usan artículos de la colada tales como camisetas o ropa de deporte, se exponen a bacterias del cuerpo del usuario y del resto del ambiente en el que se usan. Algunas de estas bacterias son capaces de adherirse al artículo de la colada y formar una biopelícula en el artículo. La presencia de bacterias implica que los artículos de la colada se vuelven pegajosos y, por lo tanto, la suciedad se adhiere a las áreas pegajosas. Esta suciedad ha resultado ser difícil de eliminar por las composiciones detergentes disponibles comercialmente. Además, cuando se lavan artículos de la colada muy sucios junto con artículos de la colada menos sucios, la suciedad presente en la solución de lavado tiende a pegarse a la biopelícula. Como resultado de esto, el artículo de la colada está más "manchado" después del lavado que antes del lavado. Además, estas bacterias son una fuente de mal olor, que se desarrolla después del uso del artículo de la colada. El mal olor es difícil de eliminar y puede permanecer incluso después del lavado. La razón de este mal olor es la adhesión de bacterias a la superficie del textil. Debido a la adhesión al textil, las bacterias pueden permanecer incluso después del lavado y continuar siendo una fuente de mal olor.

[0006] La solicitud de patente internacional WO 2011/098579 se refiere a compuestos de desoxirribonucleasa bacteriana y métodos para interrumpir y prevenir la biopelícula.

Resumen de la invención

[0007] La presente invención se refiere a una composición detergente que comprende un polipéptido que tiene actividad de desoxirribonucleasa (DNasa) y un ingrediente adjunto detergente, donde la DNasa se obtiene a partir de una fuente fúngica y donde el polipéptido se obtiene de *Aspergillus*. La invención se refiere adicionalmente al uso de un polipéptido que tiene actividad de DNasa para prevenir, reducir o eliminar una biopelícula a partir de un artículo, donde el polipéptido se obtiene a partir de una fuente fúngica y el artículo es un textil y donde el polipéptido que tiene actividad de DNasa tiene al menos el 80 % de identidad de secuencia con el polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 9.

[0008] La invención también se refiere a un método de lavado de un artículo que incluye las etapas de:

a. Exponer un artículo a una solución de lavado que comprende un polipéptido donde el polipéptido que tiene actividad de DNasa tiene al menos el 80 % de identidad de secuencia con el polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 9 o una composición detergente según cualquiera de las reivindicaciones 8-10;

b. Completar al menos un ciclo de lavado; y
c. Opcionalmente enjuagar el artículo, donde el artículo es un textil.

Definiciones

[0009] Variante alélica: el término "variante alélica" significa cualquiera de dos o más formas alternativas de un gen que ocupa el mismo locus cromosómico. La variación alélica surge naturalmente a través de mutación, y puede resultar en polimorfismo dentro de poblaciones. Las mutaciones genéticas pueden ser silenciosas (sin cambio en el polipéptido codificado) o pueden codificar polipéptidos que tienen secuencias de aminoácidos alteradas. Una variante alélica de un polipéptido es un polipéptido codificado por una variante alélica de un gen.

[0010] Biopelícula: una biopelícula es cualquier grupo de microorganismos en el que las células se pegan entre sí en una superficie, tal como un textil, vajilla o superficie dura. Estas células adherentes se introducen frecuentemente en una matriz autoproducida de sustancia polimérica extracelular (EPS). La EPS de la biopelícula es una conglomeración polimérica generalmente compuesta por ADN extracelular, proteínas, y polisacáridos. Las biopelículas pueden formarse en superficies vivas o no vivas. Las células microbianas que crecen en una biopelícula son diferentes fisiológicamente de las células planctónicas del mismo organismo, que, en contraste, son células únicas que pueden flotar o nadar en un medio líquido.

[0011] Las bacterias que viven en una biopelícula normalmente tienen propiedades significativamente diferentes de las bacterias que flotan libremente de las mismas especies, ya que el ambiente denso y protegido de la película les permite cooperar e interactuar de varias maneras. Un beneficio de este ambiente es la resistencia aumentada a detergentes y antibióticos, ya que la matriz extracelular densa y la capa externa de células protege el interior de la comunidad.

[0012] En la colada, las bacterias que producen biopelículas se pueden encontrar entre las especies siguientes: *Acinetobacter sp., Aeromicrobium sp., Brevundimonas sp., Microbacterium sp., Micrococcus luteus, Pseudomonas sp., Staphylococcus epidermidis*, y *Stenotrophomonas sp*.

[0013] ADNc: el término "ADNc" significa una molécula de ADN que se puede preparar por transcripción inversa a partir de una molécula de ARNm maduro empalmado obtenida a partir de una célula eucariótica o procariótica. El ADNc carece de secuencias de intrones que pueden estar presentes en el ADN genómico correspondiente. La transcripción de ARN inicial primario es un precursor para ARNm que se procesa a través de una serie de etapas, que incluyen empalme, antes de aparecer como ARNm empalmado maduro.

[0014] Secuencia codificante: el término "secuencia codificante" significa un polinucleótido, que especifica directamente la secuencia de aminoácidos de un polipéptido. Los límites de la secuencia codificante se determinan generalmente por un marco de lectura abierto, que empieza con un codón de inicio tal como ATG, GTG o TTG y termina con un codón de fin tal como TAA, TAG o TGA. La secuencia codificante puede ser un ADN genómico, ADNc, ADN sintético, o una combinación de los mismos.

[0015] Diferencia de color (valor L): un espacio de color Lab es un espacio de colores opuestos con dimensión L para luminosidad. Valor L, L* representa el negro más oscuro en L* = 0, y el blanco más brillante en L* = 100. En el contexto de la presente invención, también se hace referencia al valor L como diferencia de color.

[0016] Secuencias de control: el término "secuencias de control" significa secuencias de ácido nucleico necesarias para la expresión de un polinucleótido que codifica un polipéptido maduro de la presente invención. Cada secuencia de control puede ser nativa (es decir, del mismo gen) o foránea (es decir, de un gen diferente) al polinucleótido que codifica el polipéptido o nativa o foránea entre ellas. Tales secuencias de control incluyen, pero de forma no limitativa, un líder, una secuencia de poliadenilación, una secuencia de propéptido, un promotor, una secuencia de péptido señal, y un terminador de transcripción. Como mínimo, las secuencias de control incluyen un promotor, y señales de parada transcripcional y traduccional. Las secuencias de control se pueden proporcionar con enlaces con el fin de introducir sitios de restricción específicos que faciliten el ligamento de las secuencias de control con la región codificante del polinucleótido que codifica un polipéptido.

[0017] Por el término "limpieza profunda" se entiende interrupción o eliminación de una biopelícula o componentes de una biopelícula tales como polisacáridos, proteínas, ADN, suciedad u otros componentes presentes en la biopelícula.

[0018] Ingrediente adjunto detergente: el ingrediente adjunto detergente es diferente a la DNasa de esta invención. La naturaleza precisa de estos componentes adjuntos adicionales, y los niveles de incorporación de los mismos, dependerán de la forma física de la composición y la naturaleza de la operación para la que se vaya a utilizar. Materiales adjuntos adecuados incluyen, pero de forma no limitativa, los componentes descritos más adelante tales como tensioactivos, adyuvantes, auxiliares de floculación, agentes quelantes, inhibidores de la transferencia de tintes, enzimas, estabilizadores enzimáticos, inhibidores enzimáticos, materiales catalíticos, activadores de blanqueo, peróxido de hidrógeno, fuentes de peróxido de hidrógeno, perácidos preformados,

agentes de dispersión poliméricos, agentes de eliminación/antirredeposición de la suciedad arcillosa, abrillantadores, supresores de jabonadura, tintes, perfumes, agentes elastizantes de la estructura, suavizantes de tejidos, portadores, hidrótropos, adyuvantes y coadyuvantes, agentes de matizado de tejidos, agentes antiespumantes, dispersantes, auxiliares de procesamiento, y/o pigmentos.

[0019] Composición detergente: el término "composición detergente" se refiere a composiciones que encuentran su uso en la eliminación de compuestos no deseados de artículos que se van a limpiar, tales como tejidos. La composición detergente se puede utilizar, por ejemplo, para limpiar textiles tanto para limpieza en casa como para limpieza industrial. Los términos abarcan cualesquiera materiales/compuestos seleccionados para el tipo particular de composición de limpieza deseado y la forma del producto (por ejemplo, composiciones líquidas, en gel, en polvo, granuladas, en pasta, o pulverizadas) e incluyen, pero de forma no limitativa, composiciones detergentes (por ejemplo, detergentes para la colada líquidos y/o sólidos y detergentes de tejidos suaves; ambientadores de tejidos; suavizantes de tejidos; preidentificadores/pretratamiento de textiles para la colada). Además de contener la enzima de la invención, la formulación detergente puede contener una o más enzimas adicionales (tales como proteasas, amilasas, lipasas, cutinasas, celulasas, endoglucanasas, xiloglucanasas, pectinasas, pectina liasas, xantanasas, peroxidasas, haloperoxigenasas, catalasas y mananasas, o cualquier mezcla de las mismas), y/o ingredientes adjuntos detergentes tales como tensioactivos, adyuvantes, quelantes o agentes quelantes, sistema de blanqueo o componentes de blanqueo, polímeros, acondicionadores de tejidos, potenciadores de espuma, supresores de jabonadura, tintes, perfume, inhibidores de bronceado, abrillantadores ópticos, bactericidas, fungicidas, agentes de suspensión de la suciedad, agentes anticorrosivos, inhibidores o estabilizadores enzimáticos, activadores enzimáticos, transferasa(s), enzimas hidrolíticas, oxidorreductasas, agentes de azulado y tintes fluorescentes, antioxidantes, y solubilizantes.

[0020] DNasa (desoxirribonucleasa): el término "DNasa" significa un polipéptido con actividad de DNasa que cataliza la escisión hidrolítica de enlaces fosfodiéster en la estructura del ADN, degradando así el ADN. Para los fines de la presente invención, la actividad de DNasa se determina según el procedimiento descrito en el ensayo I. En un aspecto, los polipéptidos de la presente invención tienen al menos el 20 %, por ejemplo, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, o al menos el 100 % de la actividad de DNasa del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 2. En una forma de realización, los polipéptidos de la presente invención tienen actividad de DNasa mejorada, por ejemplo de manera que la actividad de DNasa del polipéptido es de al menos el 105 %, por ejemplo, al menos el 110 %, al menos el 120 %, al menos el 130 %, al menos el 140 %, al menos el 160 %, al menos el 170 %, al menos el 180 %, o al menos el 200 % con referencia a la actividad de DNasa del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 2.

[0021] Beneficio de la detergencia enzimática: el término "beneficio de la detergencia enzimática" se define en este documento como el efecto ventajoso que puede añadir una enzima a un detergente en comparación con el mismo detergente sin la enzima. Beneficios de la detergencia importantes que se pueden proporcionar por las enzimas son la eliminación de manchas sin ninguna suciedad o con muy poca suciedad visible después del lavado y/o la limpieza, la prevención o la reducción de la redeposición de la suciedad liberada en el proceso de lavado (un efecto que también se denomina antirredeposición), la restauración completa o parcial de la blancura de los textiles que eran originalmente blancos, pero que después del uso y el lavado repetido han obtenido una apariencia grisácea o amarillenta (un efecto que también se denomina blanqueamiento). Los beneficios del cuidado de textiles, que no se relacionan directamente con la eliminación de manchas catalíticas o la prevención de la redeposición de la suciedad, son importantes también para los beneficios de la detergencia enzimática. Ejemplos de tales beneficios del cuidado de textiles son la prevención o la reducción de la transferencia de tintes de un tejido a otro tejido u otra parte del mismo tejido (un efecto que también se denomina inhibición de la transferencia de tintes o antirretrotinción), la eliminación de fibras rotas o que sobresalen de una superficie del tejido para reducir las tendencias al frisado o eliminar las bolitas o la pelusa ya existentes (un efecto que también se denominada antifrisado), la mejora de la suavidad del tejido, el aclaramiento del color del tejido y la eliminación de la suciedad particulada que se retiene en las fibras del tejido o la prenda. El blanqueo enzimático es un beneficio de la detergencia enzimática adicional donde la actividad catalítica generalmente se utiliza para catalizar la formación de componentes de blanqueo tales como peróxido de hidrógeno u otros peróxidos.

[0022] Expresión: el término "expresión" incluye cualquier paso implicado en la producción de un polipéptido que incluye, pero de forma no limitativa, transcripción, modificación postranscripcional, traducción, modificación postraduccional y secreción.

[0023] Vector de expresión: el término "vector de expresión" significa una molécula de ADN lineal o circular que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido y que está operativamente enlazado a secuencias de control que proporcionan su expresión.

[0024] Fragmento: el término "fragmento" significa un polipéptido que tiene uno o más (por ejemplo, varios) aminoácidos ausentes del terminal amino y/o carboxilo de un polipéptido o dominio maduro; donde el fragmento tiene actividad de DNasa. En un aspecto, un fragmento contiene al menos 206 residuos de aminoácidos (por ejemplo, los aminoácidos 1 a 206 de la SEQ ID N.º: 2), al menos 205 residuos de aminoácidos (por ejemplo, los

aminoácidos 2 a 206 de la SEQ ID N.º: 2), o al menos 204 residuos de aminoácidos (por ejemplo, los aminoácidos 3 a 206 de la SEQ ID N.º: 2).

[0025] Fúngico: en el contexto de la presente invención, el término "fúngico" en relación con un polipéptido (tal como una enzima, por ejemplo, una DNasa) se refiere a un polipéptido codificado por, y por lo tanto derivable directamente del genoma de un hongo, donde tal hongo no se ha modificado genéticamente para codificar dicho polipéptido, por ejemplo, introduciendo la secuencia codificante en el genoma por tecnología del ADN recombinante. En el contexto de la presente invención, el término "DNasa fúngica" o "polipéptido que tiene actividad de DNasa obtenido a partir de una fuente fúngica" se refiere, por lo tanto, a una DNasa codificada por, y por lo tanto derivable directamente del genoma de una especie fúngica, donde la especie fúngica no se ha sometido a una modificación genética que introduzca ADN recombinante que codifique dicha DNasa. Así, la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido fúngico que tiene actividad de DNasa es una secuencia natural en el contexto genético de una especie fúngica. El polipéptido fúngico que tiene codificación de actividad de DNasa por tal secuencia también se puede referir a una DNasa de tipo salvaje (o DNasa progenitora). En otro aspecto, la invención proporciona polipéptidos que tienen actividad de DNasa, donde dichos polipéptidos son sustancialmente homólogos a una DNasa fúngica. En el contexto de la presente invención, el término "sustancialmente homólogos" denota un polipéptido que tiene actividad de DNasa que es al menos el 80 %, preferiblemente al menos el 85 %, más preferiblemente al menos el 90 %, más preferiblemente al menos el 95 %, aún más preferiblemente al menos el 96 %, el 97 %, el 98 % y de la forma más preferible al menos el 99 % idéntico a la secuencia de aminoácidos de una DNasa fúngica seleccionada. Los polipéptidos que son sustancialmente homólogos a una DNasa fúngica se pueden incluir en el detergente de la presente invención y/o usarse en los métodos de la presente invención.

[0026] Célula huésped: el término "célula huésped" significa cualquier tipo de célula que es susceptible de transformación, transfección, transducción, o similares con un constructo de ácido nucleico o vector de expresión que comprende un polinucleótido de la presente invención. El término "célula huésped" abarca cualquier progenie de una célula progenitora que no sea idéntica a la célula progenitora debido a mutaciones que ocurren durante la replicación.

[0027] Rendimiento del lavado mejorado: el término "rendimiento del lavado mejorado" se define en este documento como una enzima que muestra un mayor rendimiento del lavado en una composición detergente con respecto al rendimiento del lavado de la misma composición detergente sin la enzima, por ejemplo, con mayor eliminación de manchas o menor redeposición. El término "rendimiento del lavado mejorado" incluye rendimiento del lavado en la colada.

[0028] Aislado: el término "aislado" significa una sustancia en una forma o ambiente que no ocurre en la naturaleza. Ejemplos no limitativos de sustancias aisladas incluyen (1) cualquier sustancia que no ocurra de forma natural, (2) cualquier sustancia, incluido, pero de forma no limitativa, cualquier enzima, variante, ácido nucleico, proteína, péptido o cofactor, que se elimina al menos parcialmente de uno o más o de todos los constituyentes que se dan de forma natural con los que se asocia en la naturaleza; (3) cualquier sustancia modificada por la mano del hombre con respecto a esa sustancia encontrada en la naturaleza; o (4) cualquier sustancia modificada mediante el aumento de la cantidad de la sustancia con respecto a otros componentes con los que se asocia naturalmente (por ejemplo, producción recombinante en una célula huésped; copias múltiples de un gen que codifica la sustancia; y uso de un promotor más fuerte que el promotor naturalmente asociado al gen que codifica la sustancia). Una sustancia aislada puede estar presente en una muestra de caldo de fermentación; por ejemplo, una célula huésped se puede modificar genéticamente para expresar el polipéptido de la invención. El caldo de fermentación de esa célula huésped comprenderá el polipéptido aislado.

[0029] Lavado: el término "lavado" se refiere tanto a lavado en casa como a lavado industrial y significa el proceso de tratamiento de textiles con una solución que contiene una composición de limpieza o detergente de la presente invención. El proceso de lavado puede llevarse a cabo, por ejemplo, utilizando una lavadora doméstica o industrial o puede llevarse a cabo a mano.

[0030] Por el término "mal olor" se entiende un olor que no se desea en artículos limpios. El artículo limpiado debería oler a fresco y limpio sin malos olores adheridos al artículo. Un ejemplo de mal olor es un compuesto con un olor desagradable, que puede estar producido por microorganismos. Otro ejemplo de olores desagradables puede ser el olor a sudor u olor corporal adherido a un artículo que ha estado en contacto con un humano o animal. Otro ejemplo de mal olor puede ser el olor de las especias, que se pega a los artículos, por ejemplo, el curry u otras especias exóticas que huelen fuertemente. Una manera de medir la capacidad de un artículo para adherir mal olor es el uso del ensayo II descrito en este documento.

[0031] Polipéptido maduro: el término "polipéptido maduro" significa un polipéptido en su forma final después de la traducción y de cualquier modificación postraduccional, tales como tratamiento del N-terminal, truncamiento del C-terminal, glicosilación, fosforilación, etc. En un aspecto, el polipéptido maduro son los aminoácidos 1 a 206 de la SEQ ID N.º: 2 y los aminoácidos -37 a -16 de la SEQ ID N.º: 2 son un péptido señal y los aminoácidos -15 a -1 de la SEQ ID N.º: 2 son un propéptido. Se conoce en la técnica que una célula huésped puede producir una

mezcla de dos o más polipéptidos maduros diferentes (es decir, con un aminoácido C-terminal y/o N-terminal diferente) expresado por el mismo polinucleótido. También se conoce en la técnica que células huésped diferentes procesan polipéptidos diferentemente y, por lo tanto, una célula huésped que expresa de un polinucleótido puede producir un polipéptido maduro diferente (por ejemplo, con un aminoácido C-terminal y/o N-terminal diferente) en comparación con otra célula huésped que expresa el mismo polinucleótido. En un aspecto, un polipéptido maduro contiene hasta 206 residuos de aminoácidos y de la SEQ ID N.º: 2 o la SEQ ID N.º: 9 (por ejemplo, los aminoácidos 1 a 206 de la SEQ ID N.º: 2), o hasta 204 residuos de aminoácidos (por ejemplo, los aminoácidos 3 a 206 de la SEQ ID N.º: 2).

[0032] Secuencia codificante del polipéptido maduro: el término "secuencia codificante del polipéptido maduro" significa un polinucleótido que codifica un polipéptido maduro que tiene actividad de DNasa. En un aspecto, la secuencia codificante del polipéptido maduro son los nucleótidos unidos 1 a 242, 309 a 494, 556 a 714 y 766 a 907 de la SEQ ID N.º: 1.

[0033] Constructo de ácido nucleico: el término "constructo de ácido nucleico" significa una molécula de ácido nucleico, ya sea mono o bicatenaria, que se aísla a partir de un gen que se da de forma natural o que se modifica para contener segmentos de ácidos nucleicos de una manera que no existiría de otro modo en la naturaleza o que es sintética, que comprende una o más secuencias de control.

[0034] Operativamente enlazado: el término "operativamente enlazado" significa una configuración en la que una secuencia de control se coloca en una posición apropiada con respecto a la secuencia de codificación de un polinucleótido de manera que la secuencia de control dirija la expresión de la secuencia codificante.

[0035] Ingrediente adjunto farmacéutico significa cualquier excipiente farmacéutico adecuado para la formulación del compuesto farmacéutico.

[0036] Tales excipientes, portadores, vehículos, etc. son bien conocidos para los expertos en la técnica y se describen en libros de texto tales como Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985.

[0037] Los excipientes farmacéuticamente aceptables que son adecuados para el uso en las formulaciones de comprimidos incluyen, por ejemplo, diluyentes inertes, tales como carbonato de calcio, carbonato de sodio, lactosa, fosfato de calcio o fosfato de sodio; agentes de granulación y desintegración, por ejemplo, almidón de maíz, o ácido algínico; agentes aglutinantes, por ejemplo, almidón, gelatina o acacia, y agentes lubrificantes, por ejemplo, estearato de magnesio, ácido esteárico o talco. Los comprimidos pueden estar sin revestir o se pueden revestir por técnicas conocidas para retrasar la desintegración y la absorción en el tracto gastrointestinal y proporcionar así una acción prolongada sobre un periodo más largo. Por ejemplo, se puede emplear un material de retraso temporal tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo.

[0038] Para formulaciones de cápsula de gelatina dura, la sustancia activa se puede mezclar con un diluyente sólido inerte, por ejemplo, carbonato de calcio, fosfato de calcio o caolín. Para formulaciones de cápsula de gelatina blanda, la sustancia activa se puede mezclar con agua o un medio aceitoso, por ejemplo, aceite de cacahuete, parafina líquida o aceite de oliva.

[0039] Los excipientes adecuados para la producción de suspensiones acuosas incluyen agentes de suspensión, por ejemplo, carboximetilcelulosa de sodio, metilcelulosa, hidropropilmetilcelulosa, alginato de sodio, polivinilpirrolidona, goma tragacanto y goma de acacia; agentes de dispersión o humectantes pueden ser un fosfátido de origen natural, por ejemplo, lecitina, o productos de condensación de un óxido de alquileno con ácidos grasos, por ejemplo estearato de polioxietileno, o productos de condensación de óxido de etileno con alcoholes alifáticos de cadena larga, por ejemplo heptadecaetilenoxicetanol, o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales obtenidos de ácidos grasos y un hexitol tal como monooleato de sorbitol de polioxietileno, o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales obtenidos de ácidos grasos y anhídridos de hexitol, por ejemplo, monooleato de sorbitán de polietileno.

[0040] Las suspensiones acuosas también pueden contener uno o más conservantes, por ejemplo, benzoatos, tales como etilo, o p-hidroxibenzoato de n-propilo, uno o más agentes colorantes, uno o más agentes aromatizantes, y uno o más agentes edulcorantes, tales como sacarosa o sacarina.

[0041] Las suspensiones aceitosas se pueden formular mediante la suspensión de los ingredientes activos en un aceite vegetal, por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de oliva, aceite de sésamo o aceite de coco, o en un aceite mineral tal como parafina líquida. Las suspensiones aceitosas pueden contener un agente espesante, por ejemplo, cera de abejas, parafina dura o alcohol cetílico. Se pueden adicionar agentes edulcorantes y agentes aromatizantes. Estas composiciones se pueden conservar mediante la adición de un antioxidante tal como ácido ascórbico.

[0042] Valor de remisión: el rendimiento del lavado se expresa como un valor de remisión de las muestras manchadas. Después de lavar y enjuagar, las muestras se extendieron en plano y se dejaron secar al aire a temperatura ambiente durante toda la noche. Todas las muestras lavadas se evaluaron el día después del lavado. Las evaluaciones de la reflectancia de la luz de las muestras se hicieron utilizando un espectrofotómetro de reflectancia Macbeth Color Eye 7000 con una abertura muy pequeña. Las mediciones se hicieron sin UV en la luz incidente y se extrajo la remisión a 460 nm.

[0043] Identidad de secuencia: la relación entre dos secuencias de aminoácidos o entre dos secuencias de nucleótidos se describe por el parámetro "identidad de secuencia". Para los fines de la presente invención, la identidad de secuencia entre dos secuencias de aminoácidos se determina utilizando el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453) como se implementa en el programa Needle del paquete EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice *et al*., 2000, Trends Genet. 16: 276-277), preferiblemente versión 5.0.0 o posterior. Los parámetros usados son penalización por apertura de espacio de 10, penalización por extensión de espacio de 0,5, y la matriz de sustitución EBLOSUM62 (versión EMBOSS de BLOSUM62). El resultado de Needle etiquetado como "mayor identidad" (obtenido utilizando la opción no resumida) se usa como la identidad porcentual y se calcula de la siguiente manera:

(Residuos idénticos x 100) / (Longitud del alineamiento – Número total de espacios en el alineamiento)

[0044] Para los fines de la presente invención, la identidad de secuencia entre dos secuencias de desoxirribonucleótidos se determina utilizando el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970, *supra*) como se implementa en el programa Needle del paquete EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice *et al*., 2000, *supra*), preferiblemente versión 5.0.0 o posterior. Los parámetros usados son penalización por apertura de espacio de 10, penalización por extensión de espacio de 0,5, y la matriz de sustitución EDNAFULL (versión EMBOSS de NCBI NUC4.4). El resultado de Needle etiquetado como "mayor identidad" (obtenido utilizando la opción no resumida) se usa como la identidad porcentual y se calcula de la siguiente manera:

(Desoxirribonucleótidos idénticos x 100) / (Longitud del alineamiento – Número total de espacios en el alineamiento)

[0045] Textil: el término "textil" significa cualquier material textil, incluidos hilos, intermediarios de hilos, fibras, materiales no tejidos, materiales naturales, materiales sintéticos, y cualquier otro material textil, tejidos hechos de estos materiales y productos hechos de tejidos (por ejemplo, prendas y otros artículos). El textil o tejido puede ser en forma de puntos, tejidos, vaquero, no tejidos, fieltros, hilos y paños. El textil puede tener una base de celulosa tal como celulósicos naturales, que incluyen celulósicos de algodón, de linaza/lino, de yute, de ramio, de sisal o de coco o artificiales (por ejemplo, originados a partir de pulpa de madera), que incluyen viscosa/rayón, fibras de acetato de celulosa (tricell), lyocell o mezcla de los mismos. El textil o tejido también puede tener una base no celulósica, tal como poliamidas naturales, incluidas lana, camello, cachemir, mohair, conejo y seda o polímeros sintéticos tales como nilón, aramida, poliéster, acrílico, polipropileno y spandex/elastano, o mezclas de los mismos al igual que mezclas de fibras con base de celulosa y base no celulósica. Ejemplos de mezclas son las mezclas de algodón y/o rayón/viscosa con uno o más materiales acompañantes tales como lana, fibra sintética (por ejemplo, fibra de poliamida, fibra acrílica, fibra de poliéster, fibra de cloruro de polivinilo, fibra de poliuretano, fibra de poliurea, fibra de aramida), y/o fibra que contiene celulosa (por ejemplo, rayón/viscosa, ramio, linaza/lino, yute, fibra de acetato de celulosa, lyocell). El tejido puede ser colada lavable convencional, por ejemplo, colada doméstica manchada. Cuando se usa el término tejido o prenda, se pretende incluir también el término más amplio textiles. En el contexto de la presente invención, el término "textil" también abarca tejidos.

[0046] Condiciones de astringencia: el término "condiciones de muy baja astringencia" significa para sondas de al menos 100 nucleótidos de longitud, prehibridación e hibridación a 42 °C en 5X SSPE, 0,3 % de SDS, 200 microgramos/ml de ADN de esperma de salmón cortado y desnaturalizado ADN, y 25 % de formamida, después de procedimientos estándar de transferencia de Southern durante de 12 a 24 horas. El material portador se lava finalmente tres veces cada una durante 15 minutos utilizando 2X SSC, 0,2 % de SDS a 45 °C.

[0047] El término "condiciones de baja astringencia" significa para sondas de al menos 100 nucleótidos de longitud, prehibridación e hibridación a 42 °C en 5X SSPE, 0,3 % de SDS, 200 microgramos/ml de ADN de esperma de salmón cortado y desnaturalizado, y 25 % de formamida, después de procedimientos estándar de transferencia de Southern durante de 12 a 24 horas. El material portador se lava finalmente tres veces cada una durante 15 minutos utilizando 2X SSC, 0,2 % de SDS a 50 °C.

[0048] El término "condiciones de media astringencia" significa para sondas de al menos 100 nucleótidos de longitud, prehibridación e hibridación a 42 °C en 5X SSPE, 0,3 % de SDS, 200 microgramos/ml de ADN de esperma de salmón cortado y desnaturalizado, y 35 % de formamida, después de procedimientos estándar de transferencia de Southern durante de 12 a 24 horas. El material portador se lava finalmente tres veces cada una durante 15 minutos utilizando 2X SSC, 0,2 % de SDS a 55 °C.

[0049] El término "condiciones de media-alta astringencia" significa para sondas de al menos 100 nucleótidos de longitud, prehibridación e hibridación a 42 °C en 5X SSPE, 0,3 % de SDS, 200 microgramos/ml de ADN de esperma de salmón cortado y desnaturalizado, y 35 % de formamida, después de procedimientos estándar de transferencia de Southern durante de 12 a 24 horas. El material portador se lava finalmente tres veces cada una durante 15 minutos utilizando 2X SSC, 0,2 % de SDS a 60 °C.

[0050] El término "condiciones de alta astringencia" significa para sondas de al menos 100 nucleótidos de longitud, prehibridación e hibridación a 42 °C en 5X SSPE, 0,3 % de SDS, 200 microgramos/ml de ADN de esperma de salmón cortado y desnaturalizado, y 50 % de formamida, después de procedimientos estándar de transferencia de Southern durante de 12 a 24 horas. El material portador se lava finalmente tres veces cada una durante 15 minutos utilizando 2X SSC, 0,2 % de SDS a 65 °C.

[0051] El término "condiciones de muy alta astringencia" significa para sondas de al menos 100 nucleótidos de longitud, prehibridación e hibridación a 42 °C en 5X SSPE, 0,3 % de SDS, 200 microgramos/ml de ADN de esperma de salmón cortado y desnaturalizado, y 50 % de formamida, después de procedimientos estándar de transferencia de Southern durante de 12 a 24 horas. El material portador se lava finalmente tres veces cada una durante 15 minutos utilizando 2X SSC, 0,2 % de SDS a 70 °C.

[0052] Subsecuencia: el término "subsecuencia" significa un polinucleótido que tiene uno o más (por ejemplo, varios) nucleótidos ausentes del extremo 5' y/o 3' de una secuencia codificante del polipéptido maduro; donde la subsecuencia codifica un fragmento que tiene actividad de DNasa. En un aspecto, una subsecuencia contiene al menos 796 nucleótidos (por ejemplo, los nucleótidos 112 a 907 de la SEQ ID N.º: 1), al menos 793 nucleótidos (por ejemplo, los nucleótidos 115 a 907 de la SEQ ID N.º: 1), o al menos 790 nucleótidos (por ejemplo, los nucleótidos 118 a 907 de la SEQ ID N.º: 1).

[0053] Textil: el término "textil" significa cualquier material textil, incluidos hilos, intermediarios de hilos, fibras, materiales no tejidos, materiales naturales, materiales sintéticos, y cualquier otro material textil, tejidos hechos de estos materiales y productos hechos de tejidos (por ejemplo, prendas y otros artículos). El textil o tejido puede ser en forma de puntos, tejidos, vaqueros, no tejidos, fieltros, hilos y paños. El textil puede tener una base de celulosa tal como celulósicos naturales, incluidos algodón, linaza/lino, yute, ramio, sisal o bonote o celulósicos artificiales (por ejemplo, originados a partir de pulpa de madera), incluidos viscosa/rayón, fibras de acetato de celulosa (tricell), lyocell o mezcla de los mismos. El textil o tejido también puede tener una base no celulósica tal como poliamidas naturales que incluyen lana, camello, cachemir, mohair, conejo y seda o polímeros sintéticos tales como nilón, aramida, poliéster, acrilo, polipropileno y spandex/elastano, o mezcla de los mismos al igual que mezclas de fibras con base de celulosa y con base no celulósica. Ejemplos de mezclas son las mezclas de algodón y/o rayón/viscosa con uno o más materiales acompañantes tales como lana, fibra sintética (por ejemplo, fibra de poliamida, fibra acrílica, fibra de poliéster, fibra de cloruro de polivinilo, fibra de poliuretano, fibra de poliurea, fibra de aramida), y/o fibra que contiene celulosa (por ejemplo, rayón/viscosa, ramio, linaza/lino, yute, fibra de acetato de celulosa, lyocell). El tejido puede ser colada sucia lavable convencional, por ejemplo, colada doméstica manchada. Cuando se usa el término tejido o prenda, se pretende incluir también el término más amplio textiles. En el contexto de la presente invención, el término "textil" también incluye tejidos.

[0054] Variante: el término "variante" significa un polipéptido que tiene la misma actividad que la enzima progenitora que comprende una alteración, es decir, una sustitución, inserción, y/o eliminación, en una o más (por ejemplo, varias) posiciones. Una sustitución significa un reemplazo del aminoácido que ocupa una posición con un aminoácido diferente; una eliminación significa una supresión del aminoácido que ocupa una posición; y una inserción significa una adición de un aminoácido adyacente e inmediatamente después del aminoácido que ocupa una posición. En el contexto de la presente invención, una variante de una DNasa identificada tiene la actividad enzimática del progenitor, es decir la capacidad de catalizar la escisión hidrolítica de los enlaces fosfodiéster en la estructura del ADN (actividad de desoxirribonucleasa). En una forma de realización, la actividad de desoxirribonucleasa de la variante se aumenta con referencia a la DNasa progenitora, por ejemplo, el polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 2.

[0055] Ciclo de lavado: el término "ciclo de lavado" se define en este documento como una operación de lavado donde los textiles se sumergen en la solución de lavado, se aplica acción mecánica de algún tipo al textil para liberar las manchas y para facilitar el flujo de la solución de lavado dentro y fuera del textil y finalmente se retira la solución de lavado sobrante. Después de uno o más ciclos de lavado, el textil generalmente se enjuaga y se seca.

[0056] Solución de lavado: el término "solución de lavado" se define en este documento como la solución o mezcla de agua y componentes detergentes que incluye opcionalmente la enzima de la invención.

[0057] Tiempo de lavado: el término "tiempo de lavado" se define en este documento como el tiempo que dura un proceso completo de lavado; es decir, el tiempo del ciclo (los ciclos) de lavado y el ciclo (los ciclos) de enjuague juntos.

[0058] Blancura: el término "blancura" se define en este documento como un término amplio con significados diferentes en regiones diferentes y para consumidores diferentes. La pérdida de blancura se puede deber, por ejemplo, al agrisado, al amarilleamiento, o a la eliminación de abrillantadores ópticos/agentes de matizado. El agrisado y el amarilleamiento se pueden deber a la redeposición de la suciedad, la suciedad corporal, la coloración a partir de, por ejemplo, iones de hierro y cobre o la transferencia de tintes. La blancura puede incluir uno o varios problemas de la lista siguiente: efectos de colorante o tinte; eliminación de manchas incompleta (por ejemplo, suciedad corporal, sebo, etc.); redeposición (agrisado, amarilleamiento u otras decoloraciones del objeto) (la suciedad eliminada se vuelve a asociar con otras partes del textil, sucias o no); cambios químicos en el textil durante la aplicación; y aclaramiento o abrillantamiento de los colores.

Descripción detallada de la invención

[0059] Los inventores han descubierto que los polipéptidos que tienen actividad de desoxirribonucleasa (DNasa) y que se obtienen a partir de una fuente fúngica se pueden usar para prevenir o eliminar la biopelícula en artículos tales como textiles y/o tejido. La biopelícula se puede desarrollar en el textil cuando los microorganismos están presentes en un artículo y se pegan al artículo. Algunos microorganismos tienden a adherirse a la superficie de artículos tales como textiles. Algunos microorganismos se adhieren a tales superficies y forman una biopelícula en la superficie. La biopelícula puede ser pegajosa y los microorganismos adheridos y/o la biopelícula pueden ser difíciles de eliminar. Además, la biopelícula se adhiere a la suciedad debido a la naturaleza pegajosa de la biopelícula. Las composiciones detergentes para la colada comerciales disponibles en el marcado no eliminan tales microorganismos adheridos o biopelícula.

[0060] La presente invención se refiere al uso de un polipéptido que tiene actividad de DNasa para prevenir, reducir o eliminar una biopelícula de un artículo, donde el polipéptido que tiene actividad de DNasa se obtiene a partir de una fuente fúngica y donde el artículo es un textil. En una forma de realización de la invención, el polipéptido que tiene actividad de DNasa se usa para prevenir, reducir o eliminar la pegajosidad de un artículo. El polipéptido que tiene actividad de DNasa se puede usar además para pretratar las manchas en textil tal como un textil con una cantidad pronunciada de biopelícula adherida al textil.

[0061] Adicionalmente, la invención se refiere al uso de un polipéptido que tiene actividad de DNasa para prevenir, reducir o eliminar la redeposición de la suciedad durante un ciclo de lavado. Cuando el polipéptido se usa, por ejemplo, en el lavado de un textil, el polipéptido obstaculiza la deposición de la suciedad presente en la solución de lavado para depositarse en el textil.

[0062] Además, la invención se refiere al uso de un polipéptido que tiene actividad de DNasa para prevenir, reducir o eliminar la adherencia de la suciedad a un artículo. En una forma de realización, el artículo es textil. Cuando la suciedad no se adhiere al artículo, el artículo parece más limpio. Así, la invención se refiere además al uso de un polipéptido que tiene actividad de DNasa para mantener o mejorar la blancura del artículo.

[0063] Cuando se usan artículos como camisetas o ropa de deporte, se exponen a bacterias del cuerpo del usuario y del resto del ambiente donde se usan. Esto puede causar mal olor en el artículo incluso después de que el artículo se lave. La presente invención, por lo tanto, también se refiere a la eliminación o reducción del mal olor en el textil. El mal olor puede estar provocado por compuestos de bacterias que producen compuestos con un olor desagradable. Un ejemplo de tales compuestos de olor desagradable es el E-2-nonenal. El mal olor puede estar presente en un textil recién lavado que sigue estando mojado. O el mal olor puede estar presente en un textil recién lavado, que se ha secado posteriormente. El mal olor también puede estar presente en un textil que se ha almacenado durante algún tiempo después del lavado. La presente invención se refiere a la reducción o eliminación del mal olor tal como E-2-nonenal de textil mojado o seco.

[0064] La presente invención se refiere además a una composición detergente que comprende un polipéptido que tiene actividad de DNasa y un ingrediente adjunto detergente, donde la DNasa se obtiene a partir de una fuente fúngica. La presente composición detergente se puede usar para prevenir, reducir o eliminar la biopelícula de un artículo, para prevenir, reducir o eliminar la pegajosidad de un artículo, para pretratar las manchas en el artículo, para prevenir, reducir o eliminar la redeposición de la suciedad durante un ciclo de lavado, para reducir o eliminar la adherencia de la suciedad a un artículo, para mantener o mejorar la blancura de un artículo y para prevenir, reducir o eliminar el mal olor de un artículo, tal como E-2-nonenal (véase el ejemplo 10, 13 y 14). La presente composición detergente supera los problemas de la técnica anterior.

[0065] Los inventores han descubierto sorprendentemente que unos polipéptidos que tienen actividad de DNasa obtenidos a partir de una fuente fúngica son más estables que los polipéptidos bacterianos que tienen actividad de DNasa cuando se formulan con otras enzimas detergentes. Especialmente, los inventores han descubierto que al formular la DNasa obtenida a partir de una fuente fúngica en una composición que comprende proteasa, la DNasa fúngica es más estable que la DNasa bacteriana obtenida a partir de una fuente bacteriana. El polipéptido que tiene actividad de DNasa se puede obtener de *Aspergillus*, por ejemplo, de *Aspergillus oryzae*. El polipéptido que tiene actividad de DNasa obtenida de *Aspergillus oryzae* ha mostrado ser más estable cuando se formula con proteasa que la combinación de DNasa bacteriana y proteasa (véase el ejemplo 11 y 12).

[0066] En una forma de realización de la invención, la composición detergente comprende el polipéptido que tiene actividad de DNasa como se reivindica en este documento.

[0067] En una forma de realización de la invención, el ingrediente adjunto detergente se selecciona del grupo que consiste en tensioactivos, adyuvantes, auxiliares de floculación, agentes quelantes, inhibidores de la transferencia de tintes, enzimas, estabilizadores enzimáticos, inhibidores enzimáticos, materiales catalíticos, activadores de blanqueo, peróxido de hidrógeno, fuentes de peróxido de hidrógeno, perácidos preformados, agentes de dispersión poliméricos, agentes de eliminación/antirredeposición de la suciedad arcillosa, abrillantadores, supresores de jabonadura, tintes, perfumes, agentes elastizantes de la estructura, suavizantes de tejidos, portadores, hidrótropos, adyuvantes y coadyuvantes, agentes de matizado de tejidos, agentes antiespumantes, dispersantes, auxiliares de procesamiento, y/o pigmentos.

[0068] El ingrediente adjunto detergente puede ser un tensioactivo. Una ventaja de incluir un tensioactivo en una composición detergente que comprende una DNasa fúngica es que se mejora el rendimiento del lavado. En una forma de realización, el ingrediente adjunto detergente es un adyuvante o un agente de eliminación/antirredeposición de la suciedad arcillosa.

[0069] En una forma de realización, el ingrediente adjunto detergente es una enzima. La composición detergente puede comprender una o más enzimas. La una o más enzimas se pueden seleccionar del grupo que consiste en proteasas, lipasas, cutinasas, amilasas, carbohidrasas, celulasas, pectinasas, mananasas, arabinasas, galactanasas, xilanasas y oxidasas.

[0070] Los inventores han descubierto que la DNasa obtenida de una fuente fúngica muestra buena estabilidad cuando se formula con otras enzimas. La DNasa obtenida de una fuente bacteriana ha mostrado tener una pobre estabilidad cuando la DNasa bacteriana se formula con otras enzimas tales como proteasas. Los inventores han descubierto que la DNasa obtenida de una fuente fúngica tiene estabilidad aumentada en comparación con la DNasa obtenida de una fuente bacteriana.

[0071] En una forma de realización de la invención, la composición detergente inventiva se formula con una proteasa, que es de origen animal, vegetal o microbiano. La proteasa es una proteína diseñada o modificada químicamente. La proteasa puede ser una serina proteasa o una metaloproteasa, preferiblemente una proteasa microbiana alcalina o una proteasa similar a la tripsina.

[0072] En una forma de realización de la invención, la proteasa se selecciona del grupo consistente en Bacillus, por ejemplo, subtilisina Novo, subtilisina Carlsberg, subtilisina 309, subtilisina 147, subtilisina 168, tripsina de origen de bovino, tripsina de origen porcino y proteasa de *Fusarium*. La proteasa puede tener al menos el 90 %, tal como al menos el 95 %, de identidad de secuencia con la SEQ ID N.º: 10. En una forma de realización, la proteasa tiene al menos el 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º: 10 o una variante de la misma 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, preferiblemente la variante es una proteasa alcalina que tiene al menos el 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º: 10 con la sustitución siguiente: M222S o las sustituciones N76D+G195E.

[0073] En una forma de realización, la composición detergente es capaz de reducir la adhesión de bacterias seleccionadas del grupo que consiste en *Acinetobacter sp., Aeromicrobium sp., Brevundimonas sp., Microbacterium sp., Micrococcus luteus, Pseudomonas sp., Staphylococcus epidermidis*, y *Stenotrophomonas sp*. a una superficie, o liberar las bacterias de una superficie a la que se adhieren.

[0074] En una forma de realización de la invención, la superficie es una superficie de textil. El textil puede estar hecho de algodón, algodón/poliéster, poliéster, poliamida, poliacrilo y/o seda.

[0075] La composición detergente se puede formular como una pastilla, un comprimido homogéneo, un comprimido con dos o más capas, una bolsa con uno o más compartimentos, un polvo regular o compacto, un gránulo, una pasta, un gel, o un líquido regular, compacto o concentrado. La composición detergente puede ser un detergente líquido, un detergente en polvo o un detergente en gránulos.

[0076] La invención se refiere adicionalmente a una composición detergente líquida que comprende un tensioactivo y un adyuvante detergente en una concentración total de al menos el 3 % en peso, y una microcápsula que contiene enzima detergente, donde la membrana de la microcápsula se produce por reticulación de una poliamina polirramificada que tiene un peso molecular superior a 1 kDa. Los inventores han descubierto que encapsulando enzimas en una microcápsula con una membrana semipermeable de la invención, y con una actividad de agua en el interior de estas cápsulas (antes de la adición al detergente líquido) superior que en el detergente líquido, la cápsulas experimentarán un colapso (parcial) cuando se añadan al detergente (el agua rezuma), dejando así un interior que contiene enzimas más concentradas y más viscosas en la cápsulas. El colapso de la membrana también puede resultar en una permeabilidad reducida. Esto se puede utilizar además

mediante la adición de estabilizadores/polímeros, especialmente unos que no sean permeables a través de la membrana. El colapso y el aumento resultante en la viscosidad reducirá/obstaculizará la difusión de componentes hostiles (por ejemplo, tensioactivos o secuestrantes) en las cápsulas, y aumentará así la estabilidad de almacenamiento de la enzima en el detergente líquido. Los componentes en el detergente líquido que son sensibles a la enzima (por ejemplo, los componentes que hacen de sustrato para la enzima) también se protegen contra la degradación por la enzima. Durante el lavado, el detergente líquido se diluye con agua, aumentando así la actividad de agua. El agua se difundirá ahora en las cápsulas (ósmosis). Las cápsulas se hincharán y la membrana se volverá o bien permeable a la enzima para que pueda dejar las cápsulas, o bien simplemente estallará y de esta manera liberará la enzima. El concepto es muy eficaz en la estabilización de las enzimas frente a componentes hostiles en el detergente líquido, y viceversa, también protege a los componentes sensibles a la enzima en el detergente líquido de las enzimas.

[0077] Ejemplos de componentes detergentes que son sensibles a las enzimas, y que se pueden degradar por enzimas, incluyen (enzima relevante en paréntesis): goma xantana (xantanasa), polímeros con enlaces estéricos (lipasa), aceite de ricino hidrogenado (lipasa), perfume (lipasa), tensioactivos de sulfonato de éster metílico, celulosa y derivados de celulosa (por ejemplo, CMC) (celulasa), y dextrina y ciclodextrina (amilasa).

[0078] También se pueden encapsular ingredientes detergentes sensibles y, por lo tanto, estabilizarse, en las microcápsulas de la invención. Los ingredientes detergentes sensibles son propensos a la degradación durante el almacenamiento. Tales ingredientes detergentes incluyen compuestos blanqueadores, activadores de blanqueo, perfumes, polímeros, adyuvante, tensioactivos, etc.

[0079] Generalmente, las microcápsulas de la invención se pueden utilizar para separar componentes/compuestos incompatibles en detergentes.

[0080] La adición de las microcápsulas a los detergentes se puede utilizar para influir en la apariencia visual del producto detergente, tal como un efecto opacificante (microcápsulas pequeñas) o un efecto de partículas claramente visibles (microcápsulas grandes). Las microcápsulas también se pueden colorear.

[0081] Las microcápsulas se pueden utilizar para reducir los niveles de polvo enzimático durante la manipulación y el procesamiento de los productos enzimáticos.

[0082] A menos que se indique lo contrario, todos los porcentajes se indican como porcentaje en peso (% p/p) en toda la solicitud.

[0083] Microcápsula: las microcápsulas se producen típicamente formando gotitas de agua en un continuo que no es miscible con agua, es decir, preparando típicamente una emulsión de agua en aceite, y posteriormente la formación de la membrana por polimerización interfacial vía adición de un agente de reticulación. Después de la curación eventual, la cápsula se puede recolectar y enjuagar adicionalmente y formularse por métodos conocidos en la técnica. La formulación de la cápsula se añade posteriormente al detergente.

[0084] La carga útil, los constituyentes principales de la membrana y el componente adicional eventual que se deben encapsular se encuentran en la fase acuosa. En el continuo se encuentran componentes que estabilizan las gotitas de agua hacia la coalescencia (emulsionantes, estabilizadores de emulsión, tensioactivos, etc.) y el agente de reticulación también se añade via el continuo.

[0085] La emulsión se puede preparar por cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, por agitación mecánica, procesos de goteo, emulsión de membrana, microfluidos, sonicación, etc. En algunos casos, la mezcla simple de las fases dará lugar automáticamente a una emulsión, frecuentemente referida como autoemulsión. La utilización de métodos que dan como resultado una distribución de tamaño reducido es una ventaja.

[0086] El agente (los agentes) de reticulación se añade(n) típicamente posteriormente a la emulsión, o directamente o más típicamente preparando una solución del agente de reticulación en un solvente que es soluble en la fase continua. La emulsión y el agente de reticulación o la solución del mismo se pueden mezclar por métodos convencionales usados en la técnica, por ejemplo, con mezcla simple o controlando cuidadosamente los flujos de la emulsión y la solución de agente de reticulación mediante un mezclador en línea.

[0087] En algunos casos, se necesita la curación de las cápsulas para completar la formación de la membrana. La curación es frecuentemente agitación simple de las cápsulas durante algún tiempo para permitir que termine la reacción de polimerización interfacial. En otros casos, la formación de la membrana se puede detener mediante la adición de un extinguidor de la reacción.

[0088] Las cápsulas se pueden modificar posteriormente, por ejemplo, reaccionando componentes sobre la membrana para obstaculizar o reducir la floculación de las partículas en el detergente como se describe en WO 99/01534.

[0089] Las cápsulas producidas se pueden aislar o concentrar por métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, por filtración, centrifugación, destilación o decantación de la dispersión de cápsulas.

[0090] Las cápsulas resultantes se pueden formular adicionalmente, por ejemplo, mediante la adición de tensioactivos para dar al producto las propiedades deseadas para almacenamiento, transporte y posterior manipulación y adición al detergente. Otros agentes de formulación de microcápsulas incluyen modificadores de reología, biocidas (por ejemplo; Proxel), ácido/base para el ajuste del pH (que también se ajustará dentro de las microcápsulas), y agua para el ajuste de la actividad del agua.

[0091] El proceso de formación de cápsulas puede incluir las etapas siguientes:

- Preparación de la(s) fase(s) inicial(es) acuosa(s) y aceitosa(s),
- Formación de una emulsión de agua en aceite,
- Formación de la membrana por polimerización interfacial,
- Modificación posterior opcional,
- Aislamiento opcional y/o formulación,
- Adición al detergente.

[0092] El proceso puede ser o un proceso discontinuo o un proceso continuo o semicontinuo.

[0093] Una microcápsula según la invención es una esfera acuosa pequeña con una membrana constante alrededor de ella. Al material dentro de la microcápsula se hace referencia como el núcleo, fase interna o relleno, mientras que la membrana se llama a veces un revestimiento, recubrimiento o pared. Las microcápsulas de la invención tienen diámetros de entre 0,5 µm y 2 milímetros. Preferiblemente, el diámetro medio de las microcápsulas está en el rango de 1 µm a 1000 µm, más preferiblemente en el rango de 5 µm a 500 µm, aún más preferiblemente en el rango de 10 µm a 500 µm, aún más preferiblemente en el rango de 50 µm a 500 µm, y de la forma más preferible en el rango de 50 µm a 200 µm. Alternativamente, el diámetro de las microcápsulas está en el rango de 0,5 µm a 30 µm; o en el rango de 1 µm a 25 µm. El diámetro de la microcápsula se mide en la fase aceitosa después de que la polimerización se haya completado. El diámetro de la cápsula puede cambiar dependiendo de la actividad del agua del ambiente químico circundante.

[0094] La microencapsulación de enzimas, como se usa en la presente invención, se puede realizar por polimerización interfacial, donde los dos reactivos de una reacción de polimerización se encuentran en una interfase y reaccionan rápidamente. La base de este método es una reacción de una poliamina con un derivado de ácido, normalmente un haluro de ácido, que actúa como un agente de reticulación. La poliamina es de manera preferible sustancialmente hidrosoluble (cuando está en la forma de base libre). Bajo las condiciones adecuadas, se forman membranas flexibles finas rápidamente en la interfase. Una manera de realizar la polimerización es usar una solución acuosa de la enzima y la poliamina, que se emulsionan con un solvente no acuoso (y un emulsionante), y se añade una solución con el derivado de ácido. Un agente alcalino puede estar presente en la solución enzimática para neutralizar el ácido formado durante la reacción. Las membranas de polímero (poliamida) se forman instantáneamente en la interfase de las gotitas de la emulsión. La membrana de polímero de la microcápsula es típicamente de una naturaleza catiónica y, por lo tanto, se une/forma complejo con compuestos de una naturaleza aniónica.

[0095] El diámetro de las microcápsulas se determina mediante el tamaño de las gotitas de la emulsión, que se controla, por ejemplo, mediante el ritmo de agitación.

[0096] Emulsión: una emulsión es una dispersión temporal o permanente de una fase líquida en una segunda fase líquida. Al segundo líquido se hace referencia generalmente como la fase continua. Los tensioactivos se usan comúnmente para ayudar en la formación y estabilización de emulsiones. No todos los tensioactivos son igualmente capaces de estabilizar una emulsión. Se necesita seleccionar el tipo y la cantidad de un tensioactivo para una utilidad de emulsión óptima especialmente con respecto a la preparación y la estabilidad física de la emulsión, y la estabilidad durante la dilución y el tratamiento adicional. La estabilidad física se refiere a mantener una emulsión en una forma de dispersión. Los procesos tales como coalescencia, agregación, adsorción a las paredes del contenedor, sedimentación y formación de crema, son formas de inestabilidad física, y se deberían evitar. Ejemplos de tensioactivos adecuados se describen en WO 97/24177, páginas 19-21; y en WO 99/01534.

[0097] Las emulsiones se pueden clasificar además o como emulsiones simples, donde la fase líquida dispersa es un líquido homogéneo simple, o como una emulsión más compleja, donde la fase líquida dispersa es una combinación heterogénea de fases líquidas o sólidas, tales como una emulsión doble o una emulsión múltiple. Por ejemplo, una emulsión doble de agua en aceite o emulsión múltiple se puede formar donde la propia fase acuosa contiene además una fase aceitosa emulsionada; este tipo de emulsión se puede especificar como una emulsión de aceite en agua en aceite (Aceite/Agua/Aceite). Alternativamente, una emulsión de agua en aceite se puede formar donde la fase acuosa contiene una fase sólida dispersa frecuentemente referida como una suspensión-emulsión. Otras emulsiones más complejas se pueden describir. Debido a la dificultad inherente al

describir tales sistemas, el término emulsión se utiliza para describir tanto emulsiones simples como más complejas sin limitar necesariamente la forma de la emulsión o el tipo y número de fases presentes.

[0098] Poliamina: la rigidez/flexibilidad y la permeabilidad de la membrana está principalmente influida por la elección de la poliamina. La poliamina según la invención es una poliamina polirramificada. Cada rama, que termina preferiblemente con un grupo amino primario, sirve como un punto de amarre en la red de la membrana, dando así las propiedades favorables de la invención. Una poliamina polirramificada según la presente invención es una poliamina que tiene más de dos puntos de ramificación y más de dos grupos amino reactivos (capaces de reaccionar con el agente de reticulación, es decir, grupos amino primarios y secundarios). La poliamina polirramificada se usa como material de partida cuando la emulsión se prepara - no se forma *in situ* a partir de otros materiales de partida. Para obtener las propiedades atractivas de la invención, la estructura polirramificada de la poliamina debe presentarse como material de partida.

[0099] Hay una estrecha relación entre el número de puntos de ramificación y el número de aminas primarias, ya que las aminas primarias siempre se posicionarán al final de una rama: una amina lineal puede solo contener dos aminas primarias. Para cada punto de ramificación introducido hipotéticamente en tal diamina lineal, se permitirá que una o más aminas primarias se introduzcan al final de la(s) rama(s) introducida(s). En este contexto entendemos el grupo amino primario como parte de la rama, es decir, el punto final de la rama. Por ejemplo, consideramos tanto la tris(2-aminoetil)amina como la 1,2,3-propanotriamina como moléculas con un punto de ramificación. Para la invención, la poliamina tiene al menos cuatro aminas primarias. Los puntos de ramificación se pueden introducir de una cadena de hidrocarburo alifático como en los ejemplos enunciados previamente o de enlaces de carbono insaturados, tales como en, por ejemplo, 3,3'-diaminobencidina, o de grupos amino terciarios, tales como en N,N,N',N'-tetraquis-(2-aminoetil)etilendiamina.

[0100] Además del número de puntos de ramificación, hemos encontrado que la compacidad de los grupos amino reactivos es de gran importancia. Una sustancia tal como, por ejemplo, N,N,N',N'-tetraquis-(12-aminododecil)etilendiamina no sería adecuada. Tampoco sería adecuado un péptido o proteína, tal como una enzima, para la formación de la membrana. Por lo tanto, la poliamina polirramificada no es un péptido o proteína.

[0101] En una forma de realización, los grupos amino reactivos constituyen al menos el 15 % del peso molecular de la poliamina polirramificada, tal como más del 20 %, o más del 25 %. Preferiblemente, el peso molecular de la poliamina polirramificada es de al menos 1 kDa; más preferiblemente, el peso molecular de la poliamina polirramificada es de al menos 1,3 kDa.

[0102] En una forma de realización preferida, la poliamina polirramificada es una polietilenimina (PEI), y modificaciones de la misma, con más de dos puntos de ramificación y más de dos grupos amino reactivos; donde los grupos amino reactivos constituyen al menos el 15 % del peso molecular de la PEI, tal como más del 20 %, o más del 25 %. Preferiblemente, el peso molecular de la PEI es de al menos 1 kDa.

[0103] Las combinaciones de diferentes poliaminas polirramificadas se pueden utilizar para la preparación de la microcápsula según la invención.

[0104] Las propiedades ventajosas (por ejemplo, estabilidad de almacenamiento de la enzima, fuga de enzima reducida, flujo reducido de entrada de ingredientes detergentes) de la microcápsula de la invención se pueden mejorar añadiendo una o más aminas pequeñas con un peso molecular inferior a 1 kDa. La amina pequeña es de manera preferible sustancialmente hidrosoluble (cuando está en la forma de base libre) y puede ser un material tal como etilendiamina, hexametilendiamina, hexadiamina, dietilentetramina, etiltetramina, diaminobenceno, piperazina, tetrametilenpentamina o, preferiblemente, dietilentriamina (DETA). Las aminas pequeñas se pueden adicionar en una cantidad de hasta el 50 %, preferiblemente hasta el 40 %, hasta el 30 %, hasta el 20 %, hasta el 10 %, o hasta el 5 %, en peso del contenido total de amina pequeña y poliamina polirramificada, cuando se prepara la microcápsula de la invención.

[0105] Agente de reticulación: el agente de reticulación como se usa en la presente invención es una molécula con al menos dos grupos/sitios capaces de reaccionar con aminas para formar enlaces covalentes.

[0106] El agente de reticulación es preferiblemente soluble en aceite y puede estar en la forma de un anhídrido de ácido o haluro de ácido, preferiblemente un cloruro de ácido. Por ejemplo, puede ser cloruro de adipoílo, cloruro de sebacoílo, cloruro de ácido dodecanodioico, cloruro de ftaloílo, cloruro de tereftaloílo, cloruro de isoftaloílo, o cloruro de trimesoílo; pero, preferiblemente, el agente de reticulación es cloruro de tereftaloílo o cloruro de trimesoílo.

[0107] La invención se refiere además a un método para el lavado de un artículo, método que comprende las etapas de:

a. Exponer un artículo a una solución de lavado que comprende el polipéptido inventivo o que tiene actividad de DNasa o una composición detergente que comprende el polipéptido;

b. Completar al menos un ciclo de lavado; y
c. Enjuagar opcionalmente el artículo,

donde el artículo es un textil.

[0108] El pH de la solución líquida está en el rango de 1 a 11, tal como en el rango de 5,5 a 11, tal como en el rango de 7 a 9, en el rango de 7 a 8 o en el rango de 7 a 8,5.

[0109] La solución de lavado puede tener una temperatura en el rango de 5 °C a 95 °C, o en el rango de 10 °C a 80 °C, en el rango de 10 °C a 70 °C, en el rango de 10 °C a 60 °C, en el rango de 10 °C a 50 °C, en el rango de 15 °C a 40 °C o en el rango de 20 °C a 30 °C. En una forma de realización, la temperatura de la solución de lavado es de 30 °C.

[0110] En una forma de realización de la invención, el método de lavado de un artículo comprende además drenar la solución de lavado o parte de la solución de lavado después de finalizar un ciclo de lavado. La solución de lavado se puede reutilizar después en un ciclo de lavado posterior o en un ciclo de enjuague posterior. El artículo se puede exponer a la solución de lavado durante un primer y opcionalmente un segundo o un tercer ciclo de lavado. En una forma de realización, el artículo se enjuaga después de exponerse a la solución de lavado. El artículo se puede enjuagar con agua o con agua que comprende un acondicionador.

[0111] La invención se refiere además a un artículo lavado según el método inventivo.

[0112] La invención se refiere además a una composición farmacéutica que comprende un polipéptido que tiene actividad de DNasa y un ingrediente adjunto farmacéutico, donde el polipéptido que tiene actividad de DNasa se obtiene a partir de una fuente fúngica. La composición se puede usar para liberar o eliminar una biopelícula o evitar la formación de biopelícula.

[0113] El compuesto antiparasitario puede ser uno o más de un benzazol, tal como albendazol, mebendazol y tiabendazol; un azol, tal como metronidazol y tinidazol; un macrociclo, tal como anfotericina B, rifampina e ivermectina; pirantel pamoato; dietilcarbamazina; niclosamida; praziquantel; melarsopro; y eflornitina.

[0114] El compuesto antivírico puede ser uno o más de un inhibidor de transcriptasa inversa análogo de nucleósido, tal como aciclovir, didanosina, estavudina, cidovudina, lamivudina, abacavir, emtricitabina y entecavir; un inhibidor sin recubrimiento tal como amantadina, rimantadina y pleconaril; un inhibidor de proteasa tal como saquinavir, ritonavir, indinavir, nelfinavir y amprenavir; zanamivir; oseltamivir; y rifampina. El compuesto antibacteriano puede ser uno o más de un aminoglicósido tal como gentamicina, canamicina y estreptomicina; un betalactama tal como penicilina, ampicilina e imipenemo; una cefalosporina tal como ceftazidima, una quinolona tal como ciprofloxacina; un macrólido tal como azitromicina, claritromicina, diritromicina, eritromicina, roxitromicina y telitromicina; una oxazolidinona tal como linezolid; una ansamicina tal como rifamicina; una sulfonamida; una tetraciclina tal como doxiciclina; un glicopéptido tal como vancomicina; sulfisoxazol, trimetoprima, novobiocina, daptomicina y linezolid.

[0115] El compuesto antifúngico puede ser uno o más de un azol, tal como miconazol, cetoconazol, clotrimazol, econazol, omoconazol, bifonazol, butoconazol, fenticonazol, isoconazol, sertaconazol, sulconazol, tioconazol, fluconazol, itraconazol, isavuconazol, ravuconazol, posaconazol, voriconazol, terconazol y abafungina; un macrociclo, tal como natamicina, rimocidina, filipina, nistatina, anfotericina B, candicina, hamicina; una amina de alilo tal como terbinafina, naftifina y butenafina; una equinocandina tal como andidulafungina, caspofungina y micafungina; u otros tales como poligodial, ciclopirox, tolnaftato, ácido benzoico, ácido undecilénico, flucitosina y griseofulvina.

[0116] La invención también se refiere a un dispositivo médico permanente caracterizado por el hecho de que al menos una porción de una superficie contactable con el paciente de dicho dispositivo se recubre con la composición farmacéutica.

[0117] El dispositivo puede ser un catéter tal como un catéter venoso central, catéter intravascular, catéter urinario, catéter de Hickman, catéter de diálisis peritoneal, catéter endrotraqueal, o donde el dispositivo es una válvula cardíaca mecánica, un marcapasos cardíaco, una derivación arteriovenosa, un cierre esclerótico, una prótesis de articulación, un tubo de timpanostomía, un tubo de traqueotomía, una prótesis de voz, una prótesis de pene, un esfínter urinario artificial, un cabestrillo pubovaginal sintético, una sutura quirúrgica, un anclaje óseo, un tornillo óseo, una lente intraocular, una lente de contacto, un dispositivo intrauterino, un injerto aortofemoral, un injerto vascular, una aguja, un conector Luer-Lok, un conector sin aguja o un instrumento quirúrgico.

[0118] La composición farmacéutica se puede formular como un líquido, loción, crema, espray, gel o pomada.

[0119] La composición farmacéutica puede ser para administración a un paciente animal. El paciente animal puede ser un paciente mamífero. El paciente mamífero puede ser un humano.

[0120] El polipéptido que tiene actividad de DNasa se puede obtener de *Aspergillus*, por ejemplo, de *Aspergillus oryzae*. En una forma de realización de la invención, el polipéptido que tiene actividad de DNasa es el polipéptido reivindicado.

[0121] Un aspecto de la presente invención se refiere a polipéptidos aislados que tienen una identidad de secuencia con el polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 2 de al menos el 60 %, por ejemplo, al menos el 65 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, o el 100 %, que tienen actividad de DNasa. En un aspecto, los polipéptidos difieren en hasta 10 aminoácidos, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10, del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 2.

[0122] En una forma de realización, la presente invención se refiere a polipéptidos aislados que tienen una identidad de secuencia con el polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 9 de al menos el 60 %, por ejemplo, al menos el 65 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, o el 100 %, que tienen actividad de DNasa. En un aspecto, los polipéptidos difieren en hasta 10 aminoácidos, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10, del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 9.

[0123] En una forma de realización, la presente invención se refiere a polipéptidos aislados que tienen una identidad de secuencia con la SEQ ID N.º: 8 de al menos el 60 %, por ejemplo, al menos el 65 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, o el 100 %, que tienen actividad de DNasa. En un aspecto, los polipéptidos difieren en hasta 10 aminoácidos, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10, del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 8.

[0124] En una forma de realización, la presente invención se refiere a polipéptidos que tienen una identidad de secuencia con el polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 2 de al menos el 60 % que tienen actividad de DNasa y el polipéptido se usa para prevenir, reducir o eliminar una biopelícula de un artículo.

[0125] En una forma de realización, la presente invención se refiere a polipéptidos que tienen una identidad de secuencia con el polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 9 de al menos el 60 % que tienen actividad de DNasa y el polipéptido se usa para prevenir, reducir o eliminar una biopelícula de un artículo.

[0126] En una forma de realización, la presente invención se refiere a polipéptidos que tienen una identidad de secuencia con el polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 2 de al menos el 65 % que tienen actividad de DNasa y el polipéptido se usa para prevenir, reducir o eliminar una biopelícula de un artículo.

[0127] En una forma de realización, la presente invención se refiere a polipéptidos que tienen una identidad de secuencia con el polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 9 de al menos el 65 % que tienen actividad de DNasa y el polipéptido se usa para prevenir, reducir o eliminar una biopelícula de un artículo.

[0128] En una forma de realización, la presente invención se refiere a polipéptidos que tienen una identidad de secuencia con el polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 2 de al menos el 70 % que tienen actividad de DNasa y el polipéptido se usa para prevenir, reducir o eliminar una biopelícula de un artículo.

[0129] En una forma de realización, la presente invención se refiere a polipéptidos que tienen una identidad de secuencia con el polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 9 de al menos el 70 % que tienen actividad de DNasa y el polipéptido se usa para prevenir, reducir o eliminar una biopelícula de un artículo.

[0130] En una forma de realización, la presente invención se refiere a polipéptidos que tienen una identidad de secuencia con el polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 2 de al menos el 75 % que tienen actividad de DNasa y el polipéptido se usa para prevenir, reducir o eliminar una biopelícula de un artículo.

[0131] En una forma de realización, la presente invención se refiere a polipéptidos que tienen una identidad de secuencia con el polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 9 de al menos el 75 % que tienen actividad de DNasa y el polipéptido se usa para prevenir, reducir o eliminar una biopelícula de un artículo.

[0132] En una forma de realización, la presente invención se refiere a polipéptidos que tienen una identidad de secuencia con el polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 2 de al menos el 80 % que tienen actividad de DNasa y el polipéptido se usa para prevenir, reducir o eliminar una biopelícula de un artículo.

[0133] En una forma de realización, la presente invención se refiere a polipéptidos que tienen una identidad de secuencia con el polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 9 de al menos el 80 % que tienen actividad de DNasa y el polipéptido se usa para prevenir, reducir o eliminar una biopelícula de un artículo.

[0134] En una forma de realización, la presente invención se refiere a polipéptidos que tienen una identidad de secuencia con el polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 2 de al menos el 85 % que tienen actividad de DNasa y el polipéptido se usa para prevenir, reducir o eliminar una biopelícula de un artículo.

[0135] En una forma de realización, la presente invención se refiere a polipéptidos que tienen una identidad de secuencia con el polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 9 de al menos el 85 % que tienen actividad de DNasa y el polipéptido se usa para prevenir, reducir o eliminar una biopelícula de un artículo.

[0136] En una forma de realización, la presente invención se refiere a polipéptidos que tienen una identidad de secuencia con el polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 2 de al menos el 90 % que tienen actividad de DNasa y el polipéptido se usa para prevenir, reducir o eliminar una biopelícula de un artículo.

[0137] En una forma de realización, la presente invención se refiere a polipéptidos que tienen una identidad de secuencia con el polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 9 de al menos el 90 % que tienen actividad de DNasa y el polipéptido se usa para prevenir, reducir o eliminar una biopelícula de un artículo.

[0138] En una forma de realización, la presente invención se refiere a polipéptidos que tienen una identidad de secuencia con el polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 2 de al menos el 91 % que tienen actividad de DNasa y el polipéptido se usa para prevenir, reducir o eliminar una biopelícula de un artículo.

[0139] En una forma de realización, la presente invención se refiere a polipéptidos que tienen una identidad de secuencia con el polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 9 de al menos el 91 % que tienen actividad de DNasa y el polipéptido se usa para prevenir, reducir o eliminar una biopelícula de un artículo.

[0140] En una forma de realización, la presente invención se refiere a polipéptidos que tienen una identidad de secuencia con el polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 2 de al menos el 92 % que tienen actividad de DNasa y el polipéptido se usa para prevenir, reducir o eliminar una biopelícula de un artículo.

[0141] En una forma de realización, la presente invención se refiere a polipéptidos que tienen una identidad de secuencia con el polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 9 de al menos el 92 % que tienen actividad de DNasa y el polipéptido se usa para prevenir, reducir o eliminar una biopelícula de un artículo.

[0142] En una forma de realización, la presente invención se refiere a polipéptidos que tienen una identidad de secuencia con el polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 2 de al menos el 93 % que tienen actividad de DNasa y el polipéptido se usa para prevenir, reducir o eliminar una biopelícula de un artículo.

[0143] En una forma de realización, la presente invención se refiere a polipéptidos que tienen una identidad de secuencia con el polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 9 de al menos el 93 % que tienen actividad de DNasa y el polipéptido se usa para prevenir, reducir o eliminar una biopelícula de un artículo.

[0144] En una forma de realización, la presente invención se refiere a polipéptidos que tienen una identidad de secuencia con el polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 2 de al menos el 94 % que tienen actividad de DNasa y el polipéptido se usa para prevenir, reducir o eliminar una biopelícula de un artículo.

[0145] En una forma de realización, la presente invención se refiere a polipéptidos que tienen una identidad de secuencia con el polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 9 de al menos el 94 % que tienen actividad de DNasa y el polipéptido se usa para prevenir, reducir o eliminar una biopelícula de un artículo.

[0146] En una forma de realización, la presente invención se refiere a polipéptidos que tienen una identidad de secuencia con el polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 2 de al menos el 95 % que tienen actividad de DNasa y el polipéptido se usa para prevenir, reducir o eliminar una biopelícula de un artículo.

[0147] En una forma de realización, la presente invención se refiere a polipéptidos que tienen una identidad de secuencia con el polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 9 de al menos el 95 % que tienen actividad de DNasa y el polipéptido se usa para prevenir, reducir o eliminar una biopelícula de un artículo.

[0148] En una forma de realización, la presente invención se refiere a polipéptidos que tienen una identidad de secuencia con el polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 2 de al menos el 96 % que tienen actividad de DNasa y el polipéptido se usa para prevenir, reducir o eliminar una biopelícula de un artículo.

[0149] En una forma de realización, la presente invención se refiere a polipéptidos que tienen una identidad de secuencia con el polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 9 de al menos el 96 % que tienen actividad de DNasa y el polipéptido se usa para prevenir, reducir o eliminar una biopelícula de un artículo.

[0150] En una forma de realización, la presente invención se refiere a polipéptidos que tienen una identidad de secuencia con el polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 2 de al menos el 97 % que tienen actividad de DNasa y el polipéptido se usa para prevenir, reducir o eliminar una biopelícula de un artículo.

[0151] En una forma de realización, la presente invención se refiere a polipéptidos que tienen una identidad de secuencia con el polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 9 de al menos el 97 % que tienen actividad de DNasa y el polipéptido se usa para prevenir, reducir o eliminar una biopelícula de un artículo.

[0152] En una forma de realización, la presente invención se refiere a polipéptidos que tienen una identidad de secuencia con el polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 2 de al menos el 98 % que tienen actividad de DNasa y el polipéptido se usa para prevenir, reducir o eliminar una biopelícula de un artículo.

[0153] En una forma de realización, la presente invención se refiere a polipéptidos que tienen una identidad de secuencia con el polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 9 de al menos el 98 % que tienen actividad de DNasa y el polipéptido se usa para prevenir, reducir o eliminar una biopelícula de un artículo.

[0154] En una forma de realización, la presente invención se refiere a polipéptidos que tienen una identidad de secuencia con el polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 2 de al menos el 99 % que tienen actividad de DNasa y el polipéptido se usa para prevenir, reducir o eliminar una biopelícula de un artículo.

[0155] En una forma de realización, la presente invención se refiere a polipéptidos que tienen una identidad de secuencia con el polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 9 de al menos el 99 % que tienen actividad de DNasa y el polipéptido se usa para prevenir, reducir o eliminar una biopelícula de un artículo.

[0156] En una forma de realización, la presente invención se refiere a polipéptidos que tienen una identidad de secuencia con el polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 2 del 100 % que tienen actividad de DNasa y el polipéptido se usa para prevenir, reducir o eliminar una biopelícula de un artículo.

[0157] En una forma de realización, la presente invención se refiere a polipéptidos que tienen una identidad de secuencia con el polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 9 del 100 % que tienen actividad de DNasa y el polipéptido se usa para prevenir, reducir o eliminar una biopelícula de un artículo.

[0158] En una forma de realización, el polipéptido se ha aislado. Un polipéptido de la presente invención preferiblemente comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º: 2 o una variante alélica de la misma; o es un fragmento de la misma que tiene actividad de DNasa. En otro aspecto, el polipéptido comprende o consiste en el polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 2. En otro aspecto, el polipéptido comprende o consiste en los aminoácidos 1 a 206 de la SEQ ID N.º: 2.

[0159] En una forma de realización, el polipéptido se ha aislado. Un polipéptido de la presente invención preferiblemente comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º: 9 o una variante alélica de la misma; o es un fragmento de la misma que tiene actividad de DNasa. En otro aspecto, el polipéptido comprende o consiste en el polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 9. En otro aspecto, el polipéptido comprende o consiste en los aminoácidos 1 a 204 de la SEQ ID N.º: 9. Un aspecto de la presente invención se refiere a una composición que comprende o que consiste esencialmente en un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º: 8 y un polipéptido de la presente invención que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º: 9.

[0160] En otra forma de realización, la presente invención se refiere a un polipéptido aislado que tiene actividad de DNasa codificado por un polinucleótido que hibrida bajo condiciones de baja astringencia con (i) la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 1, (ii) la secuencia de ADNc del mismo, o (iii) el complemento en toda su longitud de (i) o (ii) (Sambrook *et al*., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2ª edición, Cold Spring Harbor, Nueva York). En una forma de realización, el polipéptido se ha aislado.

[0161] En otra forma de realización, la presente invención se refiere a un polipéptido aislado que tiene actividad de DNasa codificado por un polinucleótido que hibrida bajo condiciones de media-alta astringencia con (i) la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 1, (ii) la secuencia de ADNc del mismo, o (iii) el complemento en toda su longitud de (i) o (ii). En una forma de realización, el polipéptido se ha aislado.

[0162] En otra forma de realización, la presente invención se refiere a un polipéptido aislado que tiene actividad de DNasa codificado por un polinucleótido que hibrida bajo condiciones de media astringencia con (i) la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 1, (ii) la secuencia de ADNc del mismo, o (iii) el complemento en toda su longitud de (i) o (ii). En una forma de realización, el polipéptido se ha aislado.

[0163] En otra forma de realización, la presente invención se refiere a un polipéptido aislado que tiene actividad de DNasa codificado por un polinucleótido que hibrida bajo condiciones de media-alta astringencia con (i) la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 1, (ii) la secuencia de ADNc del mismo, o (iii) el complemento en toda su longitud de (i) o (ii). En una forma de realización, el polipéptido se ha aislado.

[0164] En otra forma de realización, la presente invención se refiere a un polipéptido aislado que tiene actividad de DNasa codificado por un polinucleótido que hibrida bajo condiciones de alta astringencia con (i) la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 1, (ii) la secuencia de ADNc del mismo, o (iii) el complemento en toda su longitud de (i) o (ii). En una forma de realización, el polipéptido se ha aislado.

[0165] En otra forma de realización, la presente invención se refiere a un polipéptido aislado que tiene actividad de DNasa codificado por un polinucleótido que hibrida bajo condiciones de muy alta astringencia con (i) la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 1, (ii) la secuencia de ADNc del mismo, o (iii) el complemento en toda su longitud de (i) o (ii). En una forma de realización, el polipéptido se ha aislado.

[0166] El polinucleótido de la SEQ ID N.º: 1 o una subsecuencia de la misma, al igual que el polipéptido de la SEQ ID N.º: 2 o un fragmento de la misma o el polipéptido de la SEQ ID N.º: 9 o un fragmento de la misma, se puede utilizar para diseñar sondas de ácido nucleico para identificar y clonar ADN que codifica polipéptidos que tienen actividad de DNasa a partir de cepas de diferentes géneros o especies según métodos bien conocidos en la técnica. En particular, tales sondas se pueden usar para la hibridación con el ADN genómico o ADNc de una célula de interés, siguiendo procedimientos de transferencia de Southern estándar, para identificar y aislar el gen correspondiente en la misma. Tales sondas pueden ser considerablemente más cortas que la secuencia completa, pero deberían tener una longitud de al menos 15, por ejemplo, al menos 25, al menos 35, o al menos 70 nucleótidos. Preferiblemente, la sonda de ácidos nucleicos tiene una longitud de al menos 100 nucleótidos, por ejemplo, al menos 200 nucleótidos, al menos 300 nucleótidos, al menos 400 nucleótidos, al menos 500 nucleótidos, al menos 600 nucleótidos, al menos 700 nucleótidos, al menos 800 nucleótidos, o al menos 900 nucleótidos. Se pueden usar sondas tanto de ADN como de ARN. Las sondas se marcan típicamente para detectar el gen correspondiente (por ejemplo, con ^{32}P, ^{3}H, ^{35}S, biotina, o avidina). Tales sondas se incluyen en la presente invención.

[0167] Una biblioteca de ADN genómico o ADNc obtenido a partir de otras cepas de este tipo se puede cribar para ADN que hibrida con las sondas anteriormente descritas y codifica un polipéptido con actividad de DNasa. El ADN genómico o de otro tipo de otras cepas de este tipo se puede separar por electroforesis en gel de poliacrilamida o agarosa, u otras técnicas de separación. Se puede transferir el ADN de las bibliotecas o el ADN separado a nitrocelulosa u otro material portador adecuado e inmovilizarse en el mismo. Para identificar un clon o ADN que hibrida con la SEQ ID N.º: 1 o una subsecuencia de la misma, el material portador se usa en una transferencia de Southern.

[0168] Para los fines de la presente invención, la hibridación indica que el polinucleótido hibrida a una sonda de ácido nucleico marcada que corresponde con (i) la SEQ ID N.º: 1; (ii) la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 1; (iii) la secuencia de ADNc del mismo; (iv) el complemento en toda su longitud de la misma; o (v) una subsecuencia de la misma; bajo condiciones de muy baja-baja astringencia, condiciones de baja-media astringencia, condiciones de media astringencia, condiciones de media-alta astringencia, condiciones de alta astringencia hasta condiciones de muy alta astringencia. Las moléculas a las que la sonda de ácido nucleico hibrida bajo estas condiciones se pueden detectar utilizando, por ejemplo, película de rayos X o cualquier otro medio de detección conocido en la técnica.

[0169] En otra forma de realización, la presente invención se refiere a un polipéptido que tiene actividad de DNasa codificado por un polinucleótido que tiene una identidad de secuencia con la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 1 o la secuencia de ADNc del mismo de al menos el 60 %, por ejemplo, al menos el 65 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, o el 100 %. En otra forma de realización, el polipéptido se ha aislado.

[0170] En otra forma de realización, la presente invención se refiere a variantes del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 2 que comprenden una sustitución, eliminación, y/o inserción en una o más (por ejemplo, varias) posiciones. En una forma de realización, el número de sustituciones, deleciones y/o inserciones de aminoácidos introducidas en el polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 2 es de hasta 10, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10. Los cambios de los aminoácidos pueden ser poco relevantes, es decir, sustituciones o inserciones de aminoácidos conservadoras que no afectan significativamente al plegado y/o la actividad de la proteína; eliminaciones pequeñas, típicamente de 1-30 aminoácidos; extensiones pequeñas en el terminal amino o carboxilo, tales como un residuo de metionina aminoterminal; un péptido enlazador pequeño de hasta 20-25 residuos; o una extensión pequeña que facilita la purificación cambiando la carga neta u otra función, tal como un tracto de polihistidina, un epítopo antigénico o un dominio de unión.

[0171] En otra forma de realización, la presente invención se refiere a variantes del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 9 que comprenden una sustitución, eliminación, y/o inserción en una o más (por ejemplo, varias) posiciones. En una forma de realización, el número de sustituciones, deleciones y/o inserciones de aminoácidos introducidas en el polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 9 es de hasta 10, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10. Los cambios de aminoácidos pueden ser poco relevantes, es decir, sustituciones o inserciones de aminoácidos conservadoras que no afectan significativamente al plegado y/o la actividad de la proteína; deleciones pequeñas, típicamente de 1-30 aminoácidos; extensiones pequeñas del terminal amino o carboxilo, tal como un residuo de metionina aminoterminal; un péptido enlazador pequeño de hasta 20-25 residuos; o una extensión pequeña que facilita la purificación cambiando la carga neta u otra función, tal como un tracto de polihistidina, un epítopo antigénico o un dominio de unión.

[0172] Ejemplos de sustituciones conservadoras se encuentran en los grupos de aminoácidos básicos (arginina, lisina e histidina), aminoácidos acídicos (ácido glutámico y ácido aspártico), aminoácidos polares (glutamina y asparagina), aminoácidos hidrofóbicos (leucina, isoleucina y valina), aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptófano y tirosina), y aminoácidos pequeños (glicina, alanina, serina, treonina y metionina). Sustituciones de aminoácidos que generalmente no alteran la actividad específica se conocen en la técnica y se describen, por ejemplo, por H. Neurath y R.L. Hill, 1979, en The Proteins, Academic Press, Nueva York. Las sustituciones comunes son Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Tyr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu y Asp/Gly.

[0173] Alternativamente, los cambios de aminoácidos son de tal naturaleza que se alteran las propiedades fisicoquímicas de los polipéptidos. Por ejemplo, los cambios de aminoácidos pueden mejorar la termoestabilidad del polipéptido, alterar la especificidad del sustrato, cambiar el pH óptimo, y similares.

[0174] Los aminoácidos esenciales en un polipéptido se pueden identificar según procedimientos conocidos en la técnica, tales como mutagénesis dirigida al sitio o mutagénesis de escaneado de alanina (Cunningham y Wells, 1989, Science 244: 1081-1085). En la técnica anterior, se introducen mutaciones de alanina única en cada residuo en la molécula, y las moléculas mutantes resultantes se evalúan para actividad de DNasa para identificar residuos de aminoácidos que son críticos para la actividad de la molécula. Véase también, Hilton *et al*., 1996, J. Biol. Chem. 271: 4699-4708. El sitio activo de la enzima u otra interacción biológica también se puede determinar por análisis físico de la estructura, como se determina por técnicas tales como resonancia magnética nuclear, cristalografía, difracción de electrones, o marcaje por fotoafinidad, conjuntamente con mutación de aminoácidos de sitio de contacto putativo. Véase, por ejemplo, de Vos *et al*., 1992, Science 255: 306-312; Smith *et al*., 1992, J. Mol. Biol. 224: 899-904; Wlodaver *et al*., 1992, FEBS Lett. 309: 59-64. La identidad de los aminoácidos esenciales también se puede inferir a partir de un alineamiento con un polipéptido relativo.

[0175] Las sustituciones, eliminaciones y/o inserciones de aminoácidos únicas o múltiples se pueden hacer y evaluar usando métodos conocidos de mutagénesis, recombinación, y/o redistribución, seguido de un procedimiento de cribado pertinente, tal como los descritos por Reidhaar-Olson y Sauer, 1988, Science 241: 53-57; Bowie y Sauer, 1989, Proc.
Natl. Acad. Sci. EE.UU. 86: 2152-2156; WO 95/17413; o WO 95/22625. Otros métodos que se pueden usar incluyen PCR con tendencia al error, presentación en fagos (por ejemplo, Lowman *et al*., 1991, Biochemistry 30: 10832-10837; patente de EE.UU. N.º 5,223,409; WO 92/06204), y mutagénesis dirigida a región (Derbyshire *et al*., 1986, Gene 46: 145; Ner *et al*., 1988, DNA 7: 127).

[0176] Los métodos de mutagénesis/redistribución se pueden combinar con métodos de cribado de alto rendimiento automatizados para detectar actividad de polipéptidos clonados mutagenizados expresados por las células huésped (Ness *et al*., 1999, Nature Biotechnology 17: 893-896). Moléculas de ADN mutagenizado que codifican polipéptidos activos se pueden recuperar de las células huésped y secuenciarse rápidamente usando métodos estándar de la técnica. Estos métodos permiten la rápida determinación de la importancia de los residuos de aminoácidos individuales en un polipéptido.

[0177] El polipéptido puede ser un polipéptido híbrido donde una región de un polipéptido se fusiona en el N-terminal o el C-terminal de una región de otro polipéptido.

[0178] El polipéptido puede ser un polipéptido de fusión o polipéptido de fusión escindible donde otro polipéptido se fusiona en el N-terminal o el C-terminal del polipéptido de la presente invención. Un polipéptido de fusión se produce por fusión de un polinucleótido que codifica otro polipéptido a un polinucleótido de la presente invención. Las técnicas para producir polipéptidos de fusión se conocen en la técnica, e incluyen ligar las secuencias codificantes que codifican los polipéptidos de modo que estén en el marco y que la expresión del polipéptido de fusión esté bajo el control del mismo promotor (los mismos promotores) y terminador. Los polipéptidos de fusión también se pueden construir usando tecnología de inteína donde los polipéptidos de fusión se crean postraduccionalmente (Cooper *et al*., 1993, EMBO J. 12: 2575-2583; Dawson *et al*., 1994, Science 266: 776-779).

[0179] Un polipéptido de fusión puede además comprender un sitio de escisión entre los dos polipéptidos. Tras la secreción de la proteína de fusión, el sitio se escinde y se liberan los dos polipéptidos. Ejemplos de sitios de escisión incluyen, pero de forma no limitativa, los sitios descritos en Martin *et al*., 2003, J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 3: 568-576; Svetina *et al*., 2000, J. Biotechnol. 76: 245-251; Rasmussen-Wilson *et al*., 1997, Appl. Environ. Microbiol. 63: 3488-3493; Ward *et al*., 1995, Biotechnology 13: 498-503; y Contreras *et al*., 1991, Biotechnology 9: 378-381; Eaton *et al*., 1986, Biochemistry 25: 505-512; Collins-Racie *et al*., 1995, Biotechnology 13: 982-987; Carter *et al*., 1989, Proteins: Structure, Function, and Genetics 6: 240-248; y Stevens, 2003, Drug Discovery World 4: 35-48.

Polinucleótidos

[0180] La presente invención también se refiere a polinucleótidos que codifican un polipéptido, como se describe en este documento. En una forma de realización, el polinucleótido que codifica el polipéptido de la presente invención se ha aislado. En otra forma de realización, el polinucleótido que codifica un polipéptido de la presente invención comprende o consiste en la secuencia de polinucleótidos expuesta en la SEQ ID N.º: 12.

[0181] Las técnicas usadas para aislar o clonar un polinucleótido se conocen en la técnica e incluyen aislamiento de ADN genómico o ADNc, o una combinación de los mismos. La clonación de los polinucleótidos de ADN genómico se puede efectuar, por ejemplo, usando la bien conocida reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o cribado de anticuerpos de bibliotecas de expresión para detectar fragmentos de ADN clonados con características estructurales compartidas. Véase, por ejemplo, Innis *et al*., 1990, PCR: A Guide to Methods and Application, Academic Press, Nueva York. Otros procedimientos de amplificación de ácido nucleico tales como la reacción en cadena de la ligasa (LCR), la transcripción activada por ligamiento (LAT) y la amplificación basada en polinucleótido (NASBA) se pueden utilizar. Los polinucleótidos se pueden clonar a partir de una cepa de *Aspergillus*, o un organismo relacionado y, por lo tanto, por ejemplo, puede ser una variante alélica o de especie del polipéptido que codifica la región del polinucleótido.

[0182] La modificación de un polinucleótido que codifica un polipéptido de la presente invención puede ser necesaria para la sintetización de polipéptidos sustancialmente similares al polipéptido. El término "sustancialmente similares" al polipéptido se refiere a formas del polipéptido que no ocurren de manera natural. Estos polipéptidos pueden diferir de alguna manera diseñada del polipéptido aislado de su fuente nativa, por ejemplo, variantes que difieren en la actividad específica, la termoestabilidad, el pH óptimo, o similares. Las variantes se pueden construir basándose en el polinucleótido presentado como la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 1 o la secuencia de ADNc del mismo, por ejemplo, una subsecuencia de la misma, y/o mediante la introducción de sustituciones de nucleótidos que no suponen un cambio en la secuencia de aminoácidos del polipéptido, pero que corresponden al uso del codón del organismo huésped destinado a la producción de la enzima, o mediante la introducción de sustituciones de nucleótidos que pueden dar lugar a una secuencia de aminoácidos diferente. Para una descripción general de la sustitución de nucleótidos, véase, por ejemplo, Ford *et al*., 1991, Protein Expression and Purification 2: 95-107. Así, en una forma de realización, el polinucleótido comprende o consiste en la secuencia de polinucleótidos expuesta en la SEQ ID N.º: 12, donde los codones se han modificado mediante sustituciones de nucleótidos para corresponder al uso del codón del organismo huésped destinado a la producción del polipéptido de la presente invención.

Constructos de ácido nucleico

[0183] La presente invención también se refiere a constructos de ácido nucleico que comprenden un polinucleótido de la presente invención operativamente enlazado a una o más secuencias de control que dirigen la expresión de la secuencia codificante en una célula huésped adecuada bajo condiciones compatibles con las secuencias de control.

[0184] El polinucleótido se puede manipular en una variedad de maneras para proporcionar la expresión del polipéptido. La manipulación del polinucleótido antes de su inserción en un vector puede ser deseable o necesaria dependiendo del vector de expresión. Las técnicas para modificar polinucleótidos utilizando métodos de ADN recombinante son bien conocidas en la técnica.

[0185] La secuencia de control puede ser un promotor, un polinucleótido que se reconoce por una célula huésped para la expresión de un polinucleótido que codifica un polipéptido de la presente invención. El promotor contiene secuencias de control transcripcional que median la expresión del polipéptido. El promotor puede ser cualquier polinucleótido que muestre actividad transcripcional en la célula, incluidos promotores mutantes, truncados e híbridos, y se puede obtener de genes que codifican polipéptidos extracelulares o intracelulares bien homólogos o bien heterólogos a la célula huésped.

[0186] Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de los constructos de ácido nucleico de la presente invención en una célula huésped bacteriana son los promotores obtenidos del gen de la alfa-amilasa (*amyQ*) de *Bacillus amyloliquefaciens*, el gen de la alfa-amilasa (*amyL*) de *Bacillus licheniformis*, el gen de la penicilinasa (*penP*) de *Bacillus licheniformis*, el gen de amilasa maltogénica (*amyM*) de *Bacillus*

stearothermophilus, el gen de levansucrasa (*sacB*) de *Bacillus subtilis*, los genes *xylA* y *xylB* de *Bacillus subtilis*, el gen *cryIIIA* de *Bacillus thuringiensis* (Agaisse y Lereclus, 1994, Molecular Microbiology 13: 97-107), operón *lac* de *E. coli*, promotor *trc* de *E. coli* (Egon *et al*., 1988, Gene 69: 301-315), el gen de la agarasa (*dagA*) de *Streptomyces coelicolor*, y el gen de la beta-lactamasa procariótica (Villa-Kamaroff *et al*., 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 75: 3727-3731), al igual que el promotor tac (DeBoer *et al*., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 80: 21-25). Otros promotores se describen en "Useful proteins from recombinant bacteria" en Gilbert *et al*., 1980, Scientific American 242: 74-94; y en Sambrook *et al*., 1989, *supra*. Ejemplos de promotores en serie se describen en WO 99/43835.

[0187] Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de los constructos de ácido nucleico de la presente invención en una célula huésped fúngica filamentosa son promotores obtenidos de los genes para acetamidasa de *Aspergillus nidulans*, alfa-amilasa neutra de *Aspergillus niger*, alfa-amilasa estable en ácido de *Aspergillus niger*, glucoamliasa (*glaA*) de *Aspergillus niger* o *Aspergillus awamori*, TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, proteasa alcalina de *Aspergillus oryzae*, triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus oryzae*, proteasa similar a la tripsina de *Fusarium oxysporum* (WO 96/00787), amiloglucosidasa de *Fusarium venenatum* (WO 00/56900), Daria de *Fusarium venenatum* (WO 00/56900), Quinn de *Fusarium venenatum* (WO 00/56900), lipasa de *Rhizomucor miehei*, proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, beta-glucosidasa de *Trichoderma reesei*, celobiohidrolasa I de *Trichoderma reesei*, celobiohidrolasa II de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa I de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa II de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa III de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa V de *Trichoderma reesei*, xilanasa I de *Trichoderma reesei*, xilanasa II de *Trichoderma reesei*, xilanasa III de *Trichoderma reesei*, beta-xilosidasa de *Trichoderma reesei*, y factor de alargamiento de la traducción de *Trichoderma reesei*, al igual que el promotor NA2-tpi (un promotor modificado de un gen de alfa-amilasa neutra de *Aspergillus* donde el líder no traducido se ha sustituido por un líder no traducido de un gen de triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus*; ejemplos no limitativos incluyen promotores modificados de un gen de alfa-amilasa neutra de *Aspergillus niger* donde el líder no traducido se ha sustituido por un líder no traducido de un gen de triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus nidulans* o *Aspergillus oryzae*); y promotores mutantes, truncados e híbridos de los mismos. Otros promotores se describen en la patente de EE.UU. N.º 6,011,147.

[0188] En un huésped de levadura, se obtienen promotores útiles de los genes para enolasa (ENO-1) de *Saccharomyces cerevisiae*, galactocinasa (GAL1) de *Saccharomyces cerevisiae*, alcohol deshidrogenasa/gliceraldehído-3-fosfato de deshidrogenasa (ADH1, ADH2/GAP) *de Saccharomyces cerevisiae*, triosa fosfato isomerasa (TPI) de *Saccharomyces cerevisiae*, metalotioneína (CUP1) de *Saccharomyces cerevisiae*, y 3-fosfoglicerato quinasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Otros promotores útiles para células huésped de levadura se describen en Romanos *et al*., 1992, Yeast 8: 423-488.

[0189] La secuencia de control también puede ser un terminador de transcripción, que se reconoce por una célula huésped para terminar la transcripción. El terminador está operativamente enlazado al terminal 3' del polinucleótido que codifica el polipéptido. Cualquier terminador que sea funcional en la célula huésped se puede utilizar en la presente invención.

[0190] Los terminadores preferidos para las células huésped bacterianas se obtienen de los genes para proteasa alcalina (*aprH*) de *Bacillus clausii*, alfa-amilasa (*amyL*) de *Bacillus licheniformis*, y ARN ribosómico (*rrnB*) de *Escherichia coli*.

[0191] Los terminadores preferidos para las células huésped fúngicas filamentosas se obtienen de los genes para acetamidasa de *Aspergillus nidulans*, antranilato sintasa de *Aspergillus nidulans*, glucoamilasa de *Aspergillus niger*, alfa-glucosidasa de *Aspergillus niger*, TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, proteasa similar a la tripsina de *Fusarium oxysporum*, beta-glucosidasa de *Trichoderma reesei*, celobiohidrolasa I de *Trichoderma reesei*, celobiohidrolasa II de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa I de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa II de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa III de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa V de *Trichoderma reesei*, xilanasa I de *Trichoderma reesei*, xilanasa II de *Trichoderma reesei*, xilanasa III de *Trichoderma reesei*, beta-xilosidasa de *Trichoderma reesei*, y factor de alargamiento de la traducción de *Trichoderma reesei*.

[0192] Los terminadores preferidos para las células huésped de levadura se obtienen de los genes para enolasa de *Saccharomyces cerevisiae*, citocromo C de *Saccharomyces cerevisiae* (CYC1), y gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Otros terminadores útiles para las células huésped de levadura se describen en Romanos *et al*., 1992, *supra*.

[0193] La secuencia de control también puede ser una región estabilizadora de ARNm aguas abajo de un promotor y aguas arriba de la secuencia codificante de un gen que aumenta la expresión del gen.

[0194] Ejemplos de regiones estabilizadoras de ARNm adecuadas se obtienen a partir de un gen *cryIIIA* de *Bacillus thuringiensis* (WO 94/25612) y un gen *SP82* de *Bacillus subtilis* (Hue *et al*., 1995, Journal of Bacteriology 177: 3465-3471).

[0195] La secuencia de control también puede ser un líder, una región no traducida de un ARNm que es importante para la traducción por la célula huésped. El líder está operativamente enlazado al terminal 5' del polinucleótido que codifica el polipéptido. Cualquier líder que sea funcional en la célula huésped se puede utilizar.

[0196] Los líderes preferidos para las células huésped fúngicas filamentosas se obtienen de los genes para TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae* y triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus nidulans*.

[0197] Los líderes adecuados para las células huésped de levadura se obtienen de los genes para enolasa (ENO-1) de *Saccharomyces cerevisiae*, 3-fosfoglicerato quinasa de *Saccharomyces cerevisiae*, factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae*, y alcohol deshidrogenasa/gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (ADH2/GAP) de *Saccharomyces cerevisiae*.

[0198] La secuencia de control también puede ser una secuencia de poliadenilación, una secuencia operativamente enlazada al terminal 3' del polinucleótido y, cuando se transcribe, se reconoce por la célula huésped como una señal para añadir residuos de poliadenosina al ARNm transcrito. Se puede utilizar cualquier secuencia de poliadenilación que sea funcional en la célula huésped.

[0199] Las secuencias de poliadenilación preferidas para las células huésped fúngicas filamentosas se obtienen de los genes para antranilato sintasa de *Aspergillus nidulans*, glucoamilasa de *Aspergillus niger*, alfa-glucosidasa de *Aspergillus niger*, TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, y proteasa similar a la tripsina de *Fusarium oxysporum*.

[0200] Las secuencias de poliadenilación útiles para las células huésped de levadura se describen en Guo y Sherman, 1995, Mol. Cellular Biol. 15: 5983-5990.

[0201] La secuencia de control también puede ser una región codificante del péptido señal que codifica un péptido señal enlazado al N-terminal de un polipéptido y dirige el polipéptido a la vía secretora de la célula. El extremo 5' de la secuencia codificante del polinucleótido puede contener intrínsecamente una secuencia codificante del péptido señal naturalmente enlazada en el marco de lectura de la traducción con el segmento de la secuencia codificante que codifica el polipéptido. Alternativamente, el extremo 5' de la secuencia codificante puede contener una secuencia codificante del péptido señal que es foránea a la secuencia codificante. Una secuencia codificante del péptido señal foránea puede requerirse donde la secuencia codificante no contenga naturalmente una secuencia codificante del péptido señal. Alternativamente, una secuencia codificante del péptido señal foránea puede reemplazar simplemente la secuencia codificante del péptido señal natural para mejorar la secreción del polipéptido. Sin embargo, se puede utilizar cualquier secuencia codificante del péptido señal que dirija el polipéptido expresado a la vía secretora de una célula huésped.

[0202] Las secuencias codificantes del péptido señal eficaces para las células huésped bacterianas son las secuencias codificantes del péptido señal obtenidas de los genes para amilasa maltogénica de *Bacillus* NCIB 11837, subtilisina de *Bacillus licheniformis*, beta-lactamasa de *Bacillus licheniformis*, alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus*, proteasas neutras de *Bacillus stearothermophilus* (*nprT, nprS, nprM*), y *prsA* de *Bacillus subtilis*. Otros péptidos señal se describen en Simonen y Palva, 1993, Microbiological Reviews 57: 109-137.

[0203] Las secuencias codificantes del péptido señal eficaces para las células huésped fúngicas filamentosas son las secuencias codificantes del péptido señal obtenidas de los genes para amilasa neutra de *Aspergillus niger*, glucoamilasa de *Aspergillus niger*, TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, celulasa de *Humicola insolens*, endoglucanasa V de *Humicola insolens*, lipasa de *Humicola lanuginosa*, y proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*.

[0204] Los péptidos señal útiles para las células huésped de levadura se obtienen de los genes para factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae* e invertasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Otras secuencias codificantes del péptido señal útiles se describen en Romanos *et al*., 1992, *supra*.

[0205] La secuencia de control también puede ser una secuencia codificante del propéptido que codifica un propéptido posicionado en el N-terminal de un polipéptido. El polipéptido resultante se conoce como una proenzima o propolipéptido (o un zimógeno en algunos casos). Un propolipéptido es generalmente inactivo y se puede convertir en un polipéptido activo por escisión catalítica o autocatalítica del propéptido del propolipéptido. La secuencia codificante del propéptido se puede obtener de los genes para proteasa alcalina (*aprE*) de *Bacillus subtilis*, proteasa neutra (*nprT*) de *Bacillus subtilis*, lacasa de *Myceliophthora thermophila* (WO 95/33836), proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, y factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae*.

[0206] Cuando están presentes las secuencias tanto del péptido señal como del propéptido, la secuencia de propéptido se sitúa junto al N-terminal de un polipéptido y la secuencia del péptido señal se sitúa junto al N-terminal de la secuencia del propéptido.

[0207] También se puede desear añadir secuencias reguladoras que regulen la expresión del polipéptido con respecto al crecimiento de la célula huésped. Ejemplos de secuencias reguladoras son aquellas que causan que se active o se desactive la expresión del gen en respuesta a un estímulo químico o físico, que incluyen la presencia de un compuesto regulador. Las secuencias reguladoras en sistemas procarióticos incluyen los sistemas operadores *lac, tac*, y *trp*. En la levadura, se puede utilizar el sistema ADH2 o el sistema GAL1. En los hongos filamentosos, se puede utilizar el promotor de glucoamilasa de *Aspergillus niger*, el promotor de TAKA alfa-amilasa de *Aspergillus oryzae*, y el promotor de glucoamilasa de *Aspergillus oryzae*, el promotor de celobiohidrolasa I de *Trichoderma reesei*, y el promotor de celobiohidrolasa II de *Trichoderma reesei*. Otros ejemplos de secuencias reguladoras son aquellas que permiten la amplificación génica. En sistemas eucarióticos, estas secuencias reguladoras incluyen el gen de dihidrofolato reductasa que se amplifica en presencia de metotrexato, y los genes de metalotioneína que se amplifican con metales pesados. En estos casos, el polinucleótido que codifica el polipéptido estaría operativamente enlazado a la secuencia reguladora.

Vectores de expresión

[0208] La presente invención también se refiere a vectores de expresión recombinantes que comprenden un polinucleótido de la presente invención, un promotor, y señales de parada transcripcional y traduccional. Las diversas secuencias de nucleótidos y de control se pueden unir para producir un vector de expresión recombinante que puede incluir uno o más sitios de restricción convenientes para permitir la inserción o sustitución del polinucleótido que codifica el polipéptido en tales sitios. Alternativamente, el polinucleótido se puede expresar mediante la inserción del polinucleótido o un constructo de ácido nucleico que comprende el polinucleótido en un vector apropiado para la expresión. Al crear el vector de expresión, la secuencia codificante se localiza en el vector de modo que la secuencia codificante esté operativamente enlazada con las secuencias de control apropiadas para la expresión. En una forma de realización, el vector de expresión comprende la secuencia de polinucleótidos expuesta en la SEQ ID N.º: 12 operativamente enlazada a las secuencias de control apropiadas para la expresión. En una forma de realización adicional, los codones de la secuencia de polinucleótidos se han modificado por sustituciones de nucleótidos para corresponder al uso del codón del organismo huésped destinado a la producción del polipéptido de la presente invención. El vector de expresión recombinante puede ser cualquier vector (por ejemplo, un plásmido o virus) que se puede someter convenientemente a procedimientos de ADN recombinante y puede provocar la expresión del polinucleótido. La elección del vector típicamente dependerá de la compatibilidad del vector con la célula huésped en la que se va a introducir el vector. El vector puede ser un plásmido lineal o circular cerrado.

[0209] El vector puede ser un vector de replicación autónoma, es decir, un vector que existe como una entidad extracromosómica, cuya replicación es independiente de la replicación cromosómica, por ejemplo, un plásmido, un elemento extracromosómico, un minicromosoma, o un cromosoma artificial. El vector puede contener cualquier medio para asegurar la autorreplicación. Alternativamente, el vector puede ser uno que, cuando se introduce en la célula huésped, se integra en el genoma y se replica con el cromosoma (los cromosomas) donde se ha integrado. Además, se puede utilizar un vector o plásmido único o dos o más vectores o plásmidos que juntos contienen el ADN total que se va a introducir en el genoma de la célula huésped, o un transposón.

[0210] El vector contiene preferiblemente uno o más marcadores seleccionables que permiten la fácil selección de células transformadas, transfectadas, transducidas, o similares. Un marcador seleccionable es un gen cuyo producto proporciona resistencia a virus o biocidas, resistencia a metales pesados, prototrofia a auxótrofos, y similares.

[0211] Ejemplos de marcadores seleccionables bacterianos son genes *dal* de *Bacillus licheniformis* o *Bacillus subtilis*, o marcadores que confieren resistencia antibiótica tal como resistencia a ampicilina, cloranfenicol, canamicina, neomicina, espectinomicina, o tetraciclina. Los marcadores adecuados para las células huésped de levadura incluyen, pero de forma no limitativa, ADE2, HIS3, LEU2, LYS2, MET3, TRP1, y URA3. Los marcadores seleccionables para el uso en una célula huésped fúngica filamentosa incluyen, pero de forma no limitativa, *adeA* (fosforribosilaminoimidazol-succinocarboxamida sintasa), *adeB* (fosforribosilaminoimidazol sintasa), *amdS* (acetamidasa), *argB* (ornitina carbamoiltransferasa), *bar* (fosfonitricina acetiltransferasa), *hph* (higromicina fosfotransferasa), *niaD* (nitrato reductasa), *pyrG* (orotidina-5'-fosfato-descarboxilasa), *sC* (sulfato adeniltransferasa), y *trpC* (antranilato sintasa), al igual que equivalentes de los mismos. Se prefieren para el uso en una célula de *Aspergillus* los genes *amdS* y *pyrG* de *Aspergillus nidulans* o *Aspergillus oryzae* y el gen *bar* de *Streptomyces hygroscopicus*. Se prefieren para el uso en una célula de *Trichoderma* los genes *adeA, adeB, amdS, hph*, y *pyrG*.

[0212] El marcador seleccionable puede ser un sistema de marcador seleccionable doble como se describe en WO 2010/039889. En un aspecto, el marcador seleccionable doble es un sistema de marcador seleccionable doble *hph-tk*.

[0213] El vector contiene preferiblemente un elemento(s) que permite la integración del vector en el genoma de la célula huésped o la replicación autónoma del vector en la célula independiente del genoma.

[0214] Para la integración en el genoma de la célula huésped, el vector puede depender de la secuencia del polinucleótido que codifica el polipéptido o cualquier otro elemento del vector para la integración en el genoma por recombinación homóloga o no homóloga. Alternativamente, el vector puede contener polinucleótidos adicionales para dirigir la integración por recombinación homóloga en el genoma de la célula huésped en una ubicación (unas ubicaciones) precisa(s) en el cromosoma (los cromosomas). Para aumentar la probabilidad de la integración en una ubicación precisa, los elementos integracionales deberían contener un número suficiente de ácidos nucleicos, tal como de 100 a 10 000 pares de bases, de 400 a 10 000 pares de bases, y de 800 a 10 000 pares de bases, que tienen un alto grado de identidad de secuencia con la secuencia objetivo correspondiente para mejorar la probabilidad de recombinación homóloga. Los elementos integracionales pueden ser cualquier secuencia que sea homóloga a la secuencia objetivo en el genoma de la célula huésped. Además, los elementos integracionales pueden ser polinucleótidos no codificantes o codificantes. Por otro lado, el vector se puede integrar en el genoma de la célula huésped por recombinación no homóloga.

[0215] Para la replicación autónoma, el vector puede comprender además un origen de replicación que permite al vector replicarse autónomamente en la célula huésped en cuestión. El origen de la replicación puede ser cualquier replicador de plásmido que medie en la replicación autónoma que funciona en una célula. El término "origen de la replicación" o "replicador de plásmido" significa un polinucleótido que permite que un plásmido o vector se *replique in vivo*.

[0216] Ejemplos de orígenes de replicación bacterianos son los orígenes de replicación de los plásmidos pBR322, pUC19, pACYC177, y pACYC184 que permiten la replicación en *E. coli*, y pUB110, pE194, pTA1060, y pAMβ1 que permiten la replicación en *Bacillus*.

[0217] Ejemplos de orígenes de replicación para el uso en una célula huésped de levadura son el origen de replicación de 2 micras, ARS1, ARS4, la combinación de ARS1 y CEN3, y la combinación de ARS4 y CEN6.

[0218] Ejemplos de orígenes de replicación útiles en una célula fúngica filamentosa son AMA1 y ANS1 (Gems *et al*., 1991, Gene 98: 61-67; Cullen *et al*., 1987, Nucleic Acids Res. 15: 9163-9175; WO 00/24883). El aislamiento del gen AMA1 y la construcción de plásmidos o vectores que comprenden el gen se pueden conseguir según los métodos descritos en WO 00/24883.

[0219] Más de una copia de un polinucleótido de la presente invención se pueden insertar en una célula huésped para aumentar la producción de un polipéptido. Un aumento en el número de copias del polinucleótido se puede obtener mediante la integración de al menos una copia adicional de la secuencia en el genoma de la célula huésped o incluyendo un gen marcador seleccionable amplificable con el polinucleótido donde las células que contienen copias amplificadas del gen marcador seleccionable y, por lo tanto, copias adicionales del polinucleótido, se pueden seleccionar para el cultivo de las células en presencia del agente seleccionable apropiado.

[0220] Los procedimientos usados para ligar los elementos anteriormente descritos para construir los vectores de expresión recombinantes de la presente invención son bien conocidos para un experto en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook *et al*., 1989, *supra*).

Células huésped

[0221] La presente invención también se refiere a células huésped recombinantes, que comprenden un polinucleótido de la presente invención operativamente enlazado a una o más secuencias de control que dirigen la producción de un polipéptido de la presente invención. Un constructo o vector que comprende un polinucleótido se introduce en una célula huésped de modo que el constructo o vector se mantiene como un integrante cromosómico o como un vector extracromosómico autorreplicante como se ha descrito anteriormente. El término "célula huésped" abarca cualquier progenie de una célula progenitora que no sea idéntica a la célula progenitora debido a las mutaciones que ocurren durante la replicación. La elección de una célula huésped dependerá en gran medida del gen que codifica el polipéptido y de su fuente.

[0222] La célula huésped puede ser cualquier célula útil en la producción recombinante de un polipéptido de la presente invención, por ejemplo, una procariota o una eucariota.

[0223] La célula huésped procariótica puede ser cualquier bacteria grampositiva o gramnegativa. Las bacterias grampositivas incluyen, pero de forma no limitativa, *Bacillus, Clostridium, Enterococcus, Geobacillus, Lactobacillus, Lactococcus, Oceanobacillus, Staphylococcus, Streptococcus,* y *Streptomyces*. Las bacterias gramnegativas incluyen, pero de forma no limitativa, *Campylobacter, E. coli, Flavobacterium, Fusobacterium, Helicobacter, Ilyobacter, Neisseria, Pseudomonas, Salmonella*, y *Ureaplasma*.

[0224] La célula huésped bacteriana puede ser cualquier célula de *Bacillus*, incluidas, pero de forma no limitativa, las células de *Bacillus alkalophilus, Bacillus amyloliquefaciens, Bacillus brevis, Bacillus circulans, Bacillus clausii,*

Bacillus coagulans, Bacillus firmus, Bacillus lautus, Bacillus lentus, Bacillus licheniformis, Bacillus megaterium, Bacillus pumilus, Bacillus stearothermophilus, Bacillus subtilis, y *Bacillus thuringiensis*.

[0225] La célula huésped bacteriana también puede ser cualquier célula de *Streptococcus*, incluidas, pero de forma no limitativa, células de *Streptococcus equisimilis, Streptococcus pyogenes, Streptococcus uberis*, y *Streptococcus equi subesp. Zooepidemicus*.

[0226] La célula huésped bacteriana también puede ser cualquier célula de *Streptomyces*, incluidas, pero de forma no limitativa, células de *Streptomyces achromogenes, Streptomyces avermitilis, Streptomyces coelicolor, Streptomyces griseus*, y *Streptomyces lividans*.

[0227] La introducción de ADN en una célula de *Bacillus* se puede efectuar por transformación de protoplastos (véase, por ejemplo, Chang y Cohen, 1979, Mol. Gen. Genet. 168: 111-115), transformación celular competente (véase, por ejemplo, Young y Spizizen, 1961, J. Bacteriol. 81: 823-829, o Dubnau y Davidoff-Abelson, 1971, J. Mol. Biol. 56: 209-221), electroporación (véase, por ejemplo, Shigekawa y Dower, 1988 Biotechniques 6: 742-751), o conjugación (véase, por ejemplo, Koehler y Thorne, 1987, J. Bacteriol. 169: 5271-5278). La introducción de ADN en una célula de *E. coli* se puede efectuar por transformación de protoplastos (véase, por ejemplo, Hanahan, 1983, J. Mol. Biol. 166: 557-580) o electroporación (véase, por ejemplo, Dower *et al*., 1988, Nucleic Acids Res. 16: 6127-6145). La introducción de ADN en una célula de *Streptomyces* se puede efectuar por transformación de protoplastos, electroporación (véase, por ejemplo, Gong *et al*., 2004, Folia Microbiol. (Praha) 49: 399-405), conjugación (véase, por ejemplo, Mazodier *et al*., 1989, J. Bacteriol. 171: 3583-3585), o transducción (véase, por ejemplo, Burke *et al*., 2001, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 98: 6289-6294). La introducción de ADN en una célula de *Pseudomonas* se puede efectuar por electroporación (véase, por ejemplo, Choi *et al*., 2006, J. Microbiol. Methods 64: 391-397) o conjugación (véase, por ejemplo, Pinedo y Smets, 2005, Appl. Environ. Microbiol. 71: 51-57). La introducción de ADN en una célula de *Streptococcus* se puede efectuar por competencia natural (véase, por ejemplo, Perry y Kuramitsu, 1981, Infect. Immun. 32: 1295-1297), transformación de protoplastos (véase, por ejemplo, Catt y Jollick, 1991, Microbios 68: 189-207), electroporación (véase, por ejemplo, Buckley *et al*., 1999, Appl. Environ. Microbiol. 65: 3800-3804), o conjugación (véase, por ejemplo, Clewell, 1981, Microbiol. Rev. 45: 409-436). Sin embargo, se puede usar cualquier método conocido en la técnica para la introducción de ADN en una célula huésped.

[0228] La célula huésped también puede ser una eucariota, tal como una célula de mamífero, de insecto, vegetal o fúngica.

[0229] La célula huésped puede ser una célula fúngica. "Hongo", como se utiliza en este documento, incluye los filos *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Chytridiomycota*, y *Zygomycota* al igual que los *Oomycota* y todos los hongos mitospóricos (como se definen por Hawkswort *et al*., en, Ainsworth and Bisby's Dictionary of The Fungi, 8ª edición, 1995, CAB International, University Press, Cambridge, Reino Unido).

[0230] La célula huésped fúngica puede ser una célula de levadura. "Levadura", como se utiliza en este documento, incluye levadura ascoesporógena (Endomycetales), levadura basidioesporogénea, y levadura de los hongos imperfectos (Blastomycetes). Dado que la clasificación de la levadura puede cambiar en el futuro, para los fines de esta invención, la levadura se debe definir como se describe en Biology and Activities of Yeast (Skinner, Passmore, y Davenport, editores, Soc. App. Bacteriol. Symposium Series N.º 9, 1980).

[0231] La célula huésped de levadura puede ser una célula de *Candida, Hansenula, Kluyveromyces, Pichia, Saccharomyces, Schizosaccharomyces* o *Yarrowia*, tal como una célula de *Kluyveromyces lactis*, *Saccharomyces carlsbergensis, Saccharomyces cerevisiae, Saccharomyces diastaticus, Saccharomyces douglasii, Saccharomyces kluyveri, Saccharomyces norbensis, Saccharomyces oviformis*, o *Yarrowia lipolytica*.

[0232] La célula huésped fúngica puede ser una célula fúngica filamentosa. "Hongos filamentosos" incluyen todas las formas filamentosas de la subdivisión *Eumycota* y *Oomycota* (como se define en Hawkswort *et al*., 1995, *supra*). Los hongos filamentosos se caracterizan generalmente por una pared micelial compuesta por quitina, celulosa, glucano, quitosano, manano, y otros polisacáridos complejos. El crecimiento vegetativo es por alargamiento hifal y el catabolismo del carbono es obligatoriamente aeróbico. En cambio, el crecimiento vegetativo por levaduras tales como *Saccharomyces cerevisiae* es por injerto de un talo unicelular y el catabolismo del carbono puede ser fermentativo.

[0233] La célula huésped fúngica filamentosa puede ser una célula de *Acremonium*, *Aspergillus, Aureobasidium, Bjerkandera, Ceriporiopsis, Chrysosporium, Coprinus, Coriolus, Cryptococcus, Filibasidium, Fusarium, Humicola, Magnaporthe, Mucor, Myceliophthora, Neocallimastix, Neurospora, Paecilomices, Penicillium, Phanerochaete, Phlebia, Piromices, Pleurotus, Schizofilum, Talaromyces, Thermoascus, Thielavia, Tolypocladium, Trametes*, o *Trichoderma*.

[0234] Por ejemplo, la célula huésped fúngica filamentosa puede ser una célula de *Aspergillus awamori*, *Aspergillus foetidus, Aspergillus fumigatus, Aspergillus japonicus, Aspergillus nidulans, Aspergillus niger,*

Aspergillus oryzae, Bjerkandera adusta, Ceriporiopsis aneirina, Ceriporiopsis caregiea, Ceriporiopsis gilvescens, Ceriporiopsis pannocinta, Ceriporiopsis rivulosa, Ceriporiopsis subrufa, Ceriporiopsis subvermispora, Chrysosporium inops, Chrysosporium keratinophilum, Chrysosporium lucknowense, Chrysosporium merdarium, Chrysosporium pannicola, Chrysosporium queenslandicum, Chrysosporium tropicum, Chrysosporium zonatum, Coprinus cinereus, Coriolus hirsutus, Fusarium bactridioides, Fusarium cerealis, Fusarium crookwellense, Fusarium culmorum, Fusarium graminearum, Fusarium graminum, Fusarium heterosporum, Fusarium negundi, Fusarium oxysporum, Fusarium reticulatum, Fusarium roseum, Fusarium sambucinum, Fusarium sarcochroum, Fusarium sporotrichioides, Fusarium sulphureum, Fusarium torulosum, Fusarium trichothecioides, Fusarium venenatum, Humicola insolens, Humicola lanuginosa, Mucor miehei, Myceliophthora thermophila, Neurospora crassa, Penicillium purpurogenum, Phanerochaete chrysosporium, Phlebia radiata, Pleurotus eryngii, Thielavia terrestris, Trametes villosa, Trametes versicolor, Trichoderma harzianum, Trichoderma koningii, Trichoderma longibrachiatum, Trichoderma reesei, o *Trichoderma viride.*

[0235] Las células fúngicas se pueden transformar por un proceso que implica la formación de protoplastos, la transformación de los protoplastos, y la regeneración de la pared celular de una manera conocida *per se*. Los procedimientos adecuados para la transformación de células huésped de *Aspergillus* y *Trichoderma* se describen en EP 238023, Yelton *et al*., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 81: 1470-1474, y Christensen *et al*., 1988, Bio/Technology 6: 1419-1422. Los métodos adecuados para la transformación de especies de *Fusarium* se describen en Malardier *et al*., 1989, Gene 78: 147-156, y WO 96/00787. La levadura se puede transformar utilizando los procedimientos descritos por Becker y Guarente, en Abelson, J.N. y Simon, M.I., editores, Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Methods in Enzymology, volumen 194, págs. 182-187, Academic Press, Inc., Nueva York; Ito *et al*., 1983, J. Bacteriol. 153: 163; e Hinnen *et al*., 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 75: 1920.

Métodos de producción

[0236] La presente invención también se refiere a métodos de producción de un polipéptido de la presente invención, que comprenden (a) el cultivo de una célula, que en su forma de tipo salvaje produce el polipéptido, bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido; y opcionalmente, (b) la recuperación del polipéptido. En un aspecto, la célula es una célula de *Aspergillus*. En otro aspecto, la célula es una célula de *Aspergillus oryzae*.

[0237] La presente invención también se refiere a métodos de producción de un polipéptido de la presente invención, que comprenden (a) el cultivo de una célula huésped recombinante de la presente invención bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido; y opcionalmente, (b) la recuperación del polipéptido.

[0238] Las células huésped se cultivan en un medio nutritivo adecuado para la producción del polipéptido utilizando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, las células se pueden cultivar por cultivo en matraz de agitación, o fermentación a pequeña escala o a gran escala (incluidas, fermentaciones continuas, en lotes, en lotes alimentados, o en estado sólido) en el laboratorio o en fermentadores industriales en un medio adecuado y bajo condiciones que permiten que se exprese y se aísle el polipéptido. El cultivo tiene lugar en un medio nutritivo adecuado que comprende fuentes de carbono y nitrógeno y sales inorgánicas, usando procedimientos conocidos en la técnica. Medios adecuados están disponibles de proveedores comerciales o se pueden preparar según composiciones publicadas (por ejemplo, en los catálogos de la American Type Culture Collection). Si el polipéptido se segrega en el medio nutritivo, el polipéptido se puede recuperar directamente del medio. Si el polipéptido no se segrega, se puede recuperar a partir de lisados celulares.

[0239] El polipéptido se pueden detectar utilizando métodos conocidos en la técnica que son específicos para los polipéptidos. Estos métodos de detección incluyen, pero de forma no limitativa, el uso de anticuerpos específicos, la formación de un producto enzimático, o la desaparición de un sustrato enzimático. Por ejemplo, se puede utilizar un ensayo enzimático para determinar la actividad del polipéptido.

[0240] El polipéptido se puede recuperar utilizando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, el polipéptido se puede recuperar del medio nutritivo por procedimientos convencionales que incluyen, pero de forma no limitativa, recolección, centrifugación, filtración, extracción, secado por pulverización, evaporación o precipitación. En un aspecto, se recupera un caldo de fermentación que comprende el polipéptido.

[0241] El polipéptido se puede purificar mediante una variedad de procedimientos conocidos en la técnica que incluyen, pero de forma no limitativa, cromatografía (por ejemplo, de intercambio iónico, de afinidad, hidrofóbica, de cromatoenfoque, y de exclusión de tamaño), procedimientos electroforéticos (por ejemplo, enfoque isoeléctrico preparativo), solubilidad diferencial (por ejemplo, precipitación de sulfato amónico), SDS-PAGE, o extracción (véase, por ejemplo, Protein Purification, Janson y Ryden, editores, VCH Publishers, Nueva York, 1989) para obtener polipéptidos sustancialmente puros.

[0242] En un aspecto alternativo, no se recupera el polipéptido, sino que se usa una célula huésped de la presente invención que expresa el polipéptido como una fuente del polipéptido.

[0243] En una forma de realización, la invención comprende además producir el polipéptido cultivando la célula huésped recombinante que comprende además un polinucleótido que codifica un segundo polipéptido de interés; preferiblemente una enzima de interés; más preferiblemente una enzima segregada de interés; aún más preferiblemente una hidrolasa, isomerasa, ligasa, liasa, oxidorreductasa, o una transferasa; y de la forma más preferible la enzima segregada es una alfa-galactosidasa, alfa-glucosidasa, aminopeptidasa, amilasa, asparaginasa, beta-galactosidasa, beta-glucosidasa, beta-xilosidasa, carbohidrasa, carboxipeptidasa, catalasa, celobiohidrolasa, celulasa, quitinasa, cutinasa, ciclodextrina glicosiltransferasa, desoxirribonucleasa, endoglucanasa, esterasa, proteína verde fluorescente, glucano-transferasa, glucoamilasa, invertasa, lacasa, lipasa, manosidasa, mutanasa, oxidasa, enzima pectinolítica, peroxidasa, fitasa, polifenoloxidasa, enzima proteolítica, ribonucleasa, transglutaminasa, o una xilanasa.

[0244] En una forma de realización, el segundo polipéptido de interés es heterólogo u homólogo a la célula huésped.

[0245] En una forma de realización, la célula huésped recombinante es una célula huésped fúngica; preferiblemente una célula huésped fúngica filamentosa; más preferiblemente una célula de *Acremonium, Aspergillus, Aureobasidium, Bjerkandera, Ceriporiopsis, Chrysosporium, Coprinus, Coriolus, Cryptococcus, Filibasidium, Fusarium, Humicola, Magnaporthe, Mucor, Myceliophthora, Neocallimastix, Neurospora, Paecilomices, Penicillium, Phanerochaete, Phlebia, Piromices, Pleurotus, Schizofilum, Talaromyces, Thermoascus, Thielavia, Tolipocladium, Trametes, o Trichoderma; de la forma más preferible una célula de Aspergillus awamori, Aspergillus foetidus, Aspergillus fumigatus, Aspergillus japonicus, Aspergillus nidulans, Aspergillus niger, Aspergillus oryzae, Bjerkandera adusta, Ceriporiopsis aneirina, Ceriporiopsis caregiea, Ceriporiopsis gilvescens, Ceriporiopsis pannocinta, Ceriporiopsis rivulosa, Ceriporiopsis subrufa, Ceriporiopsis subvermispora, Chrysosporium inops, Chrysosporium keratinophilum, Chrysosporium lucknowense, Chrysosporium merdarium, Chrysosporium pannicola, Chrysosporium queenslandicum, Chrysosporium tropicum, Chrysosporium zonatum, Coprinus cinereus, Coriolus hirsutus, Fusarium bactridioides, Fusarium cerealis, Fusarium crookwellense, Fusarium culmorum, Fusarium graminearum, Fusarium graminum, Fusarium heterosporum, Fusarium negundi, Fusarium oxysporum, Fusarium reticulatum, Fusarium roseum, Fusarium sambucinum, Fusarium sarcochroum, Fusarium sporotrichioides, Fusarium sulphureum, Fusarium torulosum, Fusarium trichothecioides, Fusarium venenatum, Humicola insolens, Humicola lanuginosa, Mucor miehei, Myceliophthora thermophila, Neurospora crassa, Penicillium purpurogenum, Phanerochaete chrysosporium, Phlebia radiata, Pleurotus eryngii, Thielavia terrestris, Trametes villosa, Trametes versicolor, Trichoderma harzianum, Trichoderma koningii, Trichoderma longibrachiatum, Trichoderma reesei,* o *Trichoderma viride.*

[0246] En una forma de realización, la célula huésped recombinante es una célula huésped bacteriana; preferiblemente una célula huésped procariótica; más preferiblemente una célula huésped grampositiva; aún más preferiblemente una célula huésped de *Bacillus*, *Clostridium, Enterococcus, Geobacillus, Lactobacillus, Lactococcus, Oceanobacillus, Staphylococcus, Streptococcus*, o *Streptomyces*; y de la forma más preferible una célula huésped de *Bacillus alkalophilus, Bacillus amyloliquefaciens, Bacillus brevis, Bacillus circulans, Bacillus clausii, Bacillus coagulans, Bacillus firmus, Bacillus lautus, Bacillus lentus, Bacillus licheniformis, Bacillus megaterium, Bacillus pumilus, Bacillus stearothermophilus, Bacillus subtilis*, y *Bacillus thuringiensis*.

[0247] En una forma de realización, un método para producir el segundo polipéptido de interés comprende el cultivo de la célula huésped bajo condiciones propicias para la producción del segundo polipéptido de interés.

[0248] En una forma de realización, el método comprende además la recuperación del segundo polipéptido de interés.

Formulaciones de caldo de fermentación o composiciones celulares

[0249] La presente invención también se refiere a una formulación de caldo de fermentación o una composición celular que comprende un polipéptido de la presente invención. El producto del caldo de fermentación comprende además ingredientes adicionales usados en el proceso de fermentación, tales como, por ejemplo, células (incluidas las células huésped que contienen el gen que codifica el polipéptido de la presente invención que se usan para producir el polipéptido de interés), restos celulares, biomasa, medios de fermentación y/o productos de fermentación. En algunas formas de realización, la composición es un caldo completo de células muertas que contiene ácido(s) orgánico(s), células muertas y/o restos celulares, y medio de cultivo.

[0250] El término "caldo de fermentación" como se utiliza en este documento se refiere a una preparación producida por fermentación celular que experimenta ninguna o mínima recuperación y/o purificación. Por ejemplo, se producen caldos de fermentación cuando se cultivan cultivos microbianos hasta la saturación, se incuban bajo condiciones de carbono limitado para permitir la síntesis de proteínas (por ejemplo, la expresión de enzimas por células huésped) y la secreción en el medio de cultivo celular. El caldo de fermentación puede contener contenidos no fraccionados o fraccionados de los materiales de fermentación derivados al final de la fermentación. Típicamente, el caldo de fermentación no está fraccionado y comprende el medio de cultivo

consumido y los restos celulares presentes después de la eliminación de las células microbianas (por ejemplo, células fúngicas filamentosas), por ejemplo, por centrifugación. En algunas formas de realización, el caldo de fermentación contiene medio de cultivo celular consumido, enzimas extracelulares, y células microbianas viables y/o no viables.

[0251] En una forma de realización, la formulación del caldo de fermentación y las composiciones celulares comprenden un primer componente de ácido orgánico que comprende al menos un ácido orgánico de 1-5 carbonos y/o una sal del mismo y un segundo componente de ácido orgánico que comprende al menos un ácido orgánico de 6 o más carbonos y/o una sal del mismo. En una forma de realización específica, el primer componente de ácido orgánico es ácido acético, ácido fórmico, ácido propiónico, una sal de los mismos, o una mezcla de dos o más de los anteriormente mencionados y el segundo componente de ácido orgánico es ácido benzoico, ácido ciclohexanecarboxílico, ácido 4-metilvalérico, ácido fenilacético, una sal de los mismos, o una mezcla de dos o más de los anteriormente mencionados.

[0252] En un aspecto, la composición contiene un ácido(s) orgánico(s), y contiene opcionalmente además células muertas y/o restos celulares. En una forma de realización, las células muertas y/o los restos celulares se eliminan de un caldo completo de células muertas para proporcionar una composición que esté libre de estos componentes.

[0253] Las formulaciones de caldo de fermentación o composiciones celulares pueden comprender además un agente conservante y/o antimicrobiano (por ejemplo, bacteriostático), que incluye, pero de forma no limitativa, sorbitol, cloruro de sodio, sorbato de potasio, y otros conocidos en la técnica.

[0254] El caldo completo de células muertas o la composición puede contener los contenidos no fraccionados de los materiales de fermentación derivados al final de la fermentación. Típicamente, el caldo completo de células muertas o la composición contiene el medio de cultivo consumido y los restos celulares presentes después de que las células microbianas (por ejemplo, células fúngicas filamentosas) se hayan cultivado hasta la saturación e incubado bajo condiciones de carbono limitado para permitir la síntesis de proteínas. En algunas formas de realización, el caldo completo de células muertas o la composición contiene el medio de cultivo celular consumido, enzimas extracelulares, y células fúngicas filamentosas muertas. En algunas formas de realización, las células microbianas presentes en el caldo completo de células muertas o la composición se pueden permeabilizar y/o lisar usando métodos conocidos en la técnica.

[0255] Un caldo completo o una composición celular como se describe en este documento es típicamente un líquido, pero puede contener componentes insolubles, tales como células muertas, restos celulares, componentes de medios de cultivo, y/o enzima(s) insoluble(s). En algunas formas de realización, los componentes insolubles se pueden eliminar para proporcionar una composición líquida aclarada.

[0256] Las formulaciones de caldo completo y las composiciones celulares de la presente invención se pueden producir por un método descrito en WO 90/15861 o WO 2010/096673.

Péptido señal

[0257] La presente invención también se refiere a un polinucleótido que codifica un péptido señal que comprende o consiste en los aminoácidos -37 a -16 de la SEQ ID N.º: 2. La presente invención también se refiere a un polinucleótido que codifica un propéptido que comprende o consiste en los aminoácidos -15 a -1 de la SEQ ID N.º: 2. La presente invención también se refiere a un polinucleótido que codifica un péptido señal y un propéptido que comprende o consiste en los aminoácidos -37 a -1 de la SEQ ID N.º: 2.

[0258] Los polinucleótidos pueden comprender además un gen que codifica una proteína, que está operativamente enlazado al péptido señal y/o propéptido. La proteína es preferiblemente foránea al péptido señal y/o propéptido. En un aspecto, el polinucleótido que codifica el péptido señal son los nucleótidos 1 a 66 de la SEQ ID N.º: 1. En otro aspecto, el polinucleótido que codifica el propéptido son los nucleótidos 67 a 111 de la SEQ ID N.º: 1. En otro aspecto, el polinucleótido que codifica el péptido señal y el propéptido son los nucleótidos 1 a 111 de la SEQ ID N.º: 1.

[0259] La presente invención también se refiere a constructos de ácido nucleico, vectores de expresión y células huésped recombinantes que comprenden tales polinucleótidos.

[0260] La presente invención también se refiere a métodos de producción de una proteína, que comprenden (a) el cultivo de una célula huésped recombinante que comprende tal polinucleótido; y (b) la recuperación de la proteína.

[0261] La proteína puede ser nativa o heteróloga a una célula huésped. El término "proteína" no pretende referirse en este documento a una longitud específica del producto codificado y, por lo tanto, abarca péptidos,

oligopéptidos, y polipéptidos. El término "proteína" también abarca dos o más polipéptidos combinados para formar el producto codificado. Las proteínas también incluyen polipéptidos híbridos y polipéptidos fusionados.

[0262] Preferiblemente, la proteína es una hormona, una enzima, un receptor o una porción del mismo, un anticuerpo o una porción del mismo, o un indicador. Por ejemplo, la proteína puede ser una hidrolasa, isomerasa, ligasa, liasa, oxidorreductasa, o transferasa, por ejemplo, una alfa-galactosidasa, alfa-glucosidasa, aminopeptidasa, amilasa, beta-galactosidasa, beta-glucosidasa, beta-xilosidasa, carbohidrasa, carboxipeptidasa, catalasa, celobiohidrolasa, celulasa, quitinasa, cutinasa, ciclodextrina glicosiltransferasa, desoxirribonucleasa, endoglucanasa, esterasa, glucoamilasa, invertasa, lacasa, lipasa, manosidasa, mutanasa, oxidasa, enzima pectinolítica, peroxidasa, fitasa, polifenoloxidasa, enzima proteolítica, ribonucleasa, transglutaminasa, o xilanasa.

[0263] El gen se puede obtener de cualquier fuente procariótica, eucariótica o de otro tipo.

Enzima de la invención - Desoxirribonucleasa (DNasa)

[0264] Un polipéptido que tiene actividad de DNasa o una desoxirribonucleasa (DNasa) es cualquier enzima que cataliza la escisión hidrolítica de enlaces fosfodiéster en la estructura del ADN, degradando así el ADN. Los dos términos polipéptido que tiene actividad de DNasa y DNasa se usan de forma intercambiable.

[0265] Según la presente invención, la DNasa se puede obtener de un hongo; en particular se prefiere una DNasa que se puede obtener de un *Aspergillus*; en particular se prefiere una DNasa que se puede obtener de *Aspergillus oryzae*.
En una forma de realización de la presente invención, el polipéptido que tiene actividad de desoxirribonucleasa no es la nucleasa S1 de *Aspergillus oryzae*.

[0266] La DNasa usada en la presente invención incluye el polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 2, mostrada como los aminoácidos 1 a 206 de la SEQ ID N.º: 2, que se obtienen de *Aspergillus oryzae*.

[0267] El polipéptido que tiene actividad de DNasa se puede obtener de *Aspergillus*, por ejemplo, de *Aspergillus oryzae*. En una forma de realización de la invención, el polipéptido que tiene actividad de DNasa es el polipéptido reivindicado.

[0268] Un aspecto de la presente invención se refiere a polipéptidos aislados que tienen una identidad de secuencia con el polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 2 de al menos el 60 %, por ejemplo, al menos el 65 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, o el 100 %, que tienen actividad de DNasa. En un aspecto, los polipéptidos difieren en hasta 10 aminoácidos, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10, del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 2.

[0269] En una forma de realización, la presente invención se refiere a polipéptidos aislados que tienen una identidad de secuencia con el polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 9 de al menos el 60 %, por ejemplo, al menos el 65 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, o el 100 %, que tienen actividad de DNasa. En un aspecto, los polipéptidos difieren en hasta 10 aminoácidos, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10, del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 9.

[0270] En una forma de realización, la presente invención se refiere a polipéptidos aislados que tienen una identidad de secuencia con la SEQ ID N.º: 8 de al menos el 60 %, por ejemplo, al menos el 65 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, o el 100 %, que tienen actividad de DNasa. En un aspecto, los polipéptidos difieren en hasta 10 aminoácidos, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10, del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 8.

[0271] Un polipéptido de la presente invención preferiblemente comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º: 2 o una variante alélica de la misma; o es un fragmento de la misma que tiene actividad de DNasa. En otro aspecto, el polipéptido comprende o consiste en el polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 2. En otro aspecto, el polipéptido comprende o consiste en los aminoácidos 1 a 206 de la SEQ ID N.º: 2.

[0272] En una forma de realización, el polipéptido se ha aislado. Un polipéptido de la presente invención preferiblemente comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º: 9 o una variante alélica de la misma; o es un fragmento de la misma que tiene actividad de DNasa. En otro aspecto, el polipéptido comprende o consiste en el polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 9. En otro aspecto, el polipéptido comprende o consiste en los aminoácidos 1 a 204 de la SEQ ID N.º: 9. Un aspecto de la presente invención se refiere a una composición que comprende o que consiste esencialmente en un polipéptido que consiste en la secuencia de

aminoácidos de la SEQ ID N.º: 8 y un polipéptido de la presente invención que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º: 9.

[0273] En otra forma de realización, la presente invención se refiere a un polipéptido aislado que tiene actividad de DNasa codificado por un polinucleótido que hibrida bajo condiciones de baja astringencia con (i) la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 1, (ii) la secuencia de ADNc del mismo, o (iii) el complemento en toda su longitud de (i) o (ii) (Sambrook *et al*., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2ª edición, Cold Spring Harbor, Nueva York). En una forma de realización, el polipéptido se ha aislado.

[0274] En otra forma de realización, la presente invención se refiere a un polipéptido aislado que tiene actividad de DNasa codificado por un polinucleótido que hibrida bajo condiciones de baja-media astringencia con (i) la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 1, (ii) la secuencia de ADNc del mismo, o (iii) el complemento en toda su longitud de (i) o (ii). En una forma de realización, el polipéptido se ha aislado.

[0275] En otra forma de realización, la presente invención se refiere a un polipéptido aislado que tiene actividad de DNasa codificado por un polinucleótido que hibrida bajo condiciones de media astringencia con (i) la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 1, (ii) la secuencia de ADNc del mismo, o (iii) el complemento en toda su longitud de (i) o (ii). En una forma de realización, el polipéptido se ha aislado.

[0276] En otra forma de realización, la presente invención se refiere a un polipéptido aislado que tiene actividad de DNasa codificado por un polinucleótido que hibrida bajo condiciones de media-alta astringencia con (i) la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 1, (ii) la secuencia de ADNc del mismo, o (iii) el complemento en toda su longitud de (i) o (ii). En una forma de realización, el polipéptido se ha aislado.

[0277] En otra forma de realización, la presente invención se refiere a un polipéptido aislado que tiene actividad de DNasa codificado por un polinucleótido que hibrida bajo condiciones de alta astringencia con (i) la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 1, (ii) la secuencia de ADNc del mismo, o (iii) el complemento en toda su longitud de (i) o (ii). En una forma de realización, el polipéptido se ha aislado.

[0278] En otra forma de realización, la presente invención se refiere a un polipéptido aislado que tiene actividad de DNasa codificado por un polinucleótido que hibrida bajo condiciones de muy alta astringencia con (i) la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 1, (ii) la secuencia de ADNc del mismo, o (iii) el complemento en toda su longitud de (i) o (ii). En una forma de realización, el polipéptido se ha aislado.

[0279] El polinucleótido de la SEQ ID N.º: 1 o una subsecuencia de la misma, al igual que el polipéptido de la SEQ ID N.º: 2 o un fragmento de la misma o el polipéptido de la SEQ ID N.º: 9 o un fragmento de la misma, se pueden utilizar para diseñar sondas de ácido nucleico para identificar y clonar polipéptidos que codifican ADN con actividad de DNasa de cepas de diferentes géneros o especies según métodos bien conocidos en la técnica. En particular, tales sondas se pueden usar para la hibridación con el ADN genómico o ADNc de una célula de interés, siguiendo procedimientos de transferencia de Southern estándar, para identificar y aislar el gen correspondiente en el mismo. Tales sondas pueden ser considerablemente más cortas que la secuencia completa, pero deberían tener una longitud de al menos 15, por ejemplo, al menos 25, al menos 35, o al menos 70 nucleótidos. Preferiblemente, la sonda de ácido nucleico tiene una longitud de al menos 100 nucleótidos, por ejemplo, al menos 200 nucleótidos, al menos 300 nucleótidos, al menos 400 nucleótidos, al menos 500 nucleótidos, al menos 600 nucleótidos, al menos 700 nucleótidos, al menos 800 nucleótidos, o al menos 900 nucleótidos. Se pueden usar sondas tanto de ADN como de ARN. Las sondas se marcan típicamente para detectar el gen correspondiente (por ejemplo, con ^{32}P, ^{3}H, ^{35}S, biotina, o avidina). Tales sondas se incluyen en la presente invención.

[0280] Una biblioteca de ADN genómico o ADNc obtenido a partir de tales otras cepas se puede cribar para ADN que hibrida con las sondas anteriormente descritas y codifica un polipéptido que tiene actividad de DNasa. El ADN genómico o de otro tipo de tales otras cepas se puede separar por electroforesis en gel de poliacrilamida o agarosa, u otras técnicas de separación. El ADN de las bibliotecas o el ADN separado se puede transferir e inmovilizar en nitrocelulosa u otro material portador adecuado. Para identificar un clon o ADN que hibrida con la SEQ ID N.º: 1 o una subsecuencia de la misma, el material portador se usa en una transferencia de Southern.

[0281] Para los fines de la presente invención, la hibridación indica que el polinucleótido hibrida a una sonda de ácidos nucleicos marcada que corresponde con (i) la SEQ ID N.º: 1; (ii) la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 1; (iii) la secuencia de ADNc del mismo; (iv) el complemento en toda su longitud de la misma; o (v) una subsecuencia de la misma; bajo condiciones de muy baja, baja astringencia, condiciones de media-baja astringencia, condiciones de media astringencia, condiciones de media-alta astringencia, condiciones de alta astringencia hasta condiciones de muy alta astringencia. Las moléculas a la que la sonda de ácido nucleico hibrida bajo estas condiciones se pueden detectar utilizando, por ejemplo, película de rayos x o cualquiera de los otros medios de detección conocidos en la técnica.

[0282] En otra forma de realización, la presente invención se refiere a un polipéptido que tiene actividad de DNasa codificado por un polinucleótido con una identidad de secuencia con la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 1 o la secuencia de ADNc del mismo de al menos el 60 %, por ejemplo, al menos el 65 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, o el 100 %. En otra forma de realización, el polipéptido se ha aislado.

[0283] En otra forma de realización, la presente invención se refiere a variantes del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 2 que comprende una sustitución, una eliminación, y/o una inserción en una o más (por ejemplo, varias) posiciones. En una forma de realización, el número de sustituciones de aminoácidos, eliminaciones y/o inserciones introducidas en el polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 2 es de hasta 10, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10. Los cambios de aminoácidos pueden ser de poca relevancia, es decir, sustituciones o inserciones de aminoácidos conservadoras que no afectan significativamente al plegado y/o la actividad de la proteína; eliminaciones pequeñas, típicamente de 1-30 aminoácidos; pequeñas extensiones en el terminal amino o carboxilo, tal como un residuo de metionina en el terminal amino; un péptido enlazador pequeño de hasta 20-25 residuos; o una extensión pequeña que facilita la purificación cambiando la carga neta u otra función, tal como un tracto de polihistidina, un epítopo antigénico o un dominio de unión.

[0284] En otra forma de realización, la presente invención se refiere a variantes del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 9 que comprenden una sustitución, eliminación, y/o inserción en una o más (por ejemplo, varias) posiciones. En una forma de realización, el número de sustituciones, eliminaciones y/o inserciones de aminoácidos introducidas en el polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 9 es de hasta 10, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10. Los cambios de aminoácidos pueden ser de poca relevancia, es decir, sustituciones o inserciones de aminoácidos conservadoras que no afectan significativamente al plegado y/o la actividad de la proteína; deleciones pequeñas, típicamente de 1-30 aminoácidos; pequeñas extensiones en el terminal amino y carboxilo, tal como un residuo de metionina en el terminal amino; un péptido de enlazador pequeño de hasta 20-25 residuos; o una extensión pequeña que facilita la purificación cambiando la carga neta u otra función, tal como un tracto de polihistidina, un epítopo antigénico o un dominio de unión.

[0285] La enzima de DNasa puede comprender o consistir en la secuencia de aminoácidos mostrada como los aminoácidos -37 a 206 de la SEQ ID N.º: 2 o un fragmento de la misma que tienen actividad de DNasa, tal como el polipéptido maduro. O la enzima de DNasa puede comprender o consistir en un fragmento de aminoácidos -37 a 206 de la SEQ ID N.º: 2 o los aminoácidos 1 a 206 de la SEQ ID N.º: 2, fragmento para el que uno o más aminoácidos se eliminan del terminal amino y/o carboxilo de la SEQ ID N.º: 2.

[0286] La enzima de DNasa puede comprender o consistir en la secuencia de aminoácidos mostrada como los aminoácidos 1 a 204 de la SEQ ID N.º: 9 o un fragmento de la misma que tiene actividad de DNasa, tal como el polipéptido maduro. O la enzima de DNasa puede comprender o consistir en un fragmento de los aminoácidos 1 a 204 de la SEQ ID N.º: 9 o los aminoácidos 1 a 204 de la SEQ ID N.º: 9, fragmento para el que uno o más aminoácidos se eliminan del terminal amino y/o carboxilo de la SEQ ID N.º: 9.

[0287] La presente invención también proporciona polipéptidos de DNasa que son sustancialmente homólogos a los polipéptidos anteriores, y especies homólogas (parálogos u ortólogos) de los mismos. El término "sustancialmente homólogos" se utiliza en este documento para denotar polipéptidos que son al menos el 80 %, preferiblemente al menos el 85 %, más preferiblemente al menos el 90 %, más preferiblemente al menos el 95 %, aún más preferiblemente al menos el 97 % idénticos, y de la forma más preferible al menos el 99 % o más idénticos a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º: 2 o a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º: 9, o un fragmento de la misma que tiene actividad de DNasa, o sus ortólogos o parálogos.

[0288] En otra forma de realización, la DNasa de la SEQ ID N.º: 2 comprende una sustitución, eliminación, y/o inserción en una o más (por ejemplo, varias) posiciones. En otra forma de realización, la DNasa de la SEQ ID N.º: 9 comprende una sustitución, eliminación, y/o inserción en una o más (por ejemplo, varias) posiciones. En una forma de realización, el número de sustituciones, eliminaciones y/o inserciones de aminoácidos introducidas en el polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 2 o en el polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 9 no es mayor que 10, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9. Los cambios de aminoácidos pueden ser de poca relevancia, es decir, es sustituciones o inserciones de aminoácidos conservadoras que no afectan significativamente al plegado y/o la actividad de la proteína; eliminaciones pequeñas, típicamente de 1-30 aminoácidos; pequeñas extensiones en el terminal amino o carboxilo, tal como un residuo de metionina en el terminal amino; un péptido enlazador pequeño de hasta 20-25 residuos; o una extensión pequeña que facilita la purificación por cambio de carga neta u otra función, tal como un tracto de polihistidina, un epítopo antigénico o un dominio de unión.

[0289] Ejemplos de sustituciones conservadoras se encuentran en los grupos de aminoácidos básicos (arginina, lisina e histidina), aminoácidos acídicos (ácido glutámico y ácido aspártico), aminoácidos polares (glutamina y asparagina), aminoácidos hidrofóbicos (leucina, isoleucina y valina), aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptófano y tirosina), y aminoácidos pequeños (glicina, alanina, serina, treonina y metionina). Las sustituciones

de aminoácidos que generalmente no alteran la actividad específica se conocen en la técnica y se describen, por ejemplo, en H. Neurath y R.L. Hill, 1979, en The Proteins, Academic Press, Nueva York. Sustituciones comunes son Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Tyr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, y Asp/Gly.

[0290] Alternativamente, los cambios de aminoácidos son de tal naturaleza que las propiedades fisicoquímicas de los polipéptidos se alteran. Por ejemplo, los cambios de aminoácidos pueden mejorar la termoestabilidad del polipéptido, alterar la especificidad del sustrato, cambiar el pH óptimo, y similares.

[0291] Los aminoácidos esenciales en un polipéptido se pueden identificar según procedimientos conocidos en la técnica, tales como mutagénesis dirigida al sitio o mutagénesis de escaneado de alanina (Cunningham y Wells, 1989, Science 244: 1081-1085). En la técnica anterior, se introducen mutaciones de alanina única en cada residuo en la molécula, y las moléculas mutantes resultantes se evalúan para actividad de DNasa para identificar residuos de aminoácidos que son críticos a la actividad de la molécula. Véase también, Hilton *et al*., 1996, J. Biol. Chem. 271: 4699-4708. El sitio activo de la enzima u otra interacción biológica también se puede determinar por análisis físico de la estructura, como se determina por técnicas tales como resonancia magnética nuclear, cristalografía, difracción de electrones, o marcaje por fotoafinidad, conjuntamente con mutación de aminoácidos del sitio de contacto putativo. Véase, por ejemplo, de Vos *et al*., 1992, Science 255: 306-312; Smith *et al*., 1992, J. Mol. Biol. 224: 899-904; Wlodaver *et al*., 1992, FEBS. Lett 309: 59-64. La identidad de los aminoácidos esenciales también se puede inferir a partir de un alineamiento con un polipéptido relativo.

[0292] Las sustituciones, eliminaciones y/o inserciones de aminoácidos únicas o múltiples se pueden hacer y evaluar usando métodos conocidos de mutagénesis, recombinación, y/o redistribución, seguido de un procedimiento de cribado pertinente, tal como los descritos por Reidhaar-Olson y Sauer, 1988, Science 241: 53-57; Bowie y Sauer, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 86: 2152-2156; WO 95/17413; o WO 95/22625. Otros métodos que se pueden usar incluyen PCR con tendencia al error, presentación en fagos (por ejemplo, Lowman *et al*., 1991, Biochemistry 30: 10832-10837; patente de EE.UU. N.º 5,223,409; WO 92/06204), y mutagénesis dirigida a región (Derbyshire *et al*., 1986, Gene 46: 145; Ner *et al*., 1988, DNA 7: 127).

[0293] Los métodos de mutagénesis/redistribución se pueden combinar con métodos de cribado de alto rendimiento automatizados para detectar actividad de polipéptidos clonados mutagenizados expresados por células huésped (Ness *et al*., 1999, Nature Biotechnology 17: 893-896). Moléculas de ADN mutagenizado que codifican polipéptidos activos se pueden recuperar a partir de las células huésped y secuenciarse rápidamente usando métodos estándar en la técnica. Estos métodos permiten la rápida determinación de la importancia de los residuos de aminoácidos individuales en un polipéptido.

[0294] El polipéptido puede ser un polipéptido híbrido en el que una región de un polipéptido se fusiona en el N-terminal o el C-terminal de una región de otro polipéptido.

[0295] El polipéptido puede ser un polipéptido de fusión o polipéptido de fusión escindible donde otro polipéptido se fusiona en el N-terminal o el C-terminal del polipéptido de la presente invención. Un polipéptido de fusión se produce por fusión de un polinucleótido que codifica otro polipéptido a un polinucleótido de la presente invención. Las técnicas para producir polipéptidos de fusión se conocen en la técnica, e incluyen ligar las secuencias codificantes que codifican los polipéptidos de modo que estén en el marco y que la expresión del polipéptido de fusión esté bajo el control del mismo promotor (los mismos promotores) y terminador. Los polipéptidos de fusión también se pueden construir usando tecnología de inteína donde los polipéptidos de fusión se crean postraduccionalmente (Cooper *et al*., 1993, EMBO J. 12: 2575-2583; Dawson *et al*., 1994, Science 266: 776-779).

[0296] Un polipéptido de fusión puede además comprender un sitio de escisión entre los dos polipéptidos. En la secreción de la proteína de fusión, el sitio se divide y libera los dos polipéptidos. Ejemplos de sitios de escisión incluyen, pero de forma no limitativa, los sitios descritos en Martin *et al*., 2003, J. Ind. Microbiol. Biotecnhol. 3: 568-576; Svetina *et al*., 2000, J. Biotechnol. 76: 245-251; Rasmussen-Wilson *et al*., 1997, Appl. Environ. Microbiol. 63: 3488-3493; Ward *et al*., 1995, Biotechnology 13: 498-503; y Contreras *et al*., 1991, Biotechnology 9: 378-381; Eaton *et al*., 1986, Biochemistry 25: 505-512; Collins-Racie *et al*., 1995, Biotechnology 13: 982-987; Carter *et al*., 1989, Proteins: Structure, Function, and Genetics 6: 240-248; y Stevens, 2003, Drug Discovery World 4: 35-48.

[0297] La concentración de la DNasa en la solución de lavado está típicamente en el rango de 0,00004-100 ppm de proteína enzimática, tal como en el rango de 0,00008-100, en el rango de 0,0001-100, en el rango de 0,0002-100, en el rango de 0,0004-100, en el rango de 0,0008-100, en el rango de 0,001-100 ppm de proteína enzimática, 0,01-100 ppm de proteína enzimática, preferiblemente 0,05-50 ppm de proteína enzimática, más preferiblemente 0,1-50 ppm de proteína enzimática, más preferiblemente 0,1-30 ppm de proteína enzimática, más preferiblemente 0,5-20 ppm de proteína enzimática, y de la forma más preferible 0,5-10 ppm de proteína enzimática.

[0298] La DNasa de la presente invención se puede adicionar a una composición detergente en una cantidad que corresponde con al menos 0,002 mg de proteína de DNasa, tal como al menos 0,004 mg de proteína de DNasa, al menos 0,006 mg de proteína de DNasa, al menos 0,008 mg de proteína de DNasa, al menos 0,01 mg de proteína de DNasa, al menos 0,1 mg de proteína, preferiblemente al menos 1 mg de proteína, más preferiblemente al menos 10 mg de proteína, aún más preferiblemente al menos 15 mg de proteína, de la forma más preferible al menos 20 mg de proteína, e incluso de la forma más preferible al menos 25 mg de proteína. Así, la composición detergente puede comprender al menos el 0,00008 % de proteína de DNasa, preferiblemente al menos el 0,002 %, 0,003 %, 0,004 %, 0,005 %, 0,006 %, 0,008 %, 0,01 %, 0,02 %, 0,03 %, 0,05 %, 0,1 %, 0,2 %, 0,3 %, 0,4 %, 0,6 %, 0,7 %, 0,8 %, 0,9 % o 1,0 % de proteína de DNasa.

[0299] La DNasa de la composición detergente de la invención se puede estabilizar utilizando agentes estabilizantes convencionales, por ejemplo, un poliol tal como propilenglicol o glicerol, un azúcar o alcohol de azúcar, ácido láctico, ácido bórico, o un derivado de ácido bórico, por ejemplo, un éster de borato aromático, o un derivado de ácido fenilborónico tal como ácido 4-formilfenilborónico, y la composición se puede formular como se describe en, por ejemplo, WO92/19709 y WO92/19708.

[0300] Un polipéptido de la presente invención también se puede incorporar en las formulaciones detergentes descritas en WO97/07202, que se incorpora en el presente documento por referencia.

Composiciones detergentes

[0301] En una forma de realización, la invención se dirige a composiciones detergentes que incluyen una enzima de la presente invención en combinación con uno o más componentes de composición de limpieza adicionales. En una forma de realización, la composición detergente comprende un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º: 9. También se describe que el detergente comprende un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º: 8 y un polipéptido de la presente invención que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º: 9. En una forma de realización, la composición detergente está en forma sólida. En otra forma de realización, la composición detergente está en una forma líquida. La elección de componentes adicionales se encuentra dentro de la habilidad del experto e incluye ingredientes convencionales, incluidos los componentes no limitativos ejemplares expuestos más adelante.

Composición detergente líquida

[0302] La composición detergente líquida puede comprender una microcápsula de la invención, y formar así parte de cualquier composición detergente en cualquier forma, tal como detergentes líquidos y en polvo, y pastillas de jabón y de detergente.

[0303] En una forma de realización, la invención se dirige a composiciones detergentes líquidas que comprenden una microcápsula, como se ha descrito anteriormente, en combinación con uno o más componentes de composición de limpieza adicionales.

[0304] La microcápsula, como se ha descrito anteriormente, se puede adicionar a la composición detergente líquida en una cantidad que corresponde con del 0,0001 % al 5 % (p/p) de proteína enzimática activa (AEP); preferiblemente del 0,001 % al 5 %, más preferiblemente del 0,005 % al 5 %, más preferiblemente del 0,005 % al 4 %, más preferiblemente del 0,005 % al 3 %, más preferiblemente del 0,005 % al 2 %, aún más preferiblemente del 0,01 % al 2 %, y de la forma más preferible del 0,01 % al 1 % (p/p) de proteína enzimática activa.

[0305] La composición detergente líquida tiene una forma física, que no es sólida (o gaseosa). Puede ser un líquido vertible, una pasta, un gel vertible o un gel no vertible. Puede ser o isotrópica o estructurada, preferiblemente isotrópica. Puede ser una formulación útil para el lavado en lavadoras automáticas o para el lavado a mano. También puede ser un producto de cuidado personal, tal como un champú, pasta dental, o un jabón de manos.

[0306] La composición detergente líquida puede ser acuosa, y contiene típicamente al menos el 20 % en peso y hasta el 95 % de agua, tal como hasta el 70 % de agua, hasta el 50 % de agua, hasta el 40 % de agua, hasta el 30 % de agua, o hasta el 20 % de agua. Otros tipos de líquidos, que incluyen, de forma no limitativa, alcanoles, aminas, dioles, éteres y polioles, se pueden incluir en un detergente líquido acuoso. Un detergente líquido acuoso puede contener del 0-30 % de solvente orgánico. Un detergente líquido puede incluso ser no acuoso, donde el contenido de agua es inferior al 10 %, preferiblemente inferior al 5 %.

[0307] Los ingredientes detergentes pueden separarse físicamente los unos de los otros por compartimentos en bolsas disolubles en agua. Así se puede evitar la interacción de almacenamiento negativa entre los componentes. Perfiles de disolución diferentes de cada uno de los compartimentos también pueden dar lugar a disolución retardada de los componentes seleccionados en la solución de lavado.

[0308] La composición detergente puede tomar la forma de un producto de dosis unitaria. Un producto de dosis unitaria es el envasado de una dosis individual en un contenedor no reutilizable. Su uso en detergentes para la colada está en aumento. Un producto de dosis unitaria de detergente es el envasado (por ejemplo, en una bolsa hecha de una película hidrosoluble) de la cantidad de detergente usada para un único lavado.

[0309] Las bolsas pueden ser de cualquier forma, figura y material que sea adecuado para la retención de la composición, por ejemplo, sin permitir la liberación de la composición de la bolsa antes del contacto con el agua. La bolsa se hace de película hidrosoluble que incluye un volumen interno. Dicho volumen interno se puede dividir en compartimentos de la bolsa. Las películas preferidas son materiales poliméricos, preferiblemente polímeros que se forman en una película o lámina. Los polímeros, copolímeros o derivados de los mismos preferidos son poliacrilatos seleccionados, y copolímeros de acrilato hidrosolubles, metilcelulosa, carboximetilcelulosa, dextrina de sodio, etilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, malto dextrina, polimetacrilato, de la forma más preferible copolímeros de alcohol poliviníllico e hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC). Preferiblemente el nivel de polímero en la película, por ejemplo, PVA, es de al menos aproximadamente el 60 %. El peso molecular medio preferido será típicamente de aproximadamente 20 000 a aproximadamente 150 000. Las películas también pueden ser unas composiciones de mezcla que comprenden mezclas de polímeros degradables hidrolíticamente e hidrosolubles tales como alcohol poliactídico y polivinílico (conocidos bajo la referencia comercial M8630 vendida por Chris Craft In. Prod. Of Gary, Ind., EE.UU.) más plastificantes como glicerol, etilenglicerol, propilenglicol, sorbitol y mezclas de los mismos. Las bolsas pueden comprender una composición de limpieza para la colada sólida o componentes parciales y/o una composición de limpieza líquida o componentes parciales separados por la película hidrosoluble. El compartimento para componentes líquidos puede tener una composición diferente de la de los compartimentos que contienen sólidos (véase, por ejemplo, US 2009/0011970).

[0310] La elección de los componentes detergentes puede incluir, para el cuidado textil, la consideración del tipo de textil que se va a limpiar, el tipo y/o grado de suciedad, la temperatura a la que se va a efectuar la limpieza, y la formulación del producto detergente. Aunque los componentes mencionados más adelante se categorizan por encabezado general según una funcionalidad particular, esto no se debe interpretar como una limitación, ya que un componente puede comprender funcionalidades adicionales como apreciará el experto en la materia.

[0311] La elección de componentes adicionales se encuentra dentro de la habilidad del experto e incluye ingredientes convencionales, incluidos los componentes no limitativos ejemplares expuestos más adelante.

Tensioactivos

[0312] La composición detergente puede comprender uno o más tensioactivos, que pueden ser aniónicos y/o catiónicos y/o no iónicos y/o semipolares y/o zwitteriónicos, o una mezcla de los mismos. En una forma de realización particular, la composición detergente incluye una mezcla de uno o más tensioactivos no iónicos y uno o más tensioactivos aniónicos. El tensioactivo (los tensioactivos) están típicamente presentes en un nivel de aproximadamente el 0,1 % al 60 % en peso, tal como de aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 40 %, o de aproximadamente el 3 % a aproximadamente al 20 %, o de aproximadamente el 3 % a aproximadamente el 10 %. El tensioactivo (los tensioactivos) se elige(n) basándose en la aplicación de limpieza deseada, y puede(n) incluir cualquier tensioactivo (cualesquiera tensioactivos) convencional(es) conocido(s) en la técnica.

[0313] Cuando se incluyen en el mismo, el detergente normalmente contendrá de aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 40 % en peso de un tensioactivo aniónico, tal como de aproximadamente el 5 % a aproximadamente el 30 %, con de aproximadamente el 5 % a aproximadamente el 15 %, o de aproximadamente el 15 % a aproximadamente el 20 %, o de aproximadamente el 20 % a aproximadamente el 25 % de un tensioactivo aniónico. Ejemplos no limitativos de tensioactivos aniónicos incluyen sulfatos y sulfonatos, en particular, alquilbencenosulfonatos lineales (LAS), isómeros de LAS, alquilbencenosulfonatos ramificados (BABS), fenilalcanosulfonatos, alfa-olefinsulfonatos (AOS), olefinsulfonatos, alquenosulfonatos, alcano-2,3-diilbis(sulfatos), hidroxialcanosulfonatos y disulfonatos, alquilsulfatos (AS) tales como dodecilsulfato de sodio (SDS), sulfatos de alcoholes grasos (FAS), sulfatos de alcoholes primarios (PAS), sulfatos de éteres de alcoholes (AES o AEOS o FES, conocidos también como etoxisulfatos de alcoholes o sulfatos de éteres de alcoholes grasos), alcanosulfonatos secundarios (SAS), sulfonatos de parafina (PS), sulfonatos de ésteres, ésteres de glicerol de ácidos grasos sulfonatados, ésteres metílicos de ácido graso alfa-sulfonados (alfa-SFMe o SES) incluidos sulfonato de éster metílico (MES), ácido alquil o alquenilsuccínico, ácido dodecenil/tetradecenil succínico (DTSA), derivados de ácido graso de aminoácidos, diésteres y monoésteres de ácido sulfosuccínico o sal de ácidos grasos (jabón), y combinaciones de los mismos.

[0314] Cuando se incluye en el mismo, el detergente normalmente contendrá de aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 40 % por peso de un tensioactivo catiónico, por ejemplo de aproximadamente el 0,5 % a aproximadamente el 30 %, en particular de aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 20 %, de aproximadamente el 3 % a aproximadamente el 10 %, tal como de aproximadamente el 3 % a aproximadamente el 5 %, de aproximadamente el 8 % a aproximadamente el 12 % o de aproximadamente el 10 % a aproximadamente el 12 %. Ejemplos no limitativos de tensioactivos catiónicos incluyen alquildimetiletanolamina

cuat (ADMEAQ), bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), cloruro de dimetildistearilamonio (DSDMAC), y alquilbencildimetilamonio, compuestos de amonio cuaternario de alquilo, compuestos de amonio cuaternario alcoxilado (AQA), cuats de éster, y combinaciones de los mismos.

[0315] Cuando se incluye en el mismo, el detergente normalmente contendrá de aproximadamente el 0,2 % a aproximadamente el 40 % en peso de un tensioactivo no iónico, por ejemplo de aproximadamente el 0,5 % a aproximadamente el 30 %, en particular de aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 20 %, de aproximadamente el 3 % a aproximadamente el 10 %, tal como de aproximadamente el 3 % a aproximadamente el 5 %, de aproximadamente el 8 % a aproximadamente el 12 %, o de aproximadamente el 10 % a aproximadamente el 12 %. Ejemplos no limitativos de tensioactivos no iónicos incluyen etoxilatos de alcohol (AE o AEO), propoxilatos de alcohol, alcoholes grasos propoxilados, ésteres alquílicos de ácidos grasos alcoxilados (PFA), tales como ésteres alquílicos de ácidos grasos etoxilados y/o propoxilados, etoxilatos de alquilfenol, etoxilatos de nonilfenol (NPE), alquilpoliglucosidas (APG), aminas alcoxiladas, monoetanolamidas de ácidos grasos (FAM), dietanolamidas de ácidos grasos (FADA), monoetanolamidas de ácidos grasos etoxilados (EFAM), monoetanolamidas de ácidos grasos propoxilados (PFAM), amidas de ácidos grasos de polihidroxialquilo, o derivados de *N-acilo N-alquilo* de glucosamina (glucamidas, GA, o glucamidas de ácidos grasos, FAGA), al igual que productos disponibles bajo los nombres comerciales SPAN y TWEEN, y combinaciones de los mismos.

[0316] Cuando se incluye en el mismo, el detergente normalmente contendrá de aproximadamente el 0 % a aproximadamente el 40 % en peso de un tensioactivo semipolar. Ejemplos no limitativos de tensioactivos semipolares incluyen óxidos de amina (AO) tales como óxido de alquildimetilamina, *N*-(alquilo de coco)-*N,N*-dimetilamina y óxido de *N*-(alquilo de sebo)-*N,N*-bis(2-hidroxietil)amina, y combinaciones de los mismos.

[0317] Cuando se incluye en el mismo, el detergente normalmente contendrá de aproximadamente el 0 % a aproximadamente el 40 % en peso de un tensioactivo zwitteriónico. Ejemplos no limitativos de tensioactivos zwitteriónicos incluyen betaínas tales como alquildimetilbetaínas, sulfobetaínas, y combinaciones de las mismas.

Hidrótropos

[0318] Un hidrótropo es un compuesto que solubiliza compuestos hidrofóbicos en soluciones acuosas (o al contrario, sustancias polares en un ambiente no polar). Típicamente, los hidrótropos tienen un carácter tanto hidrofílico como hidrofóbico (denominadas propiedades anfifílicas como se conoce de los tensioactivos); sin embargo, la estructura molecular de los hidrótropos generalmente no favorece la autoagregación espontánea, véase, por ejemplo, la revisión de Hodgdon y Kaler (2007), Current Opinion in Colloid & Interface Science 12: 121-128. Los hidrótropos no muestran una concentración crítica por encima de la cual ocurre la autoagregación como se observa para los tensioactivos y lípidos que forman fases micelares, laminares u otras mesofases bien definidas. En cambio, muchos hidrótropos muestran un proceso de agregación de tipo continuo donde los tamaños de los agregados crecen a medida que la concentración aumenta. Sin embargo, muchos hidrótropos alteran el comportamiento fásico, la estabilidad, y las propiedades coloidales de los sistemas que contienen sustancias de carácter polar y no polar, que incluyen mezclas de agua, aceite, tensioactivos, y polímeros. Los hidrótropos se usan clásicamente en industrias desde la farmacéutica, del cuidado personal, alimentaria, hasta las aplicaciones técnicas. El uso de hidrótropos en composiciones detergentes permite, por ejemplo, formulaciones más concentradas de tensioactivos (como en el proceso de compactación de detergentes líquidos eliminando el agua) sin inducir fenómenos no deseados tales como la separación de fases o alta viscosidad.

[0319] El detergente puede contener del 0-10 % en peso, por ejemplo, del 0-5 % en peso, tal como aproximadamente del 0,5 a aproximadamente el 5 %, o aproximadamente del 3 % a aproximadamente el 5 %, de un hidrótropo. Cualquier hidrótropo conocido en la técnica para el uso en detergentes se puede utilizar. Ejemplos no limitativos de hidrótropos incluyen bencenosulfonato de sodio, p-toluenosulfonato de sodio (STS), xilenosulfonato de sodio (SXS), cumenosulfonato de sodio (SCS), cimenosulfonato de sodio, óxidos de amina, alcoholes y poliglicoléteres, hidroxinaftoato de sodio, hidroxinaftalenosulfonato de sodio, etilhexilosulfato de sodio, y combinaciones de los mismos.

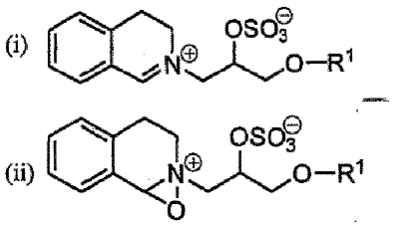
Adyuvantes y coadyuvantes

[0320] La composición detergente puede contener aproximadamente del 0-65 % en peso, tal como aproximadamente del 5 % a aproximadamente el 50 % de un adyuvante o coadyuvante de detergente o una mezcla de los mismos. El adyuvante y/o el coadyuvante pueden ser particularmente un agente quelante que forma complejos hidrosolubles con Ca y Mg. Cualquier adyuvante y/o coadyuvante conocido en la técnica para el uso en detergentes se puede utilizar. Los ejemplos no limitativos de coadyuvantes incluyen zeolitas, difosfatos (pirofosfatos), trifosfatos tales como trifosfato de sodio (STP o STPP), carbonatos tales como carbonato de sodio, silicatos solubles tales como metasilicato de sodio, silicatos estratificados (por ejemplo, SKS-6 de Hoechst), etanolaminas tales como 2-aminoetan-1-ol (MEA), dietanolamina (DEA, conocido también como 2,2'-iminodietan-1-ol), trietanolamina (TEA, conocido también como 2,2',2''-nitrilotrietan-1-ol), y (carboximetil)inulina (CMI), y combinaciones de los mismos.

[0321] La composición detergente también puede contener del 0-50 % en peso, tal como aproximadamente del 5 % a aproximadamente el 30 %, de un coadyuvante de detergente. La composición detergente puede incluir un coadyuvante solo, o en combinación con un adyuvante, por ejemplo, un adyuvante de zeolita. Ejemplos no limitativos de coadyuvantes incluyen homopolímeros de poliacrilatos o copolímeros de los mismos, tales como ácido poli(acrílico) (PAA) o copolímero de ácido acrílico/ácido maleico (PAA/PMA). Otros ejemplos no limitativos incluyen citrato, quelantes tales como aminocarboxilatos, aminopolicarboxilatos y fosfonatos, y ácido alquil o alquenilsuccínico. Ejemplos específicos adicionales incluyen ácido 2,2',2''-nitrilotriacético (NTA), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA), ácido iminodisuccínico (IDS), ácido etilendiamina-*N,N'*-disuccínico (EDDS), ácido metilglicinadiacético (MGDA), ácido-*N* glutámico, ácido *N*-diacético (GLDA), ácido 1-hidroxietano-1,1-difosfónico (HEDP), ácido etilendiaminetetra(metilenfosfónico) (EDTMPA), ácido dietilentriaminopentaquis(metilenfosfónico) (DTMPA o DTPMPA), ácido *N*-(2-hidroxietil)iminodiacético (EDG), ácido aspártico-ácido-*N*-monoacético (ASMA), ácido aspártico-*N,N*-ácido diacético (ASDA), ácido aspártico-*N*-ácido monopropiónico (ASMP), ácido iminodisuccínico (IDA), ácido *N*-(2-sulfometil)-aspártico (SMAS), ácido *N*-(2-sulfoetil)-aspártico (SEAS), ácido *N*-(2-sulfometil)-glutámico (SMGL), ácido *N*-(2-sulfoetil)-glutámico (SEGL), ácido *N*-metiliminodiacético (MIDA), ácido α-alanina-*N,N*-diacético (a-ALDA), ácido serina-*N,N*-diacético (SEDA), ácido isoserina-*N,N*-diacético (ISDA), ácido fenilalanina-*N,N*-diacético (PHDA), ácido antranílico-*N,N*-diacético (ANDA), ácido sulfanílico-*N,N*-diacético (SLDA), ácido taurina-*N,N*-diacético (TUDA) y ácido sulfometil-*N,N*-diacético (SMDA), ácido *N*-(2-hidroxietil)etilendiamina-*N,N',N''*-triacético (HEDTA), dietanolglicina (DEG), dietilentriamina penta(ácido metilenfosfónico) (DTPMP), aminotris(ácido metilenfosfónico) (ATMP), y combinaciones y sales de los mismos. Adyuvantes y/o coadyuvantes ejemplares adicionales se describen en, por ejemplo, WO 09/102854, US 5977053

Sistemas blanqueantes

[0322] El detergente puede contener del 0-30 % en peso, tal como aproximadamente del 1 % a aproximadamente el 20 %, de un sistema blanqueante. Cualquier sistema blanqueante conocido en la técnica para el uso en detergentes se puede utilizar. Componentes de sistema blanqueante adecuados incluyen catalizadores de blanqueo, fotoblanqueadores, activadores de blanqueo, fuentes de peróxido de hidrógeno tales como percarbonato de sodio, perboratos de sodio y peróxido de hidrógeno-urea (1:1), perácidos preformados y mezclas de los mismos. Los perácidos preformados adecuados incluyen, pero de forma no limitativa, ácidos y sales peroxicarboxílicos, ácidos diperoxidicarboxílicos, ácidos y sales perimídicos, ácidos y sales peroximonosulfúricos, por ejemplo, Oxone (R), y mezclas de los mismos. Ejemplos no limitativos de sistemas blanqueantes incluyen sistemas blanqueantes basados en peróxido, que pueden comprender, por ejemplo, una sal inorgánica, incluidas sales de metales alcalinos tales como sales sódicas de perborato (normalmente mono o tetrahidratado), sales de percarbonato, persulfato, perfosfato, persilicato, en combinación con un activador de blanqueo que forma perácidos. El término activador de blanqueo se entiende aquí como un compuesto que reacciona con peróxido de hidrógeno para formar un perácido vía perhidrolisis. El perácido así formado constituye el blanqueador activado. Los activadores de blanqueo adecuados para usarse en este documento incluyen aquellos de la clase de ésteres, amidas, imidas o anhídridos. Ejemplos adecuados son tetraacetiletilendiamina, (TAED) 4-[(3,5,5-trimetilhexanoil)oxi]benceno-1-sulfonato de sodio (ISONOBS), 4-(dodecanoiloxi)benceno-1-sulfonato (LOBS), 4-(decanoiloxi)benceno-1-sulfonato, 4-(decanoiloxi)benzoato (DOBS o DOBA), 4-(nonanoiloxi)benceno-1-sulfonato (NOBS), y/o aquellos descritos en WO98/17767. Una familia particular de activadores de blanqueo de interés se describió en EP624154 y se prefiere particularmente en esa familia el acetilcitrato de trietilo (ATC). El ATC o un triglicérido de cadena corta como la triacetina tiene la ventaja de ser respetuoso con el medio ambiente. Además, el acetilcitrato de trietilo y la triacetina tienen buena estabilidad hidrolítica en el producto tras el almacenamiento y son activadores de blanqueo eficaces. Finalmente, el ATC es multifuncional, ya que el citrato liberado en la reacción de perhidrolisis puede funcionar como un adyuvante. Alternativamente, el sistema blanqueante puede comprender peroxiácidos del tipo, por ejemplo, amida, imida, o sulfona. El sistema blanqueante también puede comprender perácidos tales como ácido 6-(ftalimido)peroxihexanoico (PAP). El sistema blanqueante también puede incluir un catalizador de blanqueo. En algunas formas de realización, el componente blanqueante puede ser un catalizador orgánico seleccionado del grupo que consiste en los catalizadores orgánicos que tienen las fórmulas siguientes:



(iii) y mezclas de los mismos;

donde cada R^1 es independientemente un grupo alquilo ramificado que contiene de 9 a 24 carbonos o un grupo alquilo lineal que contiene de 11 a 24 carbonos, preferiblemente cada R^1 es independientemente un grupo alquilo

ramificado que contiene de 9 a 18 carbonos o un grupo alquilo lineal que contiene de 11 a 18 carbonos, más preferiblemente cada R^1 se selecciona independientemente del grupo que consiste en 2-propilheptilo, 2-butiloctilo, 2-pentilnonilo 2-hexildecilo, dodecilo, tetradecilo, hexadecilo, octadecilo, isononilo, isodecilo, isotridecilo e isopentadecilo. Otros sistemas blanqueantes ejemplares se describen, por ejemplo, en WO2007/087258, WO2007/087244, WO2007/087259, EP1867708 (Vitamina K) y WO2007/087242. Los fotoblanqueadores adecuados pueden ser, por ejemplo, ftalocianinas de zinc o aluminio sulfonatadas.

[0323] Preferiblemente, el componente blanqueador comprende una fuente de perácido además del catalizador de blanqueo, particularmente un catalizador de blanqueo orgánico. La fuente de perácido se puede seleccionar de (a) perácido preformado; (b) sal de percarbonato, perborato o persulfato (fuente de peróxido de hidrógeno) preferiblemente en combinación con un activador de blanqueo; y (c) enzima perhidrolasa y un éster para formar perácido *in situ* en presencia de agua en una etapa de tratamiento textil.

Polímeros

[0324] El detergente puede contener del 0-10 % en peso, tal como del 0,5-5 %, 2-5 %, 0,5-2 % o 0,2-1 % de un polímero. Cualquier polímero conocido en la técnica para el uso en detergentes se puede utilizar. El polímero puede funcionar como un coadyuvante como se ha mencionado anteriormente, o puede proporcionar propiedades de antirredeposición, protección de las fibras, liberación de suciedad, inhibición de la transferencia de tintes, limpieza de grasa y/o antiespumantes. Algunos polímeros pueden tener más de una de las propiedades anteriormente mencionadas y/o más de uno de los motivos mencionados más adelante. Polímeros ejemplares incluyen (carboximetil)celulosa (CMC), poli(alcohol vinílico) (PVA), poli(vinilpirrolidona) (PVP), poli(etilenglicol) o poli(óxido de etileno) (PEG), poli(etilenimina) etoxilada, carboximetilinulina (CMI), y policarboxilatos tales como PAA, PAA/PMA ácido poliaspártico, y copolímeros de metacrilato de laurilo/ácido acrílico, CMC modificada hidrofóbicamente (HM-CMC) y siliconas, copolímeros de ácido tereftálico y glicoles oligoméricos, copolímeros de poli(tereftalato de etileno) y poli(tereftalato de oxieteno) (PET-POET), PVP, poli(vinilimidazol) (PVI), poli(vinilpiridina-*N*-óxido) (PVPO o PVPNO) y polivinilpirrolidona-vinilimidazol (PVPVI). Polímeros ejemplares adicionales incluyen policarboxilatos sulfonatados, óxido de polietileno y óxido de polipropileno (PEO-PPO) y etoxisulfato de diquaternium. Otros polímeros ejemplares se describen en, por ejemplo, WO 2006/130575. Las sales de los polímeros anteriormente mencionados también se contemplan.

Agentes de matizado de tejidos

[0325] Las composiciones detergentes de la presente invención también pueden incluir agentes de matizado de tejidos tales como tintes o pigmentos, que, cuando se formulan en composiciones detergentes, se pueden depositar sobre un tejido cuando dicho tejido se pone en contacto con una solución de lavado que comprende dichas composiciones detergentes y alterar así el tinte de dicho tejido mediante la absorción/reflexión de la luz visible. Los agentes blanqueadores fluorescentes emiten al menos alguna luz visible. En cambio, los agentes de matizado de tejidos alteran el tinte de una superficie dado que absorben al menos una porción del espectro de luz visible. Los agentes de matizado de tejidos adecuados incluyen tintes y conjugados de tinte-arcilla, y también puede incluir pigmentos. Los tintes adecuados incluyen tintes de molécula pequeña y tintes poliméricos. Los tintes de molécula pequeña adecuados incluyen tintes de molécula pequeña seleccionados del grupo que consiste en tintes incluidos en el Índice de color (C.I.) en las clasificaciones de Azul directo, Rojo directo, Violeta directo, Azul ácido, Rojo ácido, Violeta ácido, Azul básico, Violeta básico y Rojo básico, o mezclas de los mismos, por ejemplo, como se describe en WO2005/03274, WO2005/03275, WO2005/03276 y EP1876226 (que se incorporan en el presente documento por referencia). La composición detergente preferiblemente comprende de aproximadamente el 0,00003 % en peso a aproximadamente el 0,2 % en peso, de aproximadamente el 0,00008 % en peso a aproximadamente el 0,05 % en peso, o incluso de aproximadamente el 0,0001 % en peso a aproximadamente el 0,04 % en peso de agente de matizado de tejidos. La composición puede comprender del 0,0001 % en peso al 0,2 % en peso de agente de matizado de tejidos, esto se puede preferir especialmente cuando la composición esté en forma de una bolsa de dosis unitaria. Los agentes de matizado adecuados también se describen en, por ejemplo, WO 2007/087257 y WO2007/087243.

Enzimas

[0326] El aditivo detergente al igual que la composición detergente puede comprender una o más enzimas adicionales tal como una proteasa, lipasa, cutinasa, una amilasa, carbohidrasa, celulasa, pectinasa, mananasa, arabinasa, galactanasa, xilanasa, oxidasa, por ejemplo, una lacasa, y/o peroxidasa.

[0327] En general, las propiedades de la(s) enzima(s) seleccionada(s) deberían ser compatibles con el detergente seleccionado, (es decir, pH óptimo, compatibilidad con otros ingredientes enzimáticos y no enzimáticos, etc.), y la(s) enzima(s) debería(n) estar presente(s) en cantidades eficaces. En una forma de realización preferida, el aditivo detergente o la composición detergente comprende una proteasa. En otra forma de realización, dicha proteasa tiene al menos el 90 %, tal como al menos el 95 %, tal como el 100 % de identidad de secuencia con la SEQ ID N.º: 10

Celulasas

[0328] Las celulasas adecuadas incluyen aquellas de origen bacteriano o fúngico. Los mutantes químicamente modificados o diseñados de proteína se incluyen. Las celulasas adecuadas incluyen celulasas de los géneros *Bacillus, Pseudomonas, Humicola, Fusarium, Thielavia, Acremonium*, por ejemplo, las celulasas fúngicas producidas de *Humicola insolens, Myceliophthora thermophila* y *Fusarium oxysporum* descritas en US 4,435,307, US 5,648,263, US 5,691,178, US 5,776,757 y WO 89/09259.

[0329] Las celulasas especialmente adecuadas son las celulasas alcalinas o neutras que tienen beneficios de cuidado del color. Ejemplos de tales celulasas son las celulasas descritas en EP 0 495 257, EP 0 531 372, WO 96/11262, WO 96/29397, WO 98/08940. Otros ejemplos son las variantes de celulasa tales como las descritas en WO 94/07998, EP 0 531 315, US 5,457,046, US 5,686,593, US 5,763,254, WO 95/24471, WO 98/12307 y WO99/001544.

[0330] Otras celulasas son la enzima endo-beta-1,4-glucanasa que tiene una secuencia con al menos el 97 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la posición 1 a la posición 773 de la SEQ ID N.º: 2 de WO 2002/099091 o una xiloglucanasa de la familia 44, enzima xiloglucanasa que tiene una secuencia con al menos el 60 % de identidad con las posiciones 40-559 de la SEQ ID N.º: 2 de WO 2001/062903.

[0331] Las celulasas disponibles comercialmente incluyen Celluzyme™, y Carezyme™ (Novozymes A/S) Carezyme Premium™ (Novozymes A/S), Celluclean™ (Novozymes A/S), Celluclean Classic™ (Novozymes A/S), Cellusoft™ (Novozymes A/S), Whitezyme™ (Novozymes A/S), Clazinase™, y Puradax HA™ (Genencor International Inc.), y KAC-500(B)™ (Kao Corporation).

Proteasas

[0332] Las proteasas adecuadas incluyen aquellas de origen bacteriano, fúngico, vegetal, vírico o animal, por ejemplo, origen vegetal o microbiano. Se prefiere el origen microbiano. Los mutantes químicamente modificados o diseñados de proteína se incluyen. Puede ser una proteasa alcalina, tal como una serina proteasa o una metaloproteasa. Una serina proteasa puede, por ejemplo, ser de la familia S1, tal como tripsina, o la familia S8 tal como subtilisina. Una proteasa de metaloproteasas puede, por ejemplo, ser una termolisina de, por ejemplo, la familia M4 u otra metaloproteasa tal como las de las familias M5, M7 o M8.

[0333] El término "subtilasas" se refiere a un subgrupo de serina proteasa según Siezen *et al*., Protein Engng. 4 (1991) 719-737 y Siezen *et al*. Protein Science 6 (1997) 501-523. Las serina proteasas son un subgrupo de proteasas caracterizado por tener una serina en el sitio activo, que forma un aducto covalente con el sustrato. Las subtilasas se pueden dividir en 6 subdivisiones, es decir, la familia de la subtilisina, la familia de la termitasa, la familia de la proteinasa K, la familia de la peptidasa lantibiótica, la familia de la kexina y la familia de la pirolisina.

[0334] Ejemplos de subtilasas son aquellas obtenidas de *Bacillus* tal como *Bacillus lentus, B. alkalophilus, B. subtilis, B. amyloliquefaciens, Bacillus pumilus* y *Bacillus gibsonii* descritas en US7262042 y WO09/021867, y *subtilisina lentus*, *subtilisina Novo, subtilisina Carlsberg, Bacillus licheniformis, subtilisina BPN', subtilisina 309, subtilisina 147 y subtilisina 168* descritas en WO89/06279 y proteasa PD138 descrita en (WO93/18140). Otras proteasas útiles pueden ser aquellas descritas en WO92/175177, WO01/016285, WO02/026024 y WO02/016547. Ejemplos de proteasas similares a la tripsina son tripsina (por ejemplo, de origen porcino o bovino) y la proteasa de *Fusarium* descrita en WO89/06270, WO94/25583 y WO05/040372, y las proteasas de quimiotripsina obtenidas de *Cellumonas* descritas en WO05/052161 y WO05/052146.

[0335] Una proteasa preferida adicional es la proteasa alcalina de *Bacillus lentus* DSM 5483, como se describe, por ejemplo, en WO95/23221, y las variantes de la misma, que se describen en WO92/21760, WO95/23221, EP1921147 y EP1921148.

[0336] Ejemplos de metaloproteasas son la metaloproteasa neutra como se describe en WO07/044993 (Genencor Int.) tales como las obtenidas de *Bacillus amyloliquefaciens*.

[0337] Ejemplos de proteasas útiles son las variantes descritas en: WO92/19729, WO96/034946, WO98/20115, WO98/20116, WO99/011768, WO01/44452, WO03/006602, WO04/03186, WO04/041979, WO07/006305, WO11/036263, WO11/036264, especialmente las variantes con sustituciones en una o más de las siguientes posiciones: 3, 4, 9, 15, 27, 36, 57, 68, 76, 87, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 106, 118, 120, 123, 128, 129, 130, 160, 167, 170, 194, 195, 199, 205, 206, 217, 218, 222, 224, 232, 235, 236, 245, 248, 252 y 274 utilizando la numeración BPN'. Más preferido, las variantes de subtilasa pueden comprender las mutaciones: S3T, V4I, S9R, A15T, K27R, *36D, V68A, N76D, N87S,R, *97E, A98S, S99G,D,A, S99AD, S101G,M,R S103A, V104I,Y,N, S106A, G118V,R, H120D,N, N123S, S128L, P129Q, S130A, G160D, Y167A, R170S, A194P, G195E, V199M, V205I, L217D, N218D, M222S, A232V, K235L, Q236H, Q245R, N252K, T274A (usando numeración BPN').

[0338] Las enzimas de proteasa disponibles comercialmente adecuadas incluyen aquellas vendidas bajo los nombres comerciales de Alcalase®, Duralase™, Durazym™, Relase®, Relase® Ultra, Savinase®, Savinase® Ultra, Primase®, Polarzyme®, Kannase®, Liquanase®, Liquanase® Ultra, Ovozyme®, Coronase®, Coronase® Ultra, Neutrase®, Everlase® y Esperase® (Novozymes A/S), aquellas vendidas bajo el nombre comercial de Maxatase®, Maxacal®, Maxapem®, Purafect®, Prime® Purafect, Preferenz™, Purafect MA®, Purafect Ox®, Purafect OxP®, Puramax®, Properase®, Effectenz™, FN2®, FN3®, FN4®, Excellase®, Opticlean® y Optimase® (Danisco/DuPont), Axapem™ (Gist-Brocases N.V.), BLAP (secuencia mostrada en la figura 29 de US5352604) y variantes de la misma (Henkel AG) y KAP (subtilisina de *Bacillus alkalophilus*) de Kao.

Lipasas y cutinasas

[0339] Las lipasas y cutinasas adecuadas incluyen aquellas de origen bacteriano o fúngico. Las enzimas mutantes modificadas químicamente o diseñadas de proteína se incluyen. Ejemplos incluyen lipasa de *Thermomyces*, por ejemplo, de *T. lanuginosus* (previamente denominada *Humicola lanuginosa*) como se describe en EP258068 y EP305216, cutinasa de *Humicola*, por ejemplo, *H. insolens* (WO96/13580), lipasa de cepas de *Pseudomonas* (algunas de estas ahora redenominadas *Burkholderia*), por ejemplo, *P. alcaligenes* o *P. pseudoalcaligenes* (EP218272), *P. cepacia* (EP331376), cepa de *P. sp.* SD705 (WO95/06720 y WO96/27002), *P. wisconsinensis* (WO96/12012), lipasas de *Streptomyces* de tipo GDSL (WO10/065455), cutinasa de *Magnaporthe grisea* (WO1 0/1 07560), cutinasa de *Pseudomonas mendocina* (US5,389,536), lipasa de *Thermobifida fusca* (WO11/084412), lipasa de *Geobacillus stearothermophilus* (WO11/084417), lipasa de *Bacillus subtilis* (WO11/084599), y lipasa de *Streptomyces griseus* (WO11/150157) y *S. pristinaespirales* (WO12/137147).

[0340] Otros ejemplos son variantes de lipasa tales como los descritos en EP407225, WO92/05249, WO94/01541, WO94/25578, WO95/14783, WO95/30744, WO95/35381, WO95/22615, WO96/00292, WO97/04079, WO97/07202, WO00/34450, WO00/60063, WO01/92502, WO07/87508 y WO09/109500.

[0341] Los productos de lipasa comerciales preferidos incluyen Lipolase™, Lipex™; Lipolex™ y Lipoclean™ (Novozymes A/S), Lumafast (originalmente de Genencor) y Lipomax (originalmente de Gist-Brocades).

[0342] Otros ejemplos son lipasas a veces referidas como aciltransferasas o perhidrolasas, por ejemplo, aciltransferasas con homología con la lipasa A de *Candida antarctica* (WO10/111143), aciltransferasa de *Mycobacterium smegmatis* (WO05/56782), perhidrolasas de la familia CE 7 (WO09/67279), y variantes de la perhidrolasa de *M. smegmatis* en particular la variante S54V usada en el producto comercial Gentle Power Bleach de Huntsman Textile Effects Pte Ltd (WO10/100028).

Amilasas

[0343] Las amilasas adecuadas que se pueden usar junto con la enzima de la invención pueden ser una alfa-amilasa o una glucoamilasa y pueden ser de origen bacteriano o fúngico. Los mutantes químicamente modificados o diseñados de proteína se incluyen. Las amilasas incluyen, por ejemplo, alfa-amilasas obtenidas de *Bacillus*, por ejemplo, una cepa especial de *Bacillus licheniformis*, descrita con más detalle en GB 1,296,839.

[0344] Las amilasas adecuadas incluyen amilasas que tienen la SEQ ID N.º: 2 en WO 95/10603 o variantes que tienen el 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID N.º: 3 de la misma. Las variantes preferidas se describen en WO 94/02597, WO 94/18314, WO 97/43424 y la SEQ ID N.º: 4 de WO 99/019467, tales como variantes con sustituciones en una o más de las siguientes posiciones: 15, 23, 105, 106, 124, 128, 133, 154, 156, 178, 179, 181, 188, 190, 197, 201, 202, 207, 208, 209, 211, 243, 264, 304, 305, 391, 408, y 444.

[0345] Diferentes amilasas adecuadas incluyen amilasas que tienen la SEQ ID N.º: 6 en WO 02/010355 o variantes de las mismas que tienen el 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID N.º: 6. Las variantes preferidas de la SEQ ID N.º: 6 son aquellas que tienen una eliminación en las posiciones 181 y 182 y una sustitución en la posición 193.

[0346] Otras amilasas que son adecuadas son la alfa-amilasa híbrida que comprende los residuos 1-33 de la alfa-amilasa obtenida de *B. amyloliquefaciens* mostrada en la SEQ ID N.º: 6 de WO 2006/066594 y los residuos 36-483 de la alfa-amilasa de *B. licheniformis* mostrada en la SEQ ID N.º: 4 de WO 2006/066594 o las variantes que tienen el 90 % de identidad de secuencia de las mismas. Las variantes preferidas de esta alfa-amilasa híbrida son aquellas que tienen una sustitución, una eliminación o una inserción en una o más de las siguientes posiciones: G48, T49, G107, H156, A181, N190, M197, 1201, A209 y Q264. Las variantes más preferidas de la alfa-amilasa híbrida que comprende los residuos 1-33 de la alfa-amilasa obtenida de *B. amyloliquefaciens* mostrada en la SEQ ID N.º: 6 de WO 2006/066594 y los residuos 36-483 de la SEQ ID N.º: 4 son aquellas que tienen las sustituciones:

M197T;

H156Y+A181T+N190F+A209V+Q264S; o
G48A+T49I+G107A+H156Y+A181T+N190F+I201F+A209V+Q264S.

[0347] Las amilasas adicionales que son adecuadas son amilasas que tienen la SEQ ID N.º: 6 en WO 99/019467 o variantes de las mismas que tienen el 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID N.º: 6. Las variantes preferidas de la SEQ ID N.º: 6 son aquellas que tienen una sustitución, una eliminación o una inserción en una o más de las siguientes posiciones: R181, G182, H183, G184, N195, I206, E212, E216 y K269. Las amilasas particularmente preferidas son aquellas que tienen una eliminación en las posiciones R181 y G182, o en las posiciones H183 y G184.

[0348] Las amilasas adicionales que se pueden usar son aquellas que tienen la SEQ ID N.º: 1, la SEQ ID N.º: 3, la SEQ ID N.º: 2 o la SEQ ID N.º: 7 de WO 96/023873 o variantes de las mismas que tienen el 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID N.º: 1, la SEQ ID N.º: 2, la SEQ ID N.º: 3 o la SEQ ID N.º: 7. Las variantes preferidas de la SEQ ID N.º: 1, la SEQ ID N.º: 2, la SEQ ID N.º: 3 o la SEQ ID N.º: 7 son aquellas que tienen una sustitución, una eliminación o una inserción en una o más de las siguientes posiciones: 140, 181, 182, 183, 184, 195, 206, 212, 243, 260, 269, 304 y 476, usando la SEQ ID 2 de WO 96/023873 para la numeración. Las variantes más preferidas son aquellas que tienen una eliminación en dos posiciones seleccionadas de 181, 182, 183 y 184, tal como 181 y 182, 182 y 183, o las posiciones 183 y 184. Las variantes de amilasa más preferidas de la SEQ ID N.º: 1, la SEQ ID N.º: 2 o la SEQ ID N.º: 7 son aquellas que tienen una eliminación en las posiciones 183 y 184 y una sustitución en una o más de las posiciones 140, 195, 206, 243, 260, 304 y 476.

[0349] Otras amilasas que se pueden usar son las amilasas que tienen la SEQ ID N.º: 2 de WO 08/153815, la SEQ ID N.º: 10 en WO 01/66712 o variantes de las mismas que tienen el 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID N.º: 2 de WO 08/153815 o el 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID N.º: 10 en WO 01/66712. Las variantes preferidas de la SEQ ID N.º: 10 en WO 01/66712 son aquellas que tienen una sustitución, una eliminación o una inserción en una o más de las siguientes posiciones: 176, 177, 178, 179, 190, 201, 207, 211 y 264.

[0350] Amilasas adecuadas adicionales son las amilasas que tienen la SEQ ID N.º: 2 de WO 09/061380 o variantes que tienen el 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID N.º: 2 de las mismas. Las variantes preferidas de la SEQ ID N.º: 2 son aquellas que tienen un truncamiento del C-terminal y/o una sustitución, una eliminación o una inserción en una o más de las siguientes posiciones: Q87, Q98, S125, N128, T131, T165, K178, R180, S181, T182, G183, M201, F202, N225, S243, N272, N282, Y305, R309, D319, Q320, Q359, K444 y G475. Las variantes más preferidas de la SEQ ID N.º: 2 son aquellas que tienen la sustitución en una o más de las siguientes posiciones: Q87E,R, Q98R, S125A, N128C, T131I, T165I, K178L, T182G, M201L, F202Y, N225E,R, N272E,R, S243Q,A,E,D, Y305R, R309A, Q320R, Q359E, K444E y G475K y/o eliminación en la posición R180 y/o S181 o T182 y/o G183. Las variantes de amilasa más preferidas de la SEQ ID N.º: 2 son aquellas que tienen las sustituciones:

N128C+K178L+T182G+Y305R+G475K;
N128C+K178L+T182G+F202Y+Y305R+D319T+G475K;
S125A+N128C+K178L+T182G+Y305R+G475K; o
S125A+N128C+T1311+T1651+K178L+T182G+Y305R+G475K, donde las variantes se truncan en el C-terminal y opcionalmente comprenden además una sustitución en la posición 243 y/o una eliminación en la posición 180 y/o la posición 181.

[0351] Otras amilasas adecuadas son la alfa-amilasa que tiene la SEQ ID N.º: 12 en WO01/66712 o una variante que tiene al menos el 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID N.º: 12. Las variantes de amilasa preferidas son aquellas que tienen una sustitución, una eliminación o una inserción en una o más de las siguientes posiciones de la SEQ ID N.º: 12 en WO01/66712: R28, R118, N174; R181, G182, D183, G184, G186, W189, N195, M202, Y298, N299, K302, S303, N306, R310, N314; R320, H324, E345, Y396, R400, W439, R444, N445, K446, Q449, R458, N471, N484. Las amilasas particularmente preferidas incluyen variantes que tienen una eliminación de D183 y G184 y que tienen las sustituciones R118K, N195F, R320K y R458K, y una variante que tiene adicionalmente las sustituciones en una o más posiciones seleccionadas del grupo: M9, G149, G182, G186, M202, T257, Y295, N299, M323, E345 y A339, de la forma más preferida una variante que tiene adicionalmente sustituciones en todas estas posiciones.

[0352] Otros ejemplos son variantes de amilasa tales como las descritas en WO2011/098531, WO2013/001078 y WO2013/001087.

[0353] Las amilasas disponibles comercialmente son Duramyl™, Termamyl™, Fungamyl™, Stainzyme ™, Stainzyme Plus™, Natalase™, Liquozyme X y BAN™ (de Novozymes A/S), y Rapidase™, Purastar™/Effectenz™, Powerase y Preferenz S100 (de Genencor International Inc./DuPont).

Peroxidasas/oxidasas

[0354] Una peroxidasa según la invención es una enzima peroxidasa comprendida por la clasificación de enzimas EC 1.11.1.7, como se establece por el Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB), o cualquier fragmento obtenido de la misma, que exhibe actividad de peroxidasa.

[0355] Las peroxidasas adecuadas incluyen aquellas de origen vegetal, bacteriano o fúngico. Los mutantes químicamente modificados o diseñados de proteína se incluyen. Ejemplos de peroxidasas útiles incluyen peroxidasas de *Coprinopsis*, por ejemplo, de *C. cinerea* (EP 179,486), y variantes de las mismas como aquellas descritas en WO 93/24618, WO 95/10602, y WO 98/15257.

[0356] Una peroxidasa según la invención también incluye una enzima haloperoxidasa, tal como cloroperoxidasa, bromoperoxidasa y compuestos que muestran actividad de cloroperoxidasa o bromoperoxidasa. Las haloperoxidasas se clasifican según su especificidad para iones de haluro. Las cloroperoxidasas (E.C. 1.11.1.10) catalizan la formación de hipoclorito a partir de iones de cloruro.

[0357] En una forma de realización, la haloperoxidasa de la invención es un cloroperoxidasa. Preferiblemente, la haloperoxidasa es una haloperoxidasa de vanadio, es decir, una haloperoxidasa que contiene vanadato. En un método preferido de la presente invención, la haloperoxidasa que contiene vanadato se combina con una fuente de iones de cloruro.

[0358] Las haloperoxidasas se han aislado a partir de muchos hongos diferentes, en particular del grupo fúngico dematiaceous hyphomycetes, tal como *Caldariomyces*, por ejemplo, *C. fumago, Alternaria, Curvularia*, por ejemplo, *C. verruculosa* y *C. inaequalis*, *Drechslera, Ulocladium* y *Botrytis*.

[0359] Las haloperoxidasas también se han aislado de bacterias tales como *Pseudomonas*, por ejemplo, *P. pyrrocinia* y *Streptomyces*, por ejemplo, *S. aureofaciens*.

[0360] En una forma de realización preferida, la haloperoxidasa es derivable de *Curvularia sp*., en particular *Curvularia verruculosa* o *Curvularia inaequalis*, tal como *C. inaequalis* CBS 102.42 como se describe en WO 95/27046; o *C. verruculosa* CBS 147.63 o *C. verruculosa* CBS 444.70 como se describe en WO 97/04102; o de *Drechslera hartlebii* como se describe en WO 01/79459, *Dendryphiella salina* como se describe en WO 01/79458, *Phaeotrichoconis crotalarie* como se describe en WO 01/79461, o *Geniculosporium sp*. como se describe en WO 01/79460.

[0361] Una oxidasa según la invención incluye, en particular, cualquier enzima lacasa comprendida por la clasificación de enzimas EC 1.10.3.2, o cualquier fragmento obtenido de la misma que exhibe actividad de lacasa, o un compuesto que exhibe una actividad similar, tal como una catecol oxidasa (EC 1.10.3.1), una o-aminofenol oxidasa (EC 1.10.3.4), o una bilirrubina oxidasa (EC 1.3.3.5).

[0362] Las enzimas de lacasa preferidas son las enzimas de origen microbiano. Las enzimas se pueden obtener de plantas, bacterias u hongos (incluidos hongos filamentosos y levaduras).

[0363] Ejemplos adecuados de hongos incluyen una lacasa derivable a partir de una cepa de *Aspergillus, Neurospora*, por ejemplo, *N. crassa, Podospora, Botrytis, Collybia, Fomes, Lentinus, Pleurotus, Trametes*, por ejemplo, *T. villosa y T. versicolor, Rhizoctonia*, por ejemplo, *R. solani, Coprinopsis*, por ejemplo, *C. cinerea, C. comatus, C. friesii, y C. plicatilis, Psathyrella*, por ejemplo, *P. condelleana, Panaeolus*, por ejemplo, *P. papilionaceus, Myceliophthora*, por ejemplo, *M. thermophila, Schyitalidium*, por ejemplo, *S. thermophilum, Polyporus*, por ejemplo, *P. pinsitus, Phlebia*, por ejemplo, *P. radiata* (WO 92/01046), o *Coriolus*, por ejemplo, *C. hirsutus* (JP 2238885).

[0364] Ejemplos adecuados de bacterias incluyen una lacasa derivable a partir de una cepa de *Bacillus*.

[0365] Se prefiere una lacasa obtenida de *Coprinopsis* o *Myceliophthora*; en particular una lacasa obtenida de *Coprinopsis cinerea*, como se describe en WO 97/08325; o de *Myceliophthora thermophila*, como se describe en WO 95/33836.

[0366] La(s) enzima(s) detergente(s) se puede(n) incluir en una composición detergente añadiendo aditivos separados que contienen una o más enzimas, o añadiendo un aditivo combinado que comprenda todas estas enzimas. Un aditivo detergente de la invención, es decir, un aditivo separado o un aditivo combinado, se puede formular, por ejemplo, como un granulado, líquido, suspensión, etc. Formulaciones de aditivo detergente preferidas son granulados, en particular granulados no pulverulentos, líquidos, en particular líquidos estabilizados, o suspensiones.

[0367] Los granulados no pulverulentos se pueden producir, por ejemplo, como se describe en US 4,106,991 y 4,661,452 y se pueden recubrir opcionalmente por métodos conocidos en la técnica. Ejemplos de materiales de recubrimiento cerosos son productos de poli(óxido de etileno) (polietilenglicol, PEG) con pesos molares medios

de 1000 a 20 000; nonilfenoles etoxilados que tienen de 16 a 50 unidades de óxido de etileno; alcoholes grasos etoxilados donde el alcohol contiene de 12 a 20 átomos de carbono y en el cual hay de 15 a 80 unidades de óxido de etileno; alcoholes grasos; ácidos grasos; y mono- y di- y triglicéridos de ácidos grasos. Ejemplos de materiales de recubrimiento filmógenos adecuados para la aplicación mediante técnicas de lecho fluido se dan en GB 1483591. Las preparaciones enzimáticas líquidas se pueden estabilizar, por ejemplo, añadiendo un poliol tal como propilenglicol, un azúcar o alcohol de azúcar, o inhibidores de ácido láctico o ácido bórico según métodos establecidos. Las enzimas protegidas se pueden preparar según el método descrito en EP 238,216.

Otros materiales

[0368] Cualquier componente detergente conocido en la técnica para el uso en detergentes también se puede utilizar. Otros componentes detergentes opcionales incluyen agentes anticorrosivos, agentes antiencogimiento, agentes antirredeposición de la suciedad, agentes antiarrugas, bactericidas, ligantes, inhibidores de la corrosión, agentes desintegrantes/de desintegración, tintes, estabilizadores enzimáticos (incluidos ácido bórico, boratos, CMC, y/o polioles tales como propilenglicol), acondicionadores de tejidos que incluyen arcillas, rellenos/auxiliares de tratamiento, agentes de blanqueamiento fluorescentes/abrillantadores ópticos, potenciadores de espuma, reguladores de espuma (jabonadura), perfumes, agentes suspensores de la suciedad, suavizantes, supresores de jabonadura, inhibidores de bronceamiento, y agentes de absorción, ya sean solos o combinados. Cualquier ingrediente conocido en la técnica para el uso en detergentes se puede utilizar. La elección de tales constituyentes está dentro de la habilidad del experto.

Dispersantes

[0369] Las composiciones detergentes de la presente invención también pueden contener dispersantes. En particular, los detergentes en polvo pueden comprender dispersantes. Los materiales orgánicos hidrosolubles adecuados incluyen los ácidos homo- o copoliméricos o sus sales, donde el ácido policarboxílico comprende al menos dos radicales carboxilo separados entre sí por no más de dos átomos de carbono. Los dispersantes adecuados se describen, por ejemplo, en Powdered Detergents, Surfactant science series, volumen 71, Marcel Dekker, Inc.

Agentes de inhibición de transferencia de tintes

[0370] Las composiciones detergentes de la presente invención también pueden incluir uno o más agentes de inhibición de transferencia de tintes. Los agentes inhibidores de transferencia de tintes poliméricos adecuados incluyen, pero de forma no limitativa, polímeros de polivinilpirrolidona, polímeros de *N*-óxido de poliamina, copolímeros de *N*-vinilpirrolidona y *N*-vinilimidazol, poliviniloxazolidonas y polivinilimidazoles o mezclas de los mismos. Cuando están presentes en una composición en cuestión, los agentes de inhibición de la transferencia de tintes pueden estar presentes en niveles de aproximadamente el 0,0001 % a aproximadamente el 10 %, de aproximadamente el 0,01 % a aproximadamente el 5 % o incluso de aproximadamente el 0,1 % a aproximadamente el 3 % en peso de la composición.

Agente de blanqueamiento fluorescente

[0371] Las composiciones detergentes de la presente invención preferiblemente también contendrán componentes adicionales que pueden teñir los artículos que se están limpiando, tales como agentes de blanqueamiento fluorescentes o abrillantadores ópticos. Cuando está presente, el abrillantador está preferiblemente en un nivel de aproximadamente el 0,01 % a aproximadamente el 0,5 %. Cualquier agente de blanqueamiento fluorescente adecuado para el uso en una composición detergente para la colada se puede utilizar en la composición de la presente invención. Los agentes blanqueadores fluorescentes usados más frecuentemente son aquellos pertenecientes a las clases de derivados de ácido diaminoestilbeno-sulfónico, derivados de diarilpirazolina y derivados de bisfenil-diestirilo. Ejemplos del tipo de derivado de ácido diaminoestilbeno-sulfónico de agentes blanqueadores fluorescentes incluyen las sales de sodio de: 4,4'-bis-(2-dietanolamino-4-anilino-s-triazin-6-ilamino) estilbeno-2,2'-disulfonato, 4,4'-bis-(2,4-dianilino-s-triazin-6-ilamino) estilbeno-2,2'-disulfonato, 4,4'-bis-(2-anilino-4-(*N*-metil-*N*-2-hidroxi-etilamino)-s-triazin-6-ilamino) estilbeno-2,2'-disulfonato, 4,4'-bis-(4-fenil-1,2,3-triazol-2-il)estilbeno-2,2'-disulfonato y 5-(2*H*-nafto[1,2-*d*][1,2,3]triazol-2-il)-2-[(*E*)-2-fenilvinil]bencenosulfonato de sodio. Los agentes blanqueadores fluorescentes preferidos son Tinopal DMS y Tinopal CBS disponibles de Ciba-Geigy AG, Basilea, Suiza. Tinopal DMS es la sal disódica de 4,4'-bis-(2-morfolino-4-anilino-s-triazin-6-ilamino) estilbeno-2,2'-disulfonato. Tinopal CBS es la sal disódica de 2,2'-bis-(fenil-estiril)-disulfonato. También es un agente de blanqueamiento fluorescente preferido el disponible comercialmente Parawhite KX, suministrado por Paramount Minerals and Chemicals, Bombay, India. Tinopal CBS-X es una sal disódica de 4.4'-bis-(sulfoestiril)-bifenilo también conocida como disulfonato disódico de diestirilbifenilo. Otros agentes fluorescentes adecuados para el uso en la invención incluyen las 1-3-diaril pirazolinas y las 7-alquilaminocumarinas.

[0372] Los niveles de abrillantadores fluorescentes adecuados incluyen niveles inferiores de aproximadamente el 0,01, del 0,05, de aproximadamente el 0,1 o incluso de aproximadamente el 0,2 % en peso en niveles superiores del 0,5 o incluso el 0,75 % en peso.

Polímeros de liberación de la suciedad

[0373] Las composiciones detergentes de la presente invención también pueden incluir uno o más polímeros de liberación de la suciedad que ayudan a la eliminación de la suciedad de tejidos tales como tejidos a base de algodón y poliéster, en particular la eliminación de la suciedad hidrofóbica de tejidos a base de poliéster. Los polímeros de liberación de la suciedad pueden ser, por ejemplo, polímeros a base de tereftalato no iónicos o aniónicos, polivinilcaprolactama y copolímeros relacionados, copolímeros de injerto de vinilo, poliamidas de poliéster, véase, por ejemplo, el capítulo 7 en Powdered Detergents, Surfactant science series volumen 71, Marcel Dekker, Inc. Otro tipo de polímeros de liberación de la suciedad son polímeros anfifílicos de limpieza de grasa alcoxilados que comprenden una estructura de núcleo y una pluralidad de grupos alcoxilato fijados a esa estructura de núcleo. La estructura de núcleo puede comprender una estructura de polialquilenimina o una estructura de polialcanolamina como se describe en detalle en WO 2009/087523 (que se incorpora en el presente documento por referencia). Además, los copolímeros de injerto aleatorio son polímeros adecuados de liberación de la suciedad. Los copolímeros de injerto adecuados se describen con más detalle en WO 2007/138054, WO 2006/108856 y WO 2006/113314 (que se incorporan en el presente documento por referencia). Otros polímeros de liberación de la suciedad son estructuras de polisacáridos sustituidos, especialmente estructuras celulósicas sustituidas tales como derivados de celulosa modificada tales como los descritos en EP 1867808 o WO 2003/040279 (que se incorporan en el presente documento por referencia). Los polímeros celulósicos adecuados incluyen celulosa, éteres de celulosa, ésteres de celulosa, amidas de celulosa y mezclas de los mismos. Los polímeros celulósicos adecuados incluyen celulosa modificada aniónicamente, celulosa modificada no iónicamente, celulosa modificada catiónicamente, celulosa modificada zwitteriónicamente, y mezclas de los mismos. Los polímeros celulósicos adecuados incluyen metilcelulosa, carboximetilcelulosa, etilcelulosa, hidroxiletilcelulosa, hidroxilpropilmetilcelulosa, éster de carboximetilcelulosa, y mezclas de los mismos.

Agentes antirredeposición

[0374] Las composiciones detergentes de la presente invención también pueden incluir uno o más agentes antirredeposición tales como carboximetilcelulosa (CMC), alcohol polivinílico (PVA), polivinilpirrolidona (PVP), polioxietileno y/o polietilenglicol (PEG), homopolímeros de ácido acrílico, copolímeros de ácido acrílico y ácido maleico, y polietileniminas etoxiladas. Los polímeros a base de celulosa descritos bajo polímeros de liberación de la suciedad anteriormente también pueden funcionar como agentes antirredeposición.

Modificadores de reología

[0375] Las composiciones detergentes de la presente invención también pueden incluir uno o más modificadores de reología, estructurantes o espesantes, diferentes de los agentes de reducción de la viscosidad. Los modificadores de reología se seleccionan del grupo que consiste en materiales hidroxifuncionales cristalinos no poliméricos, modificadores de reología poliméricos que imparten características de adelgazamiento por cizalladura a la matriz de una composición detergente líquida. La reología y la viscosidad del detergente se pueden modificar y ajustar por métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, como se muestra en EP 2169040.

[0376] Otros materiales adjuntos adecuados incluyen, pero de forma no limitativa, agentes antiencogimiento, agentes antiarrugas, bactericidas, ligantes, portadores, tintes, estabilizadores enzimáticos, suavizantes, rellenos, reguladores de espuma, hidrótropos, perfumes, pigmentos, supresores de jabonadura, solventes, y estructurantes para detergentes líquidos y/o agentes elastizantes de la estructura.

Formulación de productos detergentes

[0377] La composición detergente de la invención puede estar en cualquier forma conveniente, por ejemplo, una pastilla, un comprimido homogéneo, un comprimido que tiene dos o más estratos, una bolsa que tiene uno o más compartimentos, un polvo regular o compacto, un gránulo, una pasta, un gel, o un líquido regular compacto o concentrado.

[0378] Las bolsas se pueden configurar con un único compartimento o con múltiples compartimentos. Puede ser de cualquier forma, figura y material que sea adecuado para retener la composición, por ejemplo, sin permitir la liberación de la composición de la bolsa antes de entrar en contacto con el agua. La bolsa se hace de película hidrosoluble que incluye un volumen interno. Dicho volumen interno se puede dividir en compartimentos de la bolsa. Las películas preferidas son materiales poliméricos, preferiblemente polímeros que se forman en una película o lámina. Los polímeros, copolímeros o derivados de los mismos preferidos son poliacrilatos seleccionados, y copolímeros de acrilato hidrosolubles, metilcelulosa, carboximetilcelulosa, dextrina de sodio, etilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, malto dextrina, polimetacrilato, de la forma más

preferible copolímeros de alcohol polivinílico e hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC). Preferiblemente, el nivel de polímero en la película, por ejemplo, PVA, es de al menos aproximadamente el 60 %. El peso molecular medio preferido será típicamente de aproximadamente 20 000 a aproximadamente 150 000. Las películas también pueden ser de composiciones mezcladas que comprenden mezclas de polímeros degradables hidrolíticamente e hidrosolubles tales como poliláctido y alcohol polivinílico (conocido bajo la referencia comercial M8630 como se vende por MonoSol LLC, Indiana, EE.UU.) más plastificantes como glicerol, etilenglicerol, propilenglicol, sorbitol y mezclas de los mismos. Las bolsas pueden comprender una composición de limpieza para la colada sólida o componentes parciales y/o una composición de limpieza líquida o componentes parciales separados por la película hidrosoluble. El compartimento para componentes líquidos puede tener una composición diferente de la de los compartimentos que contienen sólidos: US2009/0011970 A1.

[0379] Los ingredientes detergentes se pueden separar físicamente entre ellos por compartimentos en bolsas disolubles en agua o en diferentes capas de comprimidos. Por lo tanto, se puede evitar la interacción de almacenamiento negativa entre los componentes. Diferentes perfiles de disolución de cada uno de los compartimentos también pueden dar lugar a disolución retardada de componentes seleccionados en la solución de lavado.

[0380] Un detergente líquido o en gel, que no se dosifica unitariamente, puede ser acuoso, y contiene típicamente al menos el 20 % en peso y hasta el 95 % de agua, tal como hasta aproximadamente el 70 % de agua, hasta aproximadamente el 65 % de agua, hasta aproximadamente el 55 % de agua, hasta aproximadamente el 45 % de agua, hasta aproximadamente el 35 % de agua. Otros tipos de líquidos, que incluyen, de forma no limitativa, alcanoles, aminas, dioles, éteres y polioles, se pueden incluir en un líquido o gel acuoso. Un detergente líquido o en gel acuoso puede contener del 0-30 % de solvente orgánico.

[0381] Un detergente líquido o en gel puede ser no acuoso.

Pastillas de jabón para la colada

[0382] La DNasa de la invención se puede adicionar a pastillas de jabón para la colada y usarse para la colada de lavado a mano, tejidos y/o textiles. El término pastilla de jabón para la colada incluye pastillas para la colada, pastillas de jabón, pastillas combo, pastillas de detergente sintético y pastillas de detergentes. Los tipos de pastilla normalmente difieren en el tipo de tensioactivo que contienen, y el término pastilla de jabón para la colada incluye aquellas que contienen jabones de ácidos grasos y/o jabones sintéticos. La pastilla de jabón para la colada tiene una forma física que es sólida y no un líquido, un gel o un polvo a temperatura ambiente. El término sólido se define como una forma física no que no cambia significativamente a lo largo del tiempo, es decir si un objeto sólido (por ejemplo, una pastilla de jabón para la colada) se coloca dentro de un contenedor, el objeto sólido no cambia para llenar el contenedor en el que se ha colocado. La pastilla es un sólido típicamente en la forma de barra, pero puede tener otras formas sólidas tales como circular u oval.

[0383] La pastilla de jabón para la colada puede contener una o más enzimas adicionales, inhibidores de proteasa tales como aldehídos peptídicos (o aducto de hidrosulfito o aducto hemiacetal), ácido bórico, borato, bórax y/o derivados de ácido fenilborónico tales como ácido 4-formilfenilborónico, uno o más jabones o tensioactivos sintéticos, polioles tales como glicerina, compuestos de control del pH tales como ácidos grasos, ácido cítrico, ácido acético y/o ácido fórmico, y/o una sal de un catión monovalente y un anión orgánico donde el catión monovalente puede ser, por ejemplo, Na^+, K^+ o NH_4^+ y el anión orgánico puede ser, por ejemplo, formiato, acetato, citrato o lactato de manera que la sal de un catión monovalente y un anión orgánico puede ser, por ejemplo, formiato de sodio.

[0384] La pastilla de jabón para la colada también puede contener agentes de formación de complejos como EDTA y HEDP, perfumes y/o diferentes tipos de rellenos, tensioactivos, por ejemplo, tensioactivos sintéticos aniónicos, adyuvantes, agentes de liberación de la suciedad poliméricos, quelantes detergentes, agentes estabilizantes, rellenos, tintes, colorantes, inhibidores de transferencia de tintes, policarbonatos alcoxilados, supresores de jabonadura, estructurantes, ligantes, agentes de lixiviación, activadores de blanqueo, agentes de eliminación de la suciedad arcillosa, agentes antirredeposición, agentes de dispersión poliméricos, abrillantadores, suavizantes de tejidos, perfumes y/o otros compuestos conocidos en la técnica.

[0385] La pastilla de jabón para la colada se puede procesar en un equipo de fabricación de pastillas de jabón para la colada convencional tal como, pero de forma no limitativa: mezcladores, compresores, p. ej., un compresor de vacío de doble fase, extrusores, cortadores, estampadores de logos, túneles de enfriamiento y empaquetadores. La invención no se limita a preparar las pastillas de jabón para la colada por cualquier método único. La premezcla de la invención se puede adicionar al jabón en diferentes etapas del proceso. Por ejemplo, se puede preparar la premezcla que contiene un jabón, DNasa, opcionalmente una o más enzimas adicionales, un inhibidor de proteasa, y una sal de un catión monovalente y un anión orgánico y la mezcla se comprime entonces. La DNasa y las enzimas adicionales opcionales se pueden adicionar al mismo tiempo que el inhibidor de proteasa, por ejemplo, en forma líquida. Además de la etapa de mezcla y la etapa de compresión, el proceso puede comprender además las etapas de fresado, extrusión, corte, estampado, enfriamiento y/o empaquetado.

Formulación de enzima en cogránulos

[0386] La DNasa se puede formular como un gránulo, por ejemplo, como un cogránulo que combina una o más enzimas. Cada enzima estará entonces presente en más gránulos asegurando una distribución más constante de las enzimas en el detergente. Esto también reduce la segregación física de diferentes enzimas debido a diferentes tamaños de partículas. Los métodos para producir cogranulados multienzimáticos para la industria de los detergentes se describen en la divulgación IP.com IPCOM000200739D.

[0387] Otro ejemplo de formulación de enzimas mediante el uso de cogranulados se describe en WO 2013/188331, que se refiere a una composición detergente que comprende (a) un cogránulo multienzimático; (b) menos del 10 % en peso de zeolita (base anhidra); y (c) menos del 10 % en peso de sal de fosfato (base anhidra), donde dicho cogránulo enzimático comprende del 10 al 98 % en peso de componente de reducción de la humedad y la composición comprende adicionalmente del 20 al 80 % en peso de componente de reducción de la humedad detergente. WO 2013/188331 también se refiere a un método de tratamiento y/o limpieza de una superficie, preferiblemente una superficie de tejido que incluye las etapas de (i) poner en contacto dicha superficie con la composición detergente como se reivindica y describe en este documento en una solución de lavado acuosa, (ii) enjuagar y/o secar la superficie.

[0388] El cogránulo multienzimático puede comprender una DNasa y (a) una o más enzimas seleccionadas del grupo que consiste en lipasas de primer lavado, celulasas de limpieza, xiloglucanasas, perhidrolasas, peroxidasas, lipoxigenasas, lacasas y mezclas de las mismas; y (b) una o más enzimas seleccionadas del grupo que consiste en hemicelulasas, proteasas, celulasas de cuidado, celobiosa deshidrogenasas, xilanasas, fosfo lipasas, esterasas, cutinasas, pectinasas, mananasas, pectato liasas, queratinasas, reductasas, oxidasas, fenoloxidasas, ligninasas, pululanasas, tanasas, pentosanasas, liquenasas glucanasas, arabinosidasas, hialuronidasa, condroitinasa, amilasas, y mezclas de las mismas.

[0389] La invención se resume adicionalmente en los siguientes párrafos:

1. Uso de un polipéptido que tiene actividad de DNasa para prevenir, reducir o eliminar una biopelícula de un artículo, donde el polipéptido se obtiene a partir de una fuente fúngica y el artículo es un textil.
2. Uso según el párrafo 1 para prevenir, reducir o eliminar la pegajosidad del artículo.
3. Uso según cualquiera de los párrafos 1 o 2 para pretratar las manchas en el artículo.
4. Uso según cualquiera de los párrafos 1-3 para prevenir, reducir o eliminar la redeposición de la suciedad durante un ciclo de lavado.
5. Uso según cualquiera de los párrafos 1-4 para prevenir, reducir o eliminar la adherencia de la suciedad al artículo.
6. Uso según cualquiera de los párrafos precedentes para mantener o mejorar la blancura del artículo.
7. Uso según cualquiera de los párrafos precedentes, donde el polipéptido es el polipéptido de los párrafos 47-56.
8. Uso según cualquiera de los párrafos precedentes, donde un mal olor se reduce o se elimina del artículo.
9. Uso según cualquiera de los párrafos precedentes, donde el mal olor está provocado por E-2-nonenal.
10. Uso según cualquiera de los párrafos precedentes, donde la cantidad de E-2-nonenal presente en un textil mojado se reduce o se elimina.
11. Uso según cualquiera de los párrafos precedentes, donde la cantidad de E-2-nonenal presente en un textil seco se reduce o se elimina.
12. Composición detergente que comprende un polipéptido que tiene actividad de desoxirribonucleasa (DNasa) y un ingrediente adjunto detergente, donde el polipéptido se obtiene a partir de una fuente fúngica.
13. Composición detergente según el párrafo 12, donde el polipéptido se obtiene de *Aspergillus*.
14. Composición detergente según cualquiera de los párrafos de composición precedentes, donde el polipéptido se obtiene de *Aspergillus oryzae*.
15. Composición detergente según cualquiera de los párrafos precedentes, donde el polipéptido es el polipéptido de los párrafos 47-56.
16. Composición detergente según cualquiera de los párrafos de composición precedentes, donde el ingrediente adjunto detergente se selecciona del grupo que consiste en tensioactivos, adyuvantes, auxiliares de floculación, agentes quelantes, inhibidores de transferencia de tintes, enzimas, estabilizadores enzimáticos, inhibidores enzimáticos, materiales catalíticos, activadores de blanqueo, peróxido de hidrógeno, fuentes de peróxido de hidrógeno, perácidos preformados, agentes de dispersión poliméricos, agentes de eliminación/antirredeposición de la suciedad arcillosa, abrillantadores, supresores de jabonadura, tintes, perfumes, agentes elastizantes de la estructura, suavizantes de tejidos, portadores, hidrótropos, adyuvantes y coadyuvantes, agentes de matizado de tejidos, agentes antiespumantes, dispersantes, auxiliares de procesamiento, y/o pigmentos.

17. Composición detergente según cualquiera de los párrafos de composición precedentes, donde la composición comprende además una o más enzimas seleccionadas del grupo que consiste en proteasas, lipasas, cutinasas, amilasas, carbohidrasas, celulasas, pectinasas, mananasas, arabinasas, galactanasas, xilanasas y oxidasas.

18. Composición detergente según cualquiera de los párrafos de composición precedentes, donde la enzima es una proteasa, que es de origen animal, vegetal o microbiano.

19. Composición detergente según cualquiera de los párrafos de composición precedentes, donde la proteasa se modifica químicamente o se diseña de proteína.

20. Composición detergente según cualquiera de los párrafos de composición precedentes, donde la proteasa es una serina proteasa o una metaloproteasa, preferiblemente una proteasa microbiana alcalina o una proteasa similar a la tripsina.

21. Composición detergente según cualquiera de los párrafos de composición precedentes, donde la proteasa se selecciona del grupo que consiste en *Bacillus*, por ejemplo, subtilisina Novo, subtilisina Carlsberg, subtilisina 309, subtilisina 147, subtilisina 168, tripsina de origen de bovino, tripsina de origen porcino y proteasa de *Fusarium*.

22. Composición detergente según cualquiera de los párrafos de composición precedentes, donde la proteasa tiene al menos el 90 %, tal como al menos el 95 %, de identidad de secuencia con la SEQ ID N.º: 10.

23. Composición detergente según cualquiera de los párrafos precedentes, donde la proteasa tiene al menos el 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º: 10 o una variante de la misma 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, preferiblemente la variante es una proteasa alcalina que tiene al menos el 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º: 10 con la sustitución siguiente: M222S o las sustituciones N76D+G195E.

24. Composición detergente según cualquiera de los párrafos de composición precedentes, donde la composición detergente es capaz de reducir la adhesión de las bacterias seleccionadas del grupo que consiste en *Acinetobacter sp., Aeromicrobium sp., Brevundimonas sp., Microbacterium sp., Micrococcus luteus, Pseudomonas sp., Staphylococcus epidermidis*, y *Stenotrophomonas sp.* a una superficie, o de liberar las bacterias de una superficie a la que se adhieren.

25. Composición detergente según cualquiera de los párrafos de composición precedentes, donde la superficie es una superficie textil.

26. Composición detergente según cualquiera de los párrafos de composición precedentes, donde el textil se hace de algodón, algodón/poliéster, poliéster, poliamida, poliacrilo y/o seda.

27. Composición detergente según cualquiera de los párrafos de composición precedentes, donde la composición es un comprimido, un comprimido homogéneo, un comprimido que tiene dos o más estratos, una bolsa que tiene uno o más compartimentos, un polvo regular o compacto, un gránulo, una pasta, un gel, o un líquido regular compacto o concentrado.

28. Composición detergente según cualquiera de los párrafos de composición precedentes, donde la composición es un detergente líquido, un detergente en polvo o un detergente granulado.

29. Un método de lavado para el lavado de un artículo que comprende las etapas de:

a. Exponer un artículo a una solución de lavado que comprende un polipéptido de los párrafos 47-56 o una composición detergente según cualquiera de los párrafos 12-28;
b. Completar al menos un ciclo de lavado; y
c. Opcionalmente enjuagar el artículo,

donde el artículo es un textil.

30. Método según el párrafo 28, donde el pH de la solución de lavado está en el rango de 1 a 11.

31. Método según cualquiera de los párrafos de método precedentes, donde el pH de la solución de lavado está en el rango de 5,5 a 11, tal como en el rango de 7 a 9, en el rango de 7 a 8 o en el rango de 7 a 8,5.

32. Método según cualquiera de los párrafos de método precedentes, donde la temperatura de la solución de lavado está en el rango de 5 °C a 95 °C, o en el rango de 10 °C a 80 °C, en el rango de 10 °C a 70 °C, en el rango de 10 °C a 60 °C, en el rango de 10° C a 50 °C, en el rango de 15 °C a 40 °C o en el rango de 20 °C a 30 °C.

33. Método según cualquiera de los párrafos de método precedentes, donde la temperatura de la solución de lavado es de 30 °C.

34. Método según cualquiera de los párrafos de método precedentes, donde el método comprende además el drenaje de la solución de lavado o de parte de la solución de lavado después de la finalización de un ciclo de lavado.

35. Método según cualquiera de los párrafos de método precedentes, donde el artículo se expone a la solución de lavado durante un primer y opcionalmente un segundo o un tercer ciclo de lavado.

36. Método según cualquiera de los párrafos de método precedentes, donde el artículo se enjuaga después de exponerse a la solución de lavado.

37. Método según cualquiera de los párrafos de método precedentes, donde el artículo se enjuaga con agua o con agua que comprende un acondicionador.
38. Método según cualquiera de los párrafos de método precedentes, donde la pegajosidad del artículo se reduce.
39. Método según cualquiera de los párrafos de método precedentes, donde las manchas presentes en el artículo se pretratan con un polipéptido de los párrafos 47-56 o una composición detergente según cualquiera de los párrafos 12-28.
40. Método según cualquiera de los párrafos de método precedentes, donde la redeposición de la suciedad se reduce.
41. Método según cualquiera de los párrafos de método precedentes, donde la adherencia de la suciedad al artículo se reduce o se elimina.
42. Método según cualquiera de los párrafos de método precedentes, donde la blancura del artículo se mantiene o se mejora.
43. Método según cualquiera de los párrafos de método precedentes, donde el mal olor se reduce o se elimina del artículo.

44. Método según cualquiera de los párrafos de método precedentes, donde el mal olor está provocado por E-2-nonenal.
45. Método según cualquiera de los párrafos de método precedentes, donde la cantidad de E-2-nonenal presente en un textil mojado o seco se reduce o se elimina.
46. Método según cualquiera de los párrafos de método precedentes, donde la concentración del polipéptido en la solución de lavado es de al menos 1 mg de proteína de DNasa, tal como al menos 5 mg de proteína, preferiblemente de al menos 10 mg de proteína, más preferiblemente de al menos 15 mg de proteína, aún más preferiblemente de al menos 20 mg de proteína, de la forma más preferible de al menos 30 mg de proteína, e incluso de la forma más preferible de al menos 40 mg de proteína por litro de solución de lavado.
47. Un polipéptido que tiene actividad de DNasa, seleccionado del grupo que consiste en:

a. un polipéptido que tiene al menos el 60 % de identidad de secuencia con el polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 2 o un polipéptido que tiene al menos el 60 % identidad de secuencia con el polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 9;
b. un polipéptido codificado por un polinucleótido que hibrida bajo condiciones de baja astringencia con

i. la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 1,
ii. la secuencia de ADNc del mismo, o
iii. el complemento en toda su longitud de (i) o (ii);

c. un polipéptido codificado por un polinucleótido que tiene al menos el 60 % de identidad de secuencia con la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 1 o la secuencia de ADNc del mismo;
d. Una variante del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 2 que comprende una sustitución, eliminación, y/o inserción en una o más posiciones o una variante del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 9 que comprende una sustitución, eliminación, y/o inserción en una o más posiciones; y
e. Un fragmento del polipéptido de (a), (b), (c), o (d) que tiene actividad de DNasa;

48. El polipéptido del párrafo 47, que tiene al menos el 60 %, al menos el 65 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % o el 100 % de identidad de secuencia con el polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 2 o al polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 9.
49. El polipéptido según el párrafo 47 o 48, que se codifica por un polinucleótido que hibrida bajo condiciones de baja astringencia, condiciones de baja-media astringencia, condiciones de media astringencia, condiciones de media-alta astringencia, condiciones de alta astringencia, o condiciones de muy alta astringencia con

i. la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 1,
ii. la secuencia de ADNc del mismo, o
iii. el complemento en toda su longitud de (i) o (ii).

50. El polipéptido según cualquiera de los párrafos 47-49, que se codifica por un polinucleótido que tiene al menos el 60 %, al menos el 65 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % o el

100 % de identidad de secuencia con la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 1 o la secuencia de ADNc del mismo.

51. El polipéptido según cualquiera de los párrafos 47-50, que comprende o consiste en la SEQ ID N.º: 2 o el polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 2.

52. El polipéptido según cualquiera de los párrafos 47-50, que comprende o consiste en la SEQ ID N.º: 9 o el polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 9.

53. El polipéptido según el párrafo 51, donde el polipéptido maduro son los aminoácidos 1 a 206 de SEQ ID N.º: 2.

54. El polipéptido según el párrafo 52, donde el polipéptido maduro son los aminoácidos 1 a 204 de la SEQ ID N.º: 9.

55. El polipéptido según cualquiera de los párrafos 47-56, que es una variante del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 2 que comprende una sustitución, eliminación, y/o inserción en una o más posiciones o una variante del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 9 que comprende una sustitución, eliminación, y/o inserción en una o más posiciones.

56. El polipéptido según el párrafo 55, que es un fragmento de la SEQ ID N.º: 2, donde el fragmento tiene actividad de DNasa o un fragmento de la SEQ ID N.º: 9, donde el fragmento tiene actividad de DNasa.

57. Un polinucleótido que codifica el polipéptido según cualquiera de los párrafos 47-56.

58. Un constructo de ácido nucleico o vector de expresión que comprende el polinucleótido del párrafo 57 operativamente enlazado a una o más secuencias de control que dirigen la producción del polipéptido en un huésped de expresión.

59. Una célula huésped recombinante que comprende el polinucleótido del párrafo 57-58 operativamente enlazado a una o más secuencias de control que dirigen la producción del polipéptido.

60. Un método para producir el polipéptido de cualquiera de los párrafos 47-56, que comprende el cultivo de una célula, que en su forma de tipo salvaje produce el polipéptido, bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido.

61. El método del párrafo 60, que comprende además la recuperación del polipéptido.

62. Un método para producir un polipéptido con actividad de DNasa, que comprende el cultivo de la célula huésped del párrafo 59 bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido.

63. El método del párrafo 62, que comprende además la recuperación del polipéptido.

64. Un polinucleótido que codifica un péptido señal que comprende o consiste en los aminoácidos -37 a -1 de la SEQ ID N.º: 2.

65. El polinucleótido según la reivindicación 64, que comprende además un polinucleótido que codifica un propéptido que comprende o consiste en los aminoácidos -15 a -1 de la SEQ ID N.º: 2

66. Un constructo de ácido nucleico o vector de expresión que comprende un gen que codifica una proteína operativamente enlazada al polinucleótido del párrafo 65, donde el gen es foráneo al polinucleótido que codifica el péptido señal.

67. Una célula huésped recombinante que comprende un gen que codifica una proteína operativamente enlazada al polinucleótido del párrafo 65, donde el gen es foráneo al polinucleótido que codifica el péptido señal.

68. Un método para producir una proteína, que comprende el cultivo de una célula huésped recombinante que comprende un gen que codifica una proteína operativamente enlazada al polinucleótido del párrafo 64, donde el gen es foráneo al polinucleótido que codifica el péptido señal, bajo condiciones propicias para la producción de la proteína.

69. El método del párrafo 67, que comprende además la recuperación de la proteína.

70. Un polinucleótido aislado que codifica un propéptido que comprende o consiste en los aminoácidos -15 a -1 de la SEQ ID N.º: 2.

71. Un constructo de ácidos nucleicos o vector de expresión que comprende un gen que codifica una proteína operativamente enlazada al polinucleótido del párrafo 64, donde el gen es foráneo al polinucleótido que codifica el propéptido.

72. Una célula huésped recombinante que comprende un gen que codifica una proteína operativamente enlazada al polinucleótido del párrafo 64, donde el gen es foráneo al polinucleótido que codifica el propéptido.

73. Un método para producir una proteína, que comprende el cultivo de la célula huésped recombinante que comprende un gen que codifica una proteína operativamente enlazada al polinucleótido del párrafo 62, donde el gen es foráneo al polinucleótido que codifica el propéptido, bajo condiciones propicias para la producción de la proteína.

74. El método del párrafo 73, que comprende además la recuperación de la proteína.

75. Una formulación de caldo completo o composición de cultivo celular que comprende un polipéptido de cualquiera de los párrafos 47-56.

76. Artículo lavado según el método de cualquiera de los párrafos 29-46.

77. Una composición farmacéutica que comprende un polipéptido que tiene actividad de DNasa y un ingrediente adjunto farmacéutico, donde el polipéptido se obtiene a partir de una fuente fúngica.

78. Composición farmacéutica según el párrafo 77, donde el polipéptido que tiene actividad de DNasa se obtiene de *Aspergillus*.

79. Composición farmacéutica según cualquiera de los párrafos 77-78, donde el polipéptido que tiene actividad de DNasa se obtiene de *Aspergillus oryzae*.

80. Composición farmacéutica según cualquiera de los párrafos 77-79, donde el polipéptido es el polipéptido de los párrafos 47-56.

81. Composición farmacéutica según cualquiera de los párrafos 77-80, donde la composición se formula como una pasta dental, un dentífrico líquido, un enjuague bucal, un comprimido o una pomada de masaje gingival.

82. Composición farmacéutica según cualquiera de los párrafos 77-81, que comprende además uno o más de un compuesto antimicrobiano, tal como un compuesto antibacteriano, un compuesto antiparasitario, un compuesto antifúngico y un compuesto antivírico.

83. Un dispositivo médico permanente caracterizado por el hecho de que al menos una porción de una superficie que entra en contacto con el paciente de dicho dispositivo se recubre con la composición farmacéutica de cualquiera de los párrafos 77-83.

84. El dispositivo según el párrafo 83 donde dicho dispositivo es un catéter tal como un catéter venoso central, catéter intravascular, catéter urinario, catéter de Hickman, catéter de diálisis peritoneal, catéter endrotraqueal, o donde el dispositivo es una válvula cardíaca mecánica, un marcapasos cardíaco, un conector arteriovenoso, un cierre esclerótico, una prótesis de articulación, un tubo de timpanostomía, un tubo de traqueotomía, una prótesis de voz, una prótesis de pene, un esfínter urinario artificial, un cabestrillo pubovaginal sintético, una sutura quirúrgica, un anclaje óseo, un tornillo óseo, una lente intraocular, una lente de contacto, un dispositivo intrauterino, un injerto aortofemoral, un injerto vascular, una aguja, un conector Luer-Lok, un conector sin aguja o un instrumento quirúrgico.

85. Un método para producir el polipéptido de cualquiera de los párrafos 47-56, que comprende el cultivo de la célula huésped del párrafo 59 bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido.

86. El método del párrafo 85, que comprende además la recuperación del polipéptido.

87. La célula huésped recombinante del párrafo 59 que comprende además un polinucleótido que codifica un segundo polipéptido de interés; preferiblemente una enzima de interés; más preferiblemente una enzima segregada de interés; aún más preferiblemente una hidrolasa, isomerasa, ligasa, liasa, oxidorreductasa, o una transferasa; y de la forma más preferible la enzima segregada es una alfa-galactosidasa, alfa-glucosidasa, aminopeptidasa, amilasa, asparaginasa, beta-galactosidasa, beta-glucosidasa, beta-xilosidasa, carbohidrasa, carboxipeptidasa, catalasa, celobiohidrolasa, celulasa, quitinasa, cutinasa, ciclodextrina glicosiltransferasa, desoxirribonucleasa, endoglucanasa, esterasa, proteína verde fluorescente, glucano-transferasa, glucoamilasa, invertasa, lacasa, lipasa, manosidasa, mutanasa, oxidasa, enzima pectinolítica, peroxidasa, fitasa, polifenoloxidasa, enzima proteolítica, ribonucleasa, transglutaminasa, o una xilanasa.

88. La célula huésped recombinante del párrafo 87, donde el segundo polipéptido de interés es heterólogo u homólogo a la célula huésped.

89. La célula huésped recombinante del párrafo 87 o 88, que es una célula huésped fúngica; preferiblemente una célula huésped fúngica filamentosa; más preferiblemente una célula de *Acremonium, Aspergillus, Aureobasidium, Bjerkandera, Ceriporiopsis, Chrysosporium, Coprinus, Coriolus, Cryptococcus, Filibasidium, Fusarium, Humicola, Magnaporthe, Mucor, Myceliophthora, Neocallimastix, Neurospora, Paecilomyces, Penicillium, Phanerochaete, Phlebia, Piromyces, Pleurotus, Schizophyllum, Talaromyces, Thermoascus, Thielavia, Tolypocladium, Trametes, o Trichoderma; de la forma más preferible una célula de Aspergillus awamori, Aspergillus foetidus, Aspergillus fumigatus, Aspergillus japonicus, Aspergillus nidulans, Aspergillus niger, Aspergillus oryzae, Bjerkandera adusta, Ceriporiopsis aneirina, Ceriporiopsis caregiea, Ceriporiopsis gilvescens, Ceriporiopsis pannocinta, Ceriporiopsis rivulosa, Ceriporiopsis subrufa, Ceriporiopsis subvermispora, Chrysosporium inops, Chrysosporium keratinophilum, Chrysosporium lucknowense, Chrysosporium merdarium, Chrysosporium pannicola, Chrysosporium queenslandicum, Chrysosporium tropicum, Chrysosporium zonatum, Coprinus cinereus, Coriolus hirsutus, Fusarium bactridioides, Fusarium cerealis, Fusarium crookwellense, Fusarium culmorum, Fusarium graminearum, Fusarium graminum, Fusarium heterosporum, Fusarium negundi, Fusarium oxysporum, Fusarium reticulatum, Fusarium roseum, Fusarium sambucinum, Fusarium sarcochroum, Fusarium sporotrichioides, Fusarium sulphureum, Fusarium torulosum, Fusarium trichothecioides, Fusarium venenatum, Humicola insolens, Humicola lanuginosa, Mucor miehei, Myceliophthora thermophila, Neurospora crassa, Penicillium purpurogenum, Phanerochaete chrysosporium, Phlebia radiata, Pleurotus eryngii, Thielavia terrestris, Trametes villosa, Trametes versicolor, Trichoderma harzianum, Trichoderma koningii, Trichoderma longibrachiatum, Trichoderma reesei,* o *Trichoderma viride*.

90. La célula huésped recombinante del párrafo 87 o 88, que es una célula huésped bacteriana; preferiblemente una célula huésped procariótica; más preferiblemente una célula huésped grampositiva; aún más preferiblemente una célula huésped de *Bacillus, Clostridium, Enterococcus, Geobacillus, Lactobacillus, Lactococcus, Oceanobacillus, Staphylococcus, Streptococcus,* o *Streptomyces*; y de la forma más preferible una célula huésped de *Bacillus alkalophilus, Bacillus amyloliquefaciens, Bacillus brevis, Bacillus circulans, Bacillus clausii, Bacillus coagulans, Bacillus firmus, Bacillus lautus, Bacillus lentus, Bacillus licheniformis, Bacillus megaterium, Bacillus pumilus, Bacillus stearothermophilus, Bacillus subtilis*, y *Bacillus thuringiensis*.

91. Un método para producir el segundo polipéptido de interés tal y como se define en cualquiera de los párrafos 87-88, que comprende el cultivo de la célula huésped de cualquiera de los párrafos 87-90 bajo condiciones propicias para la producción del segundo polipéptido de interés.

92. El método del párrafo 91, que comprende además la recuperación del segundo polipéptido de interés.

93. Composición detergente según cualquiera de los párrafos de composición precedentes, donde el ingrediente adjunto detergente es un tensioactivo.

94. Composición detergente según cualquiera de los párrafos de composición precedentes, donde el ingrediente adjunto detergente es un adyuvante.

95. Composición detergente según cualquiera de los párrafos de composición precedentes, donde el ingrediente adjunto detergente es un agente de eliminación/antirredeposición de la suciedad arcillosa.

96. Composición detergente según los párrafos 28, donde la composición es una composición detergente líquida, que comprende un tensioactivo y un adyuvante de detergente en una concentración total de al menos el 3 % en peso, y una microcápsula que contiene enzima detergente, donde la membrana de la microcápsula se produce por reticulación de una poliamina polirramificada con un peso molecular de más de 1 kDa.

97. Composición detergente según los párrafos 96, donde los grupos amino reactivos de la poliamina polirramificada constituyen al menos el 15 % del peso molecular.

98. Composición detergente según cualquiera de los párrafos 96-97, donde la microcápsula se produce usando un cloruro de ácido como agente de reticulación.

99. Composición detergente según cualquiera de los párrafos 96-98, donde el diámetro de la microcápsula es de al menos, o superior a, 50 micrómetros.

100. Composición detergente según cualquiera de los párrafos 96-99, donde la microcápsula contiene al menos el 1 % en peso de enzima activa.

101. Composición detergente según cualquiera de los párrafos 96-100, que además incluye un alcohol, tal como un poliol.

102. Composición detergente según cualquiera de los párrafos 96-101, donde el tensioactivo es un tensioactivo aniónico.

103. Composición detergente según cualquiera de los párrafos 96-102, que es una composición para la colada líquida.

104. Composición detergente según cualquiera de los párrafos 96-103, que contiene menos del 90 % en peso de agua.

105. Composición detergente según cualquiera de los párrafos 96-104, donde la enzima detergente es un polipéptido que tiene actividad de DNasa, proteasa, amilasa, lipasa, celulasa, mananasa, pectinasa, u oxidorreductasa.

106. Composición detergente según cualquiera de los párrafos 96-105, donde la proteasa es una metaloproteasa o una serina proteasa alcalina, tal como una subtilisina.

107. Composición detergente según cualquiera de los párrafos 96-105, donde el polipéptido que tiene actividad de DNasa es el polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 47-54.

108. Composición detergente según cualquiera de los párrafos 96-107, donde la microcápsula se produce por polimerización interfacial utilizando un cloruro de ácido como agente de reticulación.

109. Composición detergente según cualquiera de los párrafos 96-108, donde la poliamina polirramificada es una polietilenimina.

110. Composición detergente según cualquiera de los párrafos 96-109, donde la microcápsula comprende una fuente de iones Mg2+, Ca2+, o Zn2+, tales como una sal escasamente soluble de Mg2+, Ca2+, o Zn2+.

Ensayos y composiciones detergentes

Composiciones detergentes

[0390] La composición detergente mencionada a continuación se puede usar en combinación con la enzima de la invención.

Biotex Black (líquido)

[0391] 5-15 % de tensioactivos aniónicos, < 5 % de tensioactivos no iónicos, perfume, enzimas, DMDM e hidantoína.

Composición de Ariel Sensitive White & Color, composición detergente líquida

[0392] Agua, alcohol etoxi sulfato, alcohol etoxilado, óxido de amino, ácido cítrico, ácido graso de semilla de palma coronada C12-18, proteasa, glicosidasa, amilasa, etanol, 1,2 propanodiol, formiato de sodio, cloruro de calcio, hidróxido de sodio, emulsión de silicona, EHDQ trans-sulfatado (los ingredientes se enumeran en orden descendiente).

Composición detergente modelo WFK IEC-A (polvo)

[0393] Ingredientes: 8,8 % de sulfonato de alquilbenceno de sodio lineal, 4,7 % de alcohol graso etoxilado C12-18 (7 EO), 3,2 % de jabón de sodio, 3,9 % de antiespumante DC2-4248S, 28,3 % de zeolita 4A de silicato de aluminio de sodio, 11,6 % de carbonato de sodio, 2,4 % de sal de sodio de un copolímero de ácido maleico y acrílico (Sokalan CP5), 3,0 % de silicato de sodio, 1,2 % de carboximetilcelulosa, 2,8 % de Dequest 2066, 0,2 % de blanqueador óptico, 6,5 % de sulfato de sodio, 0,4 % de proteasa.

Composición detergente modelo A (líquido)

[0394] Ingredientes: 12 % de LAS, 11 % de AEO Biosoft N25-7 (NI), 7 % de AEOS (SLES), 6 % de MPG (monopropilenglicol), 3 % de etanol, 3 % de TEA, 2,75 % de jabón de cacao, 2,75 % jabón de soja, 2 % de glicerol, 2 % de hidróxido de sodio, 2 % de citrato de sodio, 1 % de formiato de sodio, 0,2 % de DTMPA y 0,2 % de PCA (todos los porcentajes son p/p)

Composición de Ariel Actilift (líquido)

[0395] Ingredientes: 5-15 % de tensioactivos aniónicos; < 5 % de tensioactivos no iónicos, fosfonatos, jabón; enzimas, abrillantadores ópticos, benzisotiazolinona, metilisotiazolinona, perfumes, alfa-isometil ionona, citronelol, geraniol, linalool.

Composición de Ariel Actilift Colour & Style (líquido)

[0396] Ingredientes: 5-15 % de tensioactivos aniónicos; < 5 % de tensioactivos no iónicos, fosfonatos, jabón; enzimas, perfumes, benzisotiazolinona, metilisotiazolinona, alfa-isometill ionona, butilfenil metilpropional, citronelol, geraniol, linalool.

Composición de Persil Small & Mighty (líquido)

[0397] Ingredientes: 15-30 % de tensioactivos aniónicos, tensioactivos no iónicos, 5-15 % de jabón, < 5 % de policarboxilatos, perfume, fosfatos, abrillantadores ópticos

Persil 2 in 1 with Comfort Passion Flower Powder

[0398] Sulfato de sodio, carbonato de sodio, dodecilbencenosulfonato de sodio, bentonita, peróxido de carbonato de sodio, silicato de sodio, zeolita, agua, ácido cítrico, TAED, C12-15 Pareth-7, ácido esteárico, perfume, ácido acrílico de sodio/copolímero MA, goma de celulosa, almidón de maíz modificado, cloruro de sodio, etidronato de tetrasodio, EDTMP de sodio de calcio, anilinomorfolinotriacinilaminoestilbenosulfonato de disodio, bicarbonato de sodio, fenilpropil etil meticona, butilfenil metilpropional, estearatos de glicerilo, carbonato de calcio, poliacrilato de sodio, alfa-isometil ionona, diestirilbifenil disulfonato de disodio, celulosa, proteasa, limoneno, PEG-75, dióxido de titanio, dextrina, sacarosa, poliaril sulfonato de sodio, Cl 12490, Cl 45100, Cl 42090, tiosulfato de sodio, Cl 61585.

Polvo biológico Persil

[0399] Sacarosa, sorbitol, silicato de aluminio, polioximetileno melamina, poliaril sulfonato de sodio, Cl 61585, Cl 45100, lipasa, amilasa, goma xantana, hidroxipropilmetilcelulosa, Cl 12490, diestirilbifenil disulfonato de disodio, tiosulfato de sodio, Cl 42090, mananasa, Cl 11680, ácido etidrónico, Tetrasodio EDTA.

Comprimidos biológicos Persil

[0400] Carbonato de sodio, peróxido de carbonato de sodio, bicarbonato de sodio, zeolita, agua, silicato de sodio, lauril sulfato de sodio, celulosa, TAED, dodecilbencenosulfonato de sodio, hemicelulosa, lignina, lauril glucósido, ácido acrílico de sodio/copolímero MA, bentonita, cloruro de sodio, perfume, etidronato de tetrasodio, sulfato de sodio, poliacrilato de sodio, dimeticona, anilinomorfolinotriazinilaminoestilbenosulfonato de disodio, ácido dodecilbenceno sulfónico, trimetilsiloxisilicato, carbonato de calcio, celulosa, PEG-75, dióxido de titanio, dextrina, proteasa, almidón de maíz modificado, sacarosa, Cl 12490, poliaril sulfonato de sodio, tiosulfato de sodio, amilasa, caolín,

Polvo biológico Persil Colour Care

[0401] Subtilisina, imidazolidinona, hexil cinamal, sacarosa, sorbitol, silicato de aluminio, polioximetileno melamina, Cl 61585, Cl 45100, lipasa, amilasa, goma xantana, hidroxipropilmetilcelulosa, Cl 12490, diestirilbifenil disulfonato de disodio, tiosulfato de sodio, Cl 42090, mananasa, Cl 11680, ácido etidrónico, Tetrasodio EDTA.

Comprimidos biológicos Persil Colour Care

[0402] Bicarbonato de sodio, carbonato de sodio, zeolita, agua, silicato de sodio, lauril sulfato de sodio, goma de celulosa, dodecilbencenosulfonato de sodio, lauril glucósido, cloruro de sodio, ácido acrílico de sodio/copolímero MA, perfume, tioglicolato de sodio, PVP, sulfato de sodio, etidronato de tetrasodio, poliacrilato de sodio, dimeticona, bentonita, ácido dodecilbenceno sulfónico, trimetilsiloxisilicato, carbonato de calcio, celulosa, PEG-75, dióxido de titanio, dextrina, proteasa, almidón de maíz modificado, sacarosa, tiosulfato de sodio, amilasa, Cl 74160, caolín.

Persil Dual Action Capsules Bio

[0403] MEA-dodecilbencenosulfonato, cocoato de MEA-hidrogenado, C12-15 Pareth-7, dipropilenglicol, agua, etidronato de tetrasodio, alcohol polivinílico, glicerina, aziridina, homopolímero etoxilado, propilenglicol, perfume, dietilentriamina de pentametileno fosfonato de sodio, sorbitol, MEA-sulfato, etanolamina, subtilisina, glicol, butilfenil metilpropional, ácido borónico, (4-formilfenil), hexil cinamal, limoneno, linalool, diestirilbifenil disulfonato de disodio, alfa-isometil ionona, geraniol, amilasa, colorante azul polimérico, colorante amarillo polimérico, talco, cloruro de sodio, benzisotiazolinona, mananasa, benzoato de denatonio.

Persil 2 in 1 with Comfort Sunshiny Days Powder

[0404] Sulfato de sodio, carbonato de sodio, dodecilbencenosulfonato de sodio, bentonita, peróxido de carbonato de sodio, silicato de sodio, zeolita, agua, ácido cítrico, TAED, C12-15 Pareth-7, perfume, ácido esteárico, ácido acrílico de sodio/copolímero MA, goma de celulosa, almidón de maíz modificado, cloruro de sodio, etidronato de tetrasodio, EDTMP de sodio de calcio, anilinomorfolinotriazinilaminoestilbenosulfonato de disodio, bicarbonato de sodio, fenilpropil etil meticona, butilfenil metilpropional, estearatos de glicerilo, carbonato de calcio, poliacrilato de sodio, geraniol, diestirilbifenil disulfonato de disodio, celulosa, proteasa, PEG-75, dióxido de titanio, dextrina, sacarosa, poliaril sulfonato de sodio, Cl 12490, Cl 45100, Cl 42090, tiosulfato de sodio, Cl 61585.

Persil Small & Mighty 2 in 1 with Comfort Sunshiny Days

[0405] Agua, C12-15 Pareth-7, dodecilbencenosulfonato de sodio, propilenglicol, cocoato hidrogenado de sodio, trietanolamina, glicerina, cocoato de TEA hidrogenado, perfume, cloruro de sodio, poliquaternium-10, PVP, colorante rosa polimérico, sulfato de sodio, diestirilbifenil disulfonato de disodio, butilfenil metilpropional, copolímero de estireno/acrilatos, hexil cinamal, citronelol, eugenol, alcohol polivinílico, acetato de sodio, alcohol isopropílico, colorante amarillo polimérico, lauril sulfato de sodio.

Persil Small & Mighty Bio

[0406] Agua, MEA-dodecilbencenosulfonato, propilenglicol, laureth sulfato de sodio, C12-15 Pareth-7, cocoato de TEA hidrogenado, MEA-citrato, homopolímero de aziridina etoxilado, MEA-etidronato, trietanolamina, perfume, copolímero de acrilatos, sorbitol, MEA-sulfato, sulfito de sodio, diestirilbifenil disulfonato de disodio, butilfenil metilpropional, copolímero de estireno/acrilatos, citronelol, sulfato de sodio, péptidos, sales, azúcares de fermentación (proceso), subtilisina, glicerina, ácido borónico, (4-formilfenil), geraniol, pectato liasa, amilasa, lauril sulfato de sodio, mananasa, Cl 42051.

Persil Small & Mighty Capsules Biological

[0407] MEA-dodecilbencenosulfonato, cocoato de MEA-hidrogenado, C12-15 Pareth-7, dipropilenglicol, agua, glicerina, alcohol polivinílico, perfume, homopolímero de aziridina etoxilado, dietilentriamina pentametileno fosfonato de sodio, propilenglicol, sorbitol, MEA-sulfato, etanolamina, subtilisina, glicol, butilfenil metilpropional, hexil cinamal, almidón, ácido borónico, (4-formilfenil), limoneno, linalool, diestirilbifenil disulfonato de disodio, alfa-isometil ionona, geraniol, amilasa, talco, colorante azul polimérico, cloruro de sodio, benzisotiazolinona, benzoato de denatonio, colorante amarillo polimérico, mananasa.

Persil Small & Mighty Capsules Colour Care

[0408] MEA-dodecilbencenosulfonato, cocoato de MEA-hidrogenado, C12-15 Pareth-7, dipropilenglicol, agua, glicerina, alcohol polivinílico, perfume, homopolímero de aziridina etoxilado, dietilentriamina pentametileno fosfonato de sodio, propilenglicol, MEA-sulfato, etanolamina, PVP, sorbitol, butilfenil metilpropional, subtilisina, hexil cinamal, almidón, limoneno, linalool, ácido borónico, (4-formilfenil), alfa-isometil ionona, geraniol, talco, colorante azul polimérico, benzoato de denatonio, colorante amarillo polimérico.

Persil Small & Mighty Colour Care

[0409] Agua, MEA-dodecilbencenosulfonato, propilenglicol, laureth sulfato de sodio, C12-15 Pareth-7, cocoato de TEA hidrogenado, MEA-citrato, homopolímero de aziridina etoxilado, MEA-etidronato, trietanolamina, perfume, copolímero de acrilatos, sorbitol, MEA-sulfato, sulfito de sodio, glicerina, butilfenil metilpropional, citronelol, sulfato de sodio, péptidos, sales, azúcares de fermentación (proceso), copolímero de estireno/acrilatos,

subtilisina, ácido borónico, (4-formilfenil), geraniol, pectato liasa, amilasa, lauril sulfato de sodio, mananasa, Cl 61585, Cl 45100.

Composición de Fairy Non Bio (líquido)

[0410] Ingredientes: 15-30 % de tensioactivos aniónicos, 5-15 % de tensioactivos no iónicos, jabón, benzisotiazolinona, metilisotiazolinona, perfumes

Composición detergente modelo T (polvo)

[0411] Ingredientes: 11 % de LAS, 2 % de AS/AEOS, 2 % de jabón, 3 % de AEO, 15,15 % de carbonato de sodio, 3 % de silicato de sodio, 18,75 % de zeolita, 0,15 % de quelante, 2 % de citrato de sodio, 1,65 % de copolímero AA/MA, 2,5 % de CMC y 0,5 % de SRP (todos los porcentajes son p/p).

Composición detergente de modelo X (polvo)

[0412] Ingredientes: 16,5 % de LAS, 15 % de zeolita, 12 % de disilicato de sodio, 20 % de carbonato de sodio, 1 % de sokalan, 35,5 % de sulfato de sodio (todos los porcentajes son p/p).

Composición de Ariel Actilift Colour & Style (polvo)

[0413] Ingredientes: 15-30 % de tensioactivos aniónicos, < 5 % de tensioactivos no iónicos, fosfonatos, policarboxilatos, zeolitas; enzimas, Perfumes, hexil cinamal.

Composición de Ariel Actilift (polvo)

[0414] Ingredientes: 5-15 % de tensioactivos aniónicos, agentes blanqueadores basados en oxígeno, < 5 % de tensioactivos no iónicos, fosfonatos, policarboxilatos, zeolitas, abrillantadores ópticos, enzimas, perfumes, butilfenil metilpropional, cumarina, hexil cinamal

Composición de Persil Megaperls (polvo)

[0415] Ingredientes: 15 - 30 % de los siguientes: tensioactivos aniónicos, agente blanqueador basado en oxígeno y zeolitas, menos del 5 % de los siguientes: tensioactivos no iónicos, fosfonatos, policarboxilatos, jabón. Ingredientes adicionales: perfumes, hexil cinamal, salicilato de bencilo, linalool, abrillantadores ópticos, enzimas y citronelol.

Gain Liquid, Original:

[0416] Ingredientes: agua, alcohol etoxisulfato, dietilenglicol, alcohol etoxilado, etanolamina, sulfonato de alquilbenceno lineal, ácidos grasos de sodio, polietilenimina etoxilada, ácido cítrico, bórax, cumeno sulfonato de sodio, propilenglicol, DTPA, diaminoestilbeno disulfonato de disodio, dipropiletill tetramina, hidróxido de sodio, formiato de sodio, formiato de calcio, dimeticona, amilasa, proteasa, Liquitint™, aceite de ricino hidrogenado, fragancia

Tide Liquid, Original:

[0417] Ingredientes: sulfonato de alquilbenceno lineal, propilenglicol, ácido cítrico, hidróxido de sodio, bórax, etanolamina, etanol, sulfato de alcohol, polietilenimina etoxilada, ácidos grasos de sodio, etoxisulfato de diquaternium, proteasa, dietilenglicol, laureth-9, óxido de alquildimetilamina, fragancia, amilasa, diaminoestilbeno disulfonato de disodio, DTPA, formiato de sodio, formiato de calcio, polietilenglicol 4000, mananasa, Liquitint™ Blue, dimeticona.

Liquid Tide, Free and Gentle:

[0418] Agua, alcoholetoxi sulfato de sodio, propilenglicol, bórax, etanol, alquilbenceno sulfonato de sodio lineal, sal, polietilenimina etoxilada, dietilenglicol, hexametilendiamina trans sulfatada y etoxilada, alcohol etoxilado, alquilbenceno sulfonato lineal, sal de MEA, formiato de sodio, alquil sulfato de sodio, DTPA, óxido de amina, formiato de calcio, diaminoestilbeno de disodio, disulfonato, amilasa, proteasa, dimeticona, benzisotiazolinona.

Tide Coldwater Liquid, Fresh Scent:

[0419] Agua, alcoholetoxi sulfato, alquilbenceno sulfonato lineal, dietilenglicol, propilenglicol, etanolamina, ácido cítrico, bórax, sulfato de alcohol, hidróxido de sodio, polietilenimina, etoxilato, ácidos grasos de sodio, etanol, proteasa, Laureth-9, etoxisulfato de diquaternium, óxido de lauramina, cumeno de sodio, sulfonato, fragancia,

DTPA, amilasa, diaminoestilbeno de disodio, disulfonato, formiato de sodio, diestirilbifenil disulfonato de disodio, formiato de calcio, polietilenglicol 4000, mananasa, pectinasa, Liquitint™ Blue, dimeticona.

Tide TOTALCARE™ Liquid, Cool Cotton:

[0420] Agua, alcoholetoxi sulfato, propilenglicol, ácidos grasos de sodio, cloruro de laurtrimonio, etanol, hidróxido de sodio, cumeno sulfonato de sodio, ácido cítrico, etanolamina, dietilenglicol, poliéter de silicona, bórax, fragancia, polietilenimina etoxilada, proteasa, Laureth-9.

[0421] DTPA, cloruro de poliacrilamida de quaternium, diaminoestilbeno disulfonato de disodio, formiato de sodio, Liquitint™ Orange, dipropiletil tetramina, dimeticona, celulasa.

Liquid Tide Plus Bleach Alternative™, Vivid White and Bright, Original and Clean Breeze:

[0422] Agua, alcoholetoxi sulfato de sodio, alquil sulfato de sodio, citrato de MEA, alquilbenceno sulfonato lineal, sal de MEA, propilenglicol, dietilenglicol, polietilenimina etoxilada, etanol, ácidos grasos de sodio, etanolamina, óxido de lauramina, bórax, Laureth-9, DTPA, cumeno sulfonato de sodio, formiato de sodio, formiato de calcio, alquilbenceno sulfonato lineal, sal de sodio, sulfato de alcohol, hidróxido de sodio, etoxisulfato de diquaternium, fragancia, amilasa, proteasa, mananasa, pectinasa, diaminoestilbeno disulfonato de disodio, benzisotiazolinona, Liquitint™ Blue, dimeticona, dipropiletil tetramina.

Liquid Tide HE, Original Scent:

[0423] Agua, alcoholetoxi sulfato de sodio, citrato de MEA, alquil sulfato de sodio, alcohol etoxilado, alquilbenceno sulfonato lineal, sal de MEA, ácidos grasos de sodio, polietilenimina etoxilada, dietilenglicol, propilenglicol, etoxisulfato de diquaternium, bórax, polietilenimina, etoxilato propoxilado, etanol, cumeno sulfonato de sodio, fragancia, DTPA, diaminoestilbeno disulfonato de disodio, mananasa, celulasa, amilasa, formiato de sodio, formiato de calcio, óxido de lauramina, Liquitint™ Blue, dimeticona/polidimetil silicona.

Tide TOTALCARE HE Liquid, renewing Rain:

[0424] Agua, alcoholetoxi sulfato, alquilbenceno sulfonato lineal, alcohol etoxilado, ácido cítrico, etanolamina, ácidos grasos de sodio, dietilenglicol, propilenglicol, hidróxido de sodio, bórax, polietilenimina etoxilada, poliéter de silicona, etanol, proteasa, cumeno sulfonato de sodio, etoxisulfato de diquaternium, Laureth-9, fragancia, amilasa, DTPA, diaminoestilbeno disulfonato de disodio, diestirilbifenil disulfonato de disodio, formiato de sodio, formiato de calcio, mananasa, Liquitint™ Orange, dimeticona, cloruro poliacrilamida de quaternium, celulasa, dipropiletil tetramina.

Tide liquid HE Free:

[0425] Agua, alcoholetoxi sulfato, dietilenglicol, citrato de monoetanolamina, formiato de sodio, propilenglicol, alquilbenceno sulfonatos lineales, etanolamina, etanol, polietilenimina etoxilada, amilasa, benzisotiazolina, bórax, formiato de calcio, ácido cítrico, sodio de pentaacetato de dietilentriamina, dimeticona, etoxisulfato de diquaternium, diaminoestilbeno disulfonato de disodio, Laureth-9, mananasa, proteasa, cumeno sulfonato de sodio, ácidos grasos de sodio.

Tide Coldwater HE Liquid, Fresh Scent:

[0426] Agua, alcoholetoxi sulfato, citrato de MEA, sulfato de alcohol, alcohol etoxilado, alquilbenceno sulfonato lineal MEA, ácidos grasos de sodio, polietilenimina etoxilada, dietilenglicol, propilenglicol, etoxisulfato de diquaternium, bórax, polietilenimina etoxilada propoxilada, etanol, cumeno sulfonato de sodio, fragancia, DTPA, MEA de disulfonato de diaminoestilbeno de disodio, proteasa, mananasa, celulasa, amilasa, formiato de sodio, formiato de calcio, óxido de lauramina, Liquitint™ Blue, dimeticona.

Tide for Coldwater HE Free Liquid:

[0427] Agua, alcoholetoxi sulfato de sodio, citrato de MEA, alquilbenceno sulfonato lineal: sal de sodio, alcohol etoxilado, alquilbenceno sulfonato lineal: sal de MEA, ácidos grasos de sodio, polietilenimina etoxilada, dietilenglicol, propilenglicol, etoxisulfato de diquaternium, bórax, proteasa, polietilenimina etoxilada propoxilada, etanol, cumeno sulfonato de sodio, amilasa, ácido cítrico, DTPA, diaminoestilbeno disulfonato de disodio, formiato de sodio, formiato de calcio, dimeticona.

Tide Simply Clean & Fresh:

[0428] Agua, sulfato de alcohol etoxilado, alquilbenceno sulfonato lineal, sales de sodio/MEA, propilenglicol, dietilenglicol, formiato de sodio, etanol, bórax, ácidos grasos de sodio, fragancia, óxido de lauramina, DTPA,

amina de polietileno etoxilada, formiato de calcio, diaminoestilbeno disulfonato de disodio, dimeticona, tetramina, Liquitint™ Blue.

Tide Pods, Ocean Mist, Mystic Forest, Spring Meadow:

[0429] Alquilbenceno sulfonatos lineales, C12-16 Pareth-9, propilenglicol, alcoholetoxi sulfato, agua, polietilenimina etoxilada, glicerina, sales de ácidos grasos, acetato de polivinilo PEG-136, sal disuccínica de etilendiamina, citrato de monoetanolamina, bisulfito de sodio, dietilentriamina pentaacetato de sodio, diestirilbifenil disulfonato de disodio, formiato de calcio, mananasa, exiloglucanasa, formiato de sodio, aceite de ricino hidrogenado, natalasa, tintes, termamilo, subtilisina, benzisotiazolina, perfume.

Tide to Go:

[0430] Agua desionizada, éter butílico de dipropilenglicol, alquil sulfato de sodio, peróxido de hidrógeno, etanol, sulfato de magnesio, óxido de dimetil alquil amina, ácido cítrico, hidróxido de sodio, ácido trimetoxi benzoico, frangacia.

Tide Stain Release Liquid:

[0431] Agua, alquilo etoxilado, alquilbencenosulfonato lineal, peróxido de hidrógeno, etoxisulfato de diquaternium, etanolamina, diestirilbifenilo disulfonato de disodio, tetrabutil etilidinobisfenol, F&DC Yellow 3, fragancia.

Tide Stain Release Powder:

[0432] Percarbonato de sodio, sulfato de sodio, carbonato de sodio, aluminosilicato de sodio, nonanoiloxi benceno sulfonato, poliacrilato de sodio, agua, alquilbencenosulfonato de sodio, DTPA, polietilenglicol, palmitato de sodio, amilasa, proteasa, almidón modificado, FD&C Blue 1, fragancia.

Tide Stain Release, Pre Treater Spray:

[0433] Agua, alquilo etoxilado, borato de MEA, alquilbencenosulfonato lineal, propilenglicol, etoxisulfato de diquaternium, enzima de cloruro de calcio, proteasa, etanolamina, benzoisotiazolinona, amilasa, citrato de sodio, hidróxido de sodio, fragancia.

Tide to Go Stain Eraser:

[0434] Agua, óxido de alquil amina, éter de fenil dipropilenglicol, peróxido de hidrógeno, ácido cítrico, sal de sodio de ácido etilendiamina disuccínico, alquil sulfato de sodio, fragancia.

Tide boost with Oxi:

[0435] Bicarbonato de sodio, carbonato de sodio, percarbonato de sodio, alcohol etoxilado, cloruro de sodio, copolímero maleico/acrílico, nonanoiloxi benceno sulfonato, sulfato de sodio, colorante, sal de sodio de dietilentriamina pentaacetato, aluminosilicato hidratado (zeolita), polietilenglicol, alquilbenceno sulfonato de sodio, palmitato de sodio, almidón, agua, fragancia.

Tide Stain Release boost Duo Pac:

[0436] Película de bolsa de alcohol polivinílico, donde se envasa una parte líquida y una parte en polvo: Ingredientes líquidos: dipropilenglicol, etoxisulfato de diquaternium, agua, glicerina, LiquitintTM Orange, ingredientes en polvo: percarbonato de sodio, nonanoiloxi benceno sulfonato, carbonato de sodio, sulfato de sodio, aluminosilicato de sodio, poliacrilato de sodio, alquilbencenosulfonato de sodio, copolímero maleico/acrílico, agua, amilasa, polietilenglicol, palmitato de sodio, almidón modificado, proteasa, glicerina, DTPA, fragancia.

Tide Ultra Stain Release:

[0437] Agua, alcoholetoxi sulfato de sodio, alquilbenceno sulfonato lineal, sales de sodio/MEA, citrato de MEA, propilenglicol, polietilenimina etoxilada, etanol, dietilenglicol, polietilenimina propoxietoxilada, ácidos grasos de sodio, proteasa, bórax, cumeno sulfonato de sodio, DTPA, fragancia, amilasa, diaminoestilbeno disulfonato de disodio, formiato de calcio, formiato de sodio, gluconasa, dimeticona, Liquitint™ Blue, mananasa.

Ultra Tide with a Touch of Downy® Powdered Detergent, April Fresh/Clean Breeze/April Essence:

[0438] Carbonato de sodio, aluminosilicato de sodio, sulfato de sodio, alquilbenceno sulfonato lineal, bentonita, agua, percarbonato de sodio, poliacrilato de sodio, silicato, alquil sulfato, nonanoiloxibencenosulfonato, DTPA,

polietilenglicol 4000, silicona, etoxilato, fragancia, óxido de polietileno, ácido palmítico, diaminoestilbeno disulfonato de disodio, proteasa, Liquitint™ Red, FD&C 1 Blue, celulasa.

Ultra Tide with a Touch of Downy Clean Breeze:

[0439] Agua, alcoholetoxi sulfato de sodio, citrato de MEA, alquilbenceno sulfonato lineal: sales de sodio/MEA, propilenglicol, polietilenimina etoxilada, etanol, dietilenglicol, polietilenimina, propoxietoxilato, etoxisulfato de diquaternium, sulfato de alcohol, dimeticona, fragancia, bórax, ácidos grasos de sodio, DTPA, proteasa, bisulfito de sodio, diaminoestilbeno disulfonato de disodio, amilasa, gluconasa, aceite de ricino, formiato de calcio, MEA, copolímero de acrilato de estireno, formiato de sodio, Liquitint™ Blue.

Ultra Tide with Downy Sun Blossom:

[0440] Agua, alcoholetoxi sulfato de sodio, citrato de MEA, alquilbenceno sulfonato lineal: sales de sodio/MEA, propilenglicol, etanol, dietilenglicol, polietilenimina propoxietoxilada, polietilenimina etoxilada, sulfato de alcohol, dimeticona, fragancia, bórax, ácidos grasos de sodio, DTPA, proteasa, bisulfito de sodio, diaminoestilbeno disulfonato de disodio, amilasa, aceite de ricino, formiato de calcio, MEA, copolímero de acrilato de estireno, propanamida de propanaminio, gluconasa, formiato de sodio, Liquitint™ Blue.

Ultra Tide with Downy April Fresh/ Sweet Dreams:

[0441] Agua, alcoholetoxi sulfato de sodio, citrato de MEA, alquilbenceno sulfonato lineal: sales de sodio/MEA, propilenglicol, polietilenimina etoxilada, etanol, dietilenglicol, polietilenimina propoxietoxilada, etoxisulfato de diquaternium, sulfato de alcohol, dimeticona, fragancia, bórax, ácidos grasos de sodio, DTPA, proteasa, bisulfito de sodio, diaminoestilbeno disulfonato de disodio, amilasa, gluconasa, aceite de ricino, formiato de calcio, MEA, copolímero de acrilato de estireno, propanamida de propanaminio, formiato de sodio, Liquitint™ Blue.

Ultra Tide Free Powdered Detergent:

[0442] Carbonato de sodio, aluminosilicato de sodio, alquil sulfato, sulfato de sodio, alquilbenceno sulfonato lineal, agua, poliacrilato de sodio, silicato, etoxilato, percarbonato de sodio, polietilenglicol 4000, proteasa, diaminoestilbeno disulfonato de disodio, silicona, celulasa.

Ultra Tide Powdered Detergent, Clean Breeze/Spring Lavender/mountain Spring:

[0443] Carbonato de sodio, aluminosilicato de sodio, sulfato de sodio, alquilbenceno sulfonato lineal, alquil sulfato, percarbonato de sodio, agua, poliacrilato de sodio, silicato, nonanoiloxibencenosulfonato, etoxilato, polietilenglicol 4000, fragancia, DTPA, diaminoestilbeno disulfonato de disodio, ácido palmítico, proteasa, silicona, celulasa.

Ultra Tide HE (High Efficiency) Powdered Detergent, Clean Breeze:

[0444] Carbonato de sodio, aluminosilicato de sodio, sulfato de sodio, alquilbenceno sulfonato lineal, agua, nonanoiloxibencenosulfonato, alquil sulfato, poliacrilato de sodio, silicato, percarbonato de sodio, etoxilato, polietilenglicol 4000, fragancia, DTPA, ácido palmítico, diaminoestilbeno disulfonato de disodio, proteasa, silicona, celulasa.

Ultra Tide Coldwater Powdered Detergent, Fresh Scent:

[0445] Carbonato de sodio, aluminosilicato de sodio, sulfato de sodio, percarbonato de sodio, alquil sulfato, alquilbenceno sulfonato lineal, agua, nonanoiloxibencenosulfonato, poliacrilato de sodio, silicato, etoxilato, polietilenglicol 4000, DTPA, fragancia, natalasa, ácido palmítico, proteasa, diaminoestilbeno disulfonato de disodio, FD&C 1 Blue, silicona, celulasa, alquil éter sulfato.

Ultra Tide with bleach Powdered Detergent, Clean Breeze:

[0446] Carbonato de sodio, aluminosilicato de sodio, sulfato de sodio, alquilbenceno sulfonato lineal, percarbonato de sodio, nonanoiloxibencenosulfonato, alquil sulfato, agua, silicato, poliacrilato de sodio, etoxilato, polietilenglicol 4000, fragancia, DTPA, ácido palmítico, proteasa, diaminoestilbeno disulfonato de disodio, silicona, FD&C Blue 1, celulasa, alquil éter sulfato.

Ultra Tide with Febreeze Freshness™ Powdered Detergent, Spring Renewal

[0447] Carbonato de sodio, aluminosilicato de sodio, sulfato de sodio, alquilbenceno sulfonato lineal, percarbonato de sodio, alquil sulfato, agua, poliacrilato de sodio, silicato, nonanoiloxibencenosulfonato, etoxilato,

polietilenglicol 4000, DTPA, fragancia, celulasa, proteasa, diaminoestilbeno disulfonato de disodio, silicona, FD&C Blue 1.

Liquid Tide Plus with Febreeze Freshness - Sport HE Active Fresh:

[0448] Agua, alcoholetoxi sulfato de sodio, citrato de MEA, alquilbenceno sulfonato lineal, sal de sodio, alquilbenceno sulfonato lineal: sal de MEA, alcohol etoxilado, ácidos grasos de sodio, propilenglicol, dietilenglicol, polietilenimina etoxilada propoxilada, etoxisulfato de diquaternium, etanol, cumeno sulfonato de sodio, bórax, fragancia, DTPA, bisulfato de sodio, diaminoestilbeno disulfonato de disodio, mananasa, celulasa, amilasa, formiato de sodio, formiato de calcio, óxido de lauramina, Liquitint™ Blue, dimeticona/polidimetil silicona.

Tide Plus Febreeze Freshness Spring & Renewal:

[0449] Agua, alcoholetoxi sulfato de sodio, alquilbenceno sulfonato lineal: sales de sodio/MEA, citrato de MEA, propilenglicol, polietilenimina etoxilada, fragancia, etanol, dietilenglicol, polietilenimina propoxietoxilada, proteasa, sulfato de alcohol, bórax, ácidos grasos de sodio, DTPA, diaminoestilbeno disulfonato de disodio, MEA, mananasa, gluconasa, formiato de sodio, dimeticona, Liquitint™ Blue, tetramina.

Liquid Tide Plus with Febreeze Freshness, Sport HE Victory Fresh:

[0450] Agua, alcoholetoxi sulfato de sodio, citrato de MEA, alquilbenceno sulfonato lineal, sal de sodio, alquilbenceno sulfonato lineal: sal de MEA, alcohol etoxilado, ácidos grasos de sodio, propilenglicol, dietilenglicol, polietilenimina etoxilada propoxilada, etoxisulfato de diquaternium, etanol, cumeno sulfonato de sodio, bórax, fragancia, DTPA, bisulfato de sodio, diaminoestilbeno disulfonato de disodio, mananasa, celulasa, amilasa, formiato de sodio, formiato de calcio, óxido de lauramina, Liquitint™ Blue, dimeticona/polidimetil silicona.

Tide Vivid White + Bright Powder, Original:

[0451] Carbonato de sodio, aluminosilicato de sodio, sulfato de sodio, alquilbenceno sulfonato lineal, percarbonato de sodio, nonanoiloxibencenosulfonato, alquil sulfato, agua, silicato, poliacrilato de sodio, etoxilato, polietilenglicol 4000, fragancia, DTPA, ácido palmítico, proteasa, diaminoestilbeno disulfonato de disodio, silicona, FD&C Blue 1, celulasa, alquil éter sulfato.

HEY SPORT TEX WASH Detergent

[0452] Agua, dodecilbencenosulfonato, laureth-11, lanolina peg-75, propilenglicol, alcohol desnat., soyato de potasio, hidróxido de potasio, cocoanfodiacetato de disodio, acetamida de triacetato cocosalquil etilendiamina, perfume, ricinoleato de zinc, cloruro de sodio, benzisotiazolinona, metilisotiazolinona, ci 16255, alcohol bencílico.

[0453] Los productos llamados Tide, Ariel, Gain y Fairy son productos disponibles comercialmente suministrados por Procter & Gamble. Los productos llamados Persil son productos disponibles comercialmente suministrados por Unilever y Henkel. Los productos llamados Hey Sport son productos disponibles comercialmente suministrados por Hey Sport.

Ingrediente	Cantidad (en % en peso)
Tensioactivo detersivo aniónico (tal como alquilbenceno sulfonato, alquilsulfato etoxilado y mezclas de los mismos	de 8 % en peso a 15 % en peso
Tensioactivo detersivo no iónico (tal como alquil alcohol etoxilado)	de 0,5 % en peso a 4 % en peso
Tensioactivo detersivo catiónico (tal como compuestos de amonio cuaternario)	de 0 % a 4 % en peso
Otro tensioactivo detersivo (tal como tensioactivos detersivos zwitteriónicos,	de 0 % en peso a 4 en peso
tensioactivos anfotéricos y mezclas de los mismos)	%
Polímero de carboxilato (tal como copolímeros de ácido maleico y ácido acrílico)	de 1 % en peso a 4 % en peso
Polímero de polietilenglicol (tal como un polímero de polietilenglicol que comprende cadenas laterales de acetato de polivinilo)	de 0,5 % en peso a 4 % en peso
Polímero de liberación de la suciedad de poliéster (tal como polímeros Repel-o-tex y/o Texcare)	0,1 a 2 % en peso
Polímero celulósico (tal como carboximetilcelulosa, metilcelulosa y combinaciones de los mismos)	de 0,5 % en peso a 2 % en peso
Otro polímero (tal como polímeros de amina, polímeros inhibidores de la transferencia de tintes, polímeros derivados de hexametilendiamina, y mezclas de los mismos)	de 0 % en peso a 4 % en peso
Adyuvante de zeolita y adyuvante de fosfato (tal como zeolita 4A y/o tripolifosfato de	de 0 % en peso a 4 %

sodio)	en peso
Otro adyuvante (tal como citrato de sodio y/o ácido cítrico)	de 0 % en peso a 3 % en peso
Sal de carbonato (tal como carbonato de sodio y/o bicarbonato de sodio)	de 15 % en peso a 30 % en peso
Sal de silicato (tal como silicato de sodio)	de 0 % en peso a 10 % en peso
Relleno (tal como sulfato de sodio y/o biorrellenos)	de 10 % en peso a 40 % en peso
Fuente de oxígeno disponible (tal como percarbonato de sodio)	de 10 % en peso a 20 % en peso
Activador de blanqueo (tal como tetraacetiletileno diamina (TAED) y/o nonanoiloxibencenesulfonato (NOBS)	de 2 % en peso a 8 % en peso
Catalizador de blanqueo (tal como catalizador de blanqueo basado en oxaziridinio y/o catalizador de blanqueo de metal de transición)	de 0 % en peso a 0,1 % en peso
Otro blanqueador (tal como blanqueador reductor y/o perácido performado)	de 0 % en peso a 10 % en peso
Quelante (tal como ácido etilendiamina-N'N'-disuccínico (EDDS) y/o ácido hidroxietano difosfónico (HEDP)	de 0,2 % en peso a 1 % en peso
Fotoblanqueador (tal como ftalocianina sulfonada de zinc y/o aluminio)	de 0 % en peso a 0,1 % en peso
Agente de matizado (tal como violeta directo 99, rojo ácido 52, azul ácido 80, directo	de 0 % en peso a 1 peso
violeta 9, violeta de solvente 13 y cualquier combinación de los mismos)	%
Abrillantador (tal como abrillantador 15 y/o abrillantador 49)	de 0,1 % en peso a 0,4 % en peso
Proteasa (tal como Savinase, Savinase Ultra, Purafect, FN3, FN4 y cualquier combinación de las mismas)	de 0,1 % en peso a 0,4 % en peso
Amilasa (tal como Termamyl, Termamyl Ultra Natalase, Optisize, Stainzyme, Stainzyme Plus, y cualquier combinación de las mismas)	de 0,05 % en peso a 0,2 % en peso
Celulasa (tal como Carezyme y/o Celluclean)	de 0,05 % en peso a 0,2 % en peso
Lipasa (tal como Lipex, Lipolex, Lipoclean y cualquier combinación de las mismas)	de 0,2 % a 1 % en peso
Otra enzima (tal como xiloglucanasa, cutinasa, pectato liasa, mananasa, enzima de blanqueo)	de 0 % en peso a 2 % en peso
Suavizante de tejidos (tal como arcilla de montmorillonita y/o polidimetilsiloxano (PDMS)	de 0 % en peso a 4 % en peso
Floculante (tal como óxido de polietileno)	de 0 % en peso a 1 % en peso
Supresor de espuma (tal como silicona y/o ácido graso)	de 0 % en peso a 0,1 % en peso
Perfume (tal como microcápsula de perfume, perfume en espray, acordes de perfume encapsulados en almidón, zeolita cargada con perfume, y cualquier combinación de los mismos)	de 0,1 % en peso a 1 % en peso
Estética (tales como anillos de jabón coloreados y/o motas/rayas coloreadas)	de 0 % en peso a 1 % en peso
Miscelánea	El resto

Ingrediente	Cantidad
Polímero que contiene el grupo carboxilo (que comprende de aproximadamente el 60 % a aproximadamente el 70 % en masa de un monómero basado en ácido acrílico (A); y de aproximadamente el 30 % a aproximadamente el 40 %) en masa de un monómero que contiene el grupo de ácido sulfónico (B); y donde el peso molecular medio es de aproximadamente 23 000 a aproximadamente 50 000 preferiblemente en el rango de aproximadamente 25 000 a aproximadamente 38 000 como se describe en WO2014032269.	de aproximadamente 0,5 % en peso a aproximadamente 1,5 % en peso
Amilasa (Stainzyme Plus(R), que tiene una actividad enzimática de 14 mg de enzima activa/g	de aproximadamente 0,1 % en peso a aproximadamente 0,5 % en peso
Tensioactivo detersivo aniónico (tal como alquilbenceno sulfonato, alquil sulfato etoxilado y mezclas de los mismos)	de aproximadamente 8 % en peso a aproximadamente 15 % en peso

Tensioactivo detersivo no iónico (tal como alquilo alcohólico etoxilado)	de aproximadamente 0,5 % en peso a 4 % en peso
Tensioactivo detersivo catiónico (tal como compuestos de amonio cuaternario)	de aproximadamente 0 % en peso a aproximadamente 4 % en peso
Otro tensioactivo detersivo (tal como tensioactivos detersivos zwitteriónicos, tensioactivos anfotéricos y mezclas de los mismos)	de aproximadamente 0 % en peso a 4 % en peso
Polímero de carboxilato (tal como copolímeros de ácido maleico y ácido acrílico)	de aproximadamente 1 % en peso a aproximadamente 4 % en peso
Polímero de polietilenglicol (tal como un polímero de polietilenglicol que comprende cadenas laterales de acetato de polivinilo)	de aproximadamente 0 % en peso a aproximadamente 4 % en peso
Polímero de liberación de la suciedad de poliéster (tal como polímeros Repel-O-Tex(R) y/o Texcare(R))	de aproximadamente 0,1 % en peso a aproximadamente 2 % en peso
Polímero celulósico (tal como carboximetilcelulosa, metilcelulosa y combinaciones de los mismos)	de aproximadamente 0,5 % en peso a aproximadamente 2 % en peso
Otro polímero (tal como polímeros de amina, polímeros inhibidores de la transferencia de tintes, polímeros derivados de hexametilendiamina, y mezclas de los mismos)	de aproximadamente 0 % en peso a aproximadamente 4 % en peso
Adyuvante de zeolita y adyuvante de fosfato (tal como zeolita 4A y/o tripolifosfato de sodio)	de aproximadamente 0 % en peso a aproximadamente 4 % en peso
Otro adyuvante (tal como citrato de sodio y/o ácido cítrico)	de aproximadamente 0 % en peso a aproximadamente 3 % en peso
Sal de carbonato (tal como carbonato de sodio y/o bicarbonato de sodio)	de aproximadamente 15 % en peso a aproximadamente 30 % en peso
Sal de silicato (tal como silicato de sodio)	de aproximadamente 0 % en peso a aproximadamente 10 % en peso
Relleno (tal como sulfato de sodio y/o biorrelleno)	de aproximadamente 10 % en peso a aproximadamente 40 % en peso
Fuente de oxígeno disponible (tal como percarbonato de sodio)	de aproximadamente 10 % en peso a aproximadamente 20 % en peso
Activador de blanqueo (tal como tetraacetiletileno diamina (TAED) y/o nonanoiloxibencenosulfonato (NOBS)	de aproximadamente 2 % en peso a aproximadamente 8 % en peso
Catalizador de blanqueo (tal como catalizador de blanqueo basado en oxaziridinio y/o catalizador de blanqueo de metal de transición)	de aproximadamente 0 % en peso a aproximadamente 0,1 % en peso
Otro blanqueador (tal como blanqueador reductor y/o perácido preformado)	de aproximadamente 0 % en peso a aproximadamente 10 %

	en peso
Quelante (tal como ácido etilendiamina-N'N'-disuccínico (EDDS) y/o ácido hidroxietano difosfónico (HEDP)	de aproximadamente 0,2 % en peso a aproximadamente 1 % en peso
Fotoblanqueador (tal como ftalocianina sulfonada de zinc y/o aluminio)	de aproximadamente 0 % en peso a aproximadamente 0,1 % en peso
Agente de matizado (tal como violeta directo 99, rojo ácido 52, azul ácido 80, violeta directo 9, violeta solvente 13 y cualquier combinación de los mismos)	de aproximadamente 0 % en peso a aproximadamente 0,5 % en peso
Abrillantador (tal como abrillantador 15 y/o abrillantador 49)	de aproximadamente 0,1 % en peso a aproximadamente 0,4 % en peso
Proteasa (tal como Savinase, Polarzyme, Purafect, FN3, FN4 y cualquier combinación de las mismas, típicamente con una actividad enzimática de aproximadamente 20 mg a aproximadamente 100 mg de enzima activa/g)	de aproximadamente 0,1 % en peso a aproximadamente 1,5 % en peso
Amilasa (tal como Termamyl(R), Termamyl Ultra(R), Natalase(R), Optisize HT Plus(R), Powerase(R), Stainzyme(R) y cualquier combinación de las mismas, típicamente con una actividad enzimática de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 50 mg de enzima activa/g)	de aproximadamente 0,05 % en peso a aproximadamente 0,2 % en peso
Celulasa (tal como Carezyme(R), Celluzyme(R) y/o Celluclean(R), típicamente con una actividad enzimática de aproximadamente de 10 a 50 mg de enzima activa/g)	de aproximadamente 0,05 % en peso a 0,5 % en peso
Lipasa (tal como Lipex(R), Lipolex(R), Lipoclean(R) y cualquier combinación de las mismas, típicamente con una actividad enzimática de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 50 mg de enzima activa/g)	de aproximadamente 0,2 % en peso a aproximadamente 1 % en peso
Otra enzima (tal como xiloglucanasa (por ejemplo, Whitezyme(R)), cutinasa, pectato liasa, mananasa, enzima de blanqueo, típicamente con una actividad enzimática de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 50 mg de enzima activa/g)	de 0 % en peso a 2 % en peso
Suavizante de tejidos (tal como arcilla de montmorillonita y/o polidimetilsiloxano (PDMS))	de 0 % en peso a 15 % en peso
Floculante (tal como óxido de polietileno)	de 0 % en peso a 1 % en peso
Supresor de jabonadura (tal como silicona y/o ácido graso)	de 0 % en peso a 0,1 % en peso
Perfume (tal como microcápsula de perfume, perfume en espray, acordes de perfume encapsulados en almidón, zeolita cargada con perfume, y cualquier combinación de los mismos)	de 0,1 % en peso a 1 % en peso
Estética (tales como anillos de jabón coloreados y/o motas/rayas coloreadas)	de 0 % en peso a 1 % en peso
Miscelánea	El resto

[0454] Todos los niveles de enzimas se expresan como proteína enzimática activa en bruto por 100 g de composición detergente. Se pueden obtener ingredientes tensioactivos de BASF, Ludwigshafen, Alemania (Lutensol(R)); Shell Chemicals, Londres, Reino Unido; Stepan, Northfield, III, EE.UU.; Huntsman, Huntsman, Salt Lake City, Utah, EE.UU.; Clariant, Sulzbach, Alemania (Praepagen(R)).

[0455] Se puede obtener tripolifosfato de sodio de Rhodia, París, Francia. Se puede obtener zeolita de Industrial Zeolite (UK) Ltd, Grays, Essex, Reino Unido. Se pueden obtener ácido cítrico y citrato de sodio de Jungbunzlauer, Basilea, Suiza. NOBS es nonanoiloxibencenosulfonato de sodio, suministrado por Eastman, Batesville, Ark., EE.UU.

[0456] TAED es tetraacetiletilendiamina, suministrado bajo la marca Peractive(R) por Clariant GmbH, Sulzbach, Alemania.

[0457] Se pueden obtener carbonato de sodio y bicarbonato de sodio de Solvay, Bruselas, Bélgica.

[0458] Se pueden obtener poliacrilato, copolímeros de poliacrilato/maleato de BASF, Ludwigshafen, Alemania.

[0459] Se puede obtener Repel-O-Tex(R) de Rhodia, París, Francia.

[0460] Se puede obtener Texcare(R) de Clariant, Sulzbach, Alemania. Se pueden obtener percarbonato de sodio y carbonato de sodio de Solvay, Houston, Tex., EE.UU.

[0461] La sal de Na de ácido etilendiamina-N,N'-disuccínico, isómero (S,S) (EDDS) se suministró por Octel, Ellesmere Port, Reino Unido.

[0462] El hidroxietano di fosfonato (HEDP) se suministró por Dow Chemical, Midland, Mich., EE.UU.

[0463] Se pueden obtener las enzimas Savinase(R), Savinase(R) Ultra, Stainzyme(R) Plus, Lipex(R), Lipolex(R), Lipoclean(R), Celluclean(R), Carezyme(R), Natalase(R), Stainzyme(R), Stainzyme(R) Plus, Termamyl(R), Termamyl(R) ultra, y Mannaway(R) de Novozymes, Bagsvaerd, Dinamarca.

[0464] Se pueden obtener las enzimas Purafect(R), FN3, FN4 y Optisize de Genencor International Inc., Palo Alto, California, EE.UU.

[0465] Se puede obtener violeta directo 9 y 99 de BASF DE, Ludwigshafen, Alemania. Se puede obtener violeta solvente 13 de Ningbo Lixing Chemical Co., Ltd. Ningbo, Zhejiang, China. Se pueden obtener abrillantadores de Ciba Specialty Chemicals, Basilea, Suiza.

[0466] Todos los porcentajes y proporciones se calculan en peso a menos que se indique lo contrario. Todos los porcentajes y proporciones se calculan basándose en la composición total a menos que se indique lo contrario. Se debe entender que cada limitación numérica máxima dada en toda esta especificación incluye cada limitación numérica inferior, como si tales limitaciones numéricas inferiores se escribieran expresamente en este documento. Cada limitación numérica mínima dada en toda esta especificación incluirá cada limitación numérica superior, como si tales limitaciones numéricas superiores estuvieran escritas expresamente en este documento. Cada rango numérico dado en toda esta especificación incluirá cada rango numérico más reducido que queda dentro de tal rango numérico más amplio, como si tales rangos numéricos más reducidos estuvieran todos escritos expresamente en este documento.

Ensayos de lavado

Sistema de lavado modelo con Launder-O-Meter (LOM)

[0467] El Launder-O-Meter (LOM) es un sistema de lavado modelo a escala media que se puede aplicar para evaluar hasta 20 condiciones de lavado diferentes simultáneamente. Un LOM es básicamente un baño de agua grande con temperatura controlada con 20 vasos de precipitado de metal cerrados que rotan dentro del mismo. Cada vaso de precipitado constituye una pequeña lavadora y durante un experimento, cada uno contendrá una solución de un sistema específico de detergente/enzima que se debe evaluar junto con los tejidos sucios y limpios sobre los que se evalúa. La tensión mecánica se consigue rotando los vasos de precipitado en el baño de agua y mediante la inclusión de bolas metálicas en el vaso de precipitado.

[0468] El sistema de lavado modelo con LOM se usa principalmente en la evaluación a media escala de detergentes y enzimas en condiciones de lavado europeas. En un experimento con LOM, se pueden variar factores tales como la proporción de lastre y suciedad y la proporción de tejido y solución de lavado. Por lo tanto, el LOM proporciona la conexión entre experimentos a pequeña escala, tales como AMSA y minilavado, y los experimentos a escala completa que consumen más tiempo en lavadoras de carga frontal.

Sistema de lavado modelo con Mini Launder-O-Meter (MiniLOM)

[0469] MiniLOM es un sistema de lavado mini modificado del Launder-O-Meter (LOM), que es un sistema de lavado modelo a media escala que se puede aplicar para evaluar hasta 20 condiciones de lavado diferentes simultáneamente. Un LOM es básicamente un baño de agua grande con temperatura controlada con 20 vasos de precipitado de metal cerrados que rotan dentro del mismo. Cada vaso de precipitado constituye una lavadora pequeña y durante un experimento, cada uno contendrá una solución de un sistema específico de detergente/enzima que se va a evaluar junto con los tejidos sucios y limpios sobre los que se evalúa. La tensión mecánica se consigue mediante la rotación de los vasos de precipitado en el baño de agua y mediante la inclusión de bolas metálicas en el vaso de precipitado.

[0470] El sistema de lavado modelo con LOM se usa principalmente en la evaluación de detergentes y enzimas a media escala en condiciones de lavado europeas. En un experimento con LOM, se pueden variar factores tales como la proporción de lastre y suciedad y la proporción de tejido y solución de lavado. Por lo tanto, el LOM proporciona la conexión entre experimentos de pequeña escala, tales como AMSA y mini lavado, y experimentos a escala completa que consumen más tiempo en lavadoras de carga frontal.

[0471] En el miniLOM, los lavados se realizan en tubos de ensayo de 50 ml colocados en un rotador Stuart.

Ensayo de lavado con Terg-O-timeter (TOM)

[0472] El Tergo-To-Meter (TOM) es un sistema de lavado modelo a media escala que se puede aplicar para evaluar 12 condiciones de lavado diferentes simultáneamente. Un TOM es básicamente un baño de agua grande con temperatura controlada con hasta 12 vasos de precipitado de metal abiertos sumergidos en el mismo. Cada vaso de precipitado constituye una pequeña lavadora de estilo de carga superior y durante un experimento, cada uno de ellos contendrá una solución de un sistema específico de detergente/enzima y los tejidos sucios y limpios sobre los que se evalúa su rendimiento. La tensión mecánica se consigue mediante la rotación de un brazo de agitación, que agita el líquido dentro de cada vaso de precipitado. Debido a que los vasos de precipitado del TOM no tienen tapa, es posible retirar muestras durante un experimento con TOM y valorar la información en línea durante el lavado.

[0473] El sistema de lavado modelo con TOM se usa principalmente en la evaluación a media escala de detergentes y enzimas en condiciones de lavado de EE.UU. o LA/AP. En un experimento con TOM, se pueden variar factores tales como la proporción de lastre y suciedad y la proporción de tejido y solución de lavado. Por lo tanto, el TOM proporciona la conexión entre experimentos de pequeña escala, tales como AMSA y mini lavado, y los experimentos a escala completa que consumen más tiempo en lavadoras de carga superior.

[0474] Equipo: el baño de agua con 12 vasos de precipitado de acero y 1 brazo rotativo por vaso de precipitado con capacidad de 500 o 1200 mL de solución detergente. La temperatura varía de 5 a 80 °C. El baño de agua se tiene que llenar con agua desionizada. La velocidad de rotación se puede establecer a de 70 a 120 r.p.m./min.

[0475] Establecer la temperatura en el Terg-O-Tometer e iniciar la rotación en el baño de agua. Esperar a que se ajuste la temperatura (la tolerancia es +/- 0,5 °C). Todos los vasos de precipitado deberán estar limpios y sin trazas de materiales de pruebas anteriores.

[0476] La solución de lavado con la cantidad deseada de detergente, temperatura y dureza del agua se prepara en un cubo. El detergente se deja disolver durante la agitación magnética durante 10 min. La solución de lavado se deberá usar de 30 a 60 min después de la preparación.

[0477] 800 ml solución de lavado se añaden en un vaso de precipitado del TOM. La solución de lavado se agita a 120 r.p.m. y opcionalmente una o más enzimas se agregan al vaso de precipitado. Las muestras se rocían en el vaso de precipitado y luego la carga de lastre. La medición del tiempo comienza cuando las muestras y el lastre se agregan al vaso de precipitado. Las muestras se lavan durante 20 minutos después de los cuales se termina la agitación. La carga de lavado se transfiere posteriormente desde el vaso de precipitado del TOM a un tamiz y se enjuaga con agua fría del grifo. Las muestras de suciedad se separan de la carga de lastre. Las muestras de suciedad se transfieren a un vaso de precipitado de 5 L con agua fría del grifo bajo agua corriente durante 5 minutos. La carga de lastre se mantiene separadamente para la próxima inactivación. El agua se saca suavemente de las muestras a mano y se coloca en una bandeja cubierta con un papel. Otro papel se coloca encima de las muestras. Las muestras se dejan secar durante toda la noche antes de someter las muestras al análisis, tal como medición de la intensidad de color utilizando un Color Eye como se describe en este documento.

Ensayos enzimáticos

Ensayo I: evaluación de la actividad de DNasa

[0478] La actividad de DNasa se determinó en agar de prueba de DNasa con verde de metilo (BD, Franklin Lakes, NJ, EE.UU.), que se preparó según el manual del proveedor. Brevemente, 21 g de agar se disolvieron en 500 ml de agua y luego se sometieron a autoclave durante 15 min a 121 °C. El agar sometido a autoclave se templó a 48 °C en el baño de agua, y 20 ml de agar se vertieron en placas de Petri y se dejaron solidificar por incubación durante toda la noche a temperatura ambiente. En placas de agar solidificadas, se agregan 5 µl de soluciones enzimáticas, y se observa la actividad de DNasa como zonas incoloras alrededor de las soluciones enzimáticas manchadas.

Ensayo II

[0479] Análisis de E-2-nonenal en textil utilizando una nariz electrónica.

[0480] Una manera de evaluar la presencia de mal olor en tejidos es usar E-2-nonenal como un marcador para el mal olor, ya que este compuesto contribuye al mal olor en la colada.

[0481] Añadir una solución de E-2-nonenal a una muestra textil de 5 cm x 5 cm y colocar la muestra en un frasco de vidrio de 20 mL para análisis de GC y tapar el frasco. Analizar 5 mL del espacio vacío de los frascos tapados

en una nariz electrónica Heracle II de Alpha M.O.S., Francia (cromatógrafo de gas de doble columna con 2 FID, columna 1: MXT5 y columna 2: MXT1701) después de 20 minutos de incubación a 40 °C.

Ejemplos

Métodos

[0482] Los métodos generales de PCR, clonación, ligamiento de nucleótidos, etc. son bien conocidos para un experto en la técnica y se pueden encontrar, por ejemplo, en "Molecular cloning: A laboratory manual", Sambrook *et al*. (1989), Cold Spring Harbor lab., Cold Spring Harbor, NY; Ausubel, F. M. *et al*. (eds.); "Current protocols in Molecular Biology", John Wiley e hijos, (1995); Harwood, C. R., y Cutting, S. M. (eds.); "DNA Cloning: A Practical Approach, volúmenes I y II", D.N. Glover ed. (1985); "Oligonucleotide Synthesis", M.J. Gait ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization", B.D. Hames & S.J. Higgins eds (1985); "A Practical Guide To Molecular Cloning", B. Perbal, (1984).

Ejemplo 1

Amplificación mediante PCR

[0483] Todas las amplificaciones mediante PCR se realizaron en un volumen de 100 microL que contenía 2,5 unidades de polimerasa Taq, 100 ng de pSO2, 250 nM de cada dNTP, y 10 pmol de cada uno de los dos cebadores anteriormente descritos en un tampón de reacción de 50 mM de KCl, 10 mM de Tris-HCl pH 8,0, 1,5 mM de MgCI2.

[0484] La amplificación se efectuó en un Perkin-Elmer Cetus DNA Termal 480, y consistió en un ciclo de 3 minutos a 94 °C, seguido de 25 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 30 segundos a 55 °C, y 1 minuto a 72 °C.

Transformación de *Aspergillus*

[0485] *Aspergillus oryzae* NBRC4177: disponible de Institute for fermentation, Osaka; 17-25 Juso, Hammachi 2-Chome Yodogawa-Ku, Osaka, Japón.

[0486] La transformación de *Aspergillus* se hizo como se describe en Christensen *et al*.; Biotechnology 1988 6 1419-1422. En resumen, se cultivaron micelios de *A. oryzae* en un caldo rico en nutrientes. Los micelios se separaron del caldo por filtración. La preparación de enzimas Novozyme® (Novozymes) se añadió a los micelios en el tampón estabilizante osmóticamente tal como 1,2 M de $MgSO_4$ tamponado a pH 5,0 con fosfato de sodio. La suspensión se incubó durante 60 minutos a 37 grados C con agitación. El protoplasto se filtró a través de mira-cloth para eliminar los restos miceliales. El protoplasto se recogió y se lavó dos veces con STC (1,2 M de sorbitol, 10 mM de $CaCl_2$, 10 mM de Tris-HCl pH 7,5). Los protoplastos se resuspendieron finalmente en 200-1000 microl de STC.

[0487] Para la transformación, 5 µg de ADN se añadieron a 100 µl de suspensión de protoplastos y luego se añadieron 200 µl de solución de PEG (60 % de PEG 4000, 10 mM de CaCl2, 10 mM de Tris-HCl pH 7,5) y la mezcla se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente. El protoplasto se recogió y se lavó dos veces con 1,2 M de sorbitol. El protoplasto se resuspendió finalmente en 200 µl de sorbitol 1,2 M. Los transformantes que contenían el gen amdS se seleccionaron por su capacidad para usar acetamida como la única fuente de nitrógeno en placas mínimas (Cove D.J. 1966. Biochem. Biophys. Acta. 113:51-56) que contenían 1,0 M de sacarosa como fuente de carbono, 10 mM de acetamida como fuente de nitrógeno. Después de 4-5 días de cultivo a 37 grados C, aparecieron transformantes estables como colonias que crecen y esporulan vigorosamente. Los transformantes se purificaron dos veces a través de conidiosporas en las placas de la selección anterior.

Ejemplo 2

Construcción del casete de expresión de *Aspergillus* pJaL1368

[0488] Para la expresión de un gen de *A. oryzae* (SEQ ID N.º: 1) que codifica una nucleasa putativa (SEQ ID N.º: 2), la región codificante que contiene intrones (SEQ ID N.º: 1) se amplificó como un fragmento de PCR en 931 pb por conjunto de cebador oJaL316 (SEQ ID N.º: 3) y oJaL317 (SEQ ID N.º: 4) usando ADN genómico de *A. oryzae* NBRC4177 como modelo. El fragmento de PCR de 931 pb se digirió con BamHI y XhoI dando como resultado un fragmento de 919 pb (SEQ ID N.º: 5). El fragmento de 919 BamHI-XhoI se clonó en los sitios correspondientes en pJaL1262, dando plásmido pJaL1368.

Ejemplo 3

Expresión del gen de nucleasa de *A. oryzae* putativo en la cepa de *Aspergillus oryzae* MT3568

[0489] El plásmido de expresión de *Aspergillus* pJaL1368 se transformó en las cepas *de Aspergillus oryzae* MT3568 como se describe en Christensen *et al*.; Biotechnology 1988 6 1419-1422. Doce transformantes seleccionados de forma aleatoria se purificaron e inocularon en tubos que contenían 10 ml de medio YPM (2 g/l de extracto de levadura, 2 g/l de peptona, y 2 % de maltosa), que se incubaron a 30 ºC, con agitación (200 r.p.m.) durante 4 días. Los transformantes que produjeron la proteína de *A. oryzae* AO090701000540 se identificaron mediante la aparición de una banda extra en aproximadamente 25 kD (peso molecular calculado 23893 Da) en comparación con el sobrenadante de una cepa parental no transformada. Las identidades de la banda se confirmaron mediante 1) la determinación del extremo N-terminal por degradación de Edman y 2) la digestión de InGel y MS/MS. La determinación del N-terminal dio dos secuencias del N-terminal dominantes ALKTGSG (SEQ ID N.º: 6) y KTGSGDS (SEQ ID N.º: 7). Los datos de MS/MS confirman además que el gen putativo (SEQ ID N.º: 1) codifica las proteínas maduras de las SEQ ID N.º: 8 y SEQ ID N.º: 9, que es parte de la proteína en la SEQ ID N.º: 2. Los ejemplos siguientes usan la DNasa de *Aspergillus oryzae* obtenida de las cepas de *Aspergillus oryzae* MT3568 mencionadas anteriormente transformadas con pJaL1368.

Ejemplo 4

Rendimiento de la DNasa de *Aspergillus oryzae* (SEQ ID N.º: 2) en los detergentes modelos y detergentes comerciales

Aislamiento de cepas bacterianas específicas de la colada

[0490] Una cepa de *Brevundimonas sp*. aislada de la colada se usó en el presente ejemplo.

[0491] La *Brevundimonas sp*. se aisló durante un estudio, donde se investigó la diversidad bacteriana en la colada después del lavado a 15, 40 y 60 °C, respectivamente. El estudio se condujo en colada recogida de hogares daneses. Para cada lavado, se usaron 20 g de artículos de colada (paño de cocina, toalla, trapo de platos, babero, sobaco de camiseta, cuello de camiseta, calcetines) en el rango 4:3:2:2:1:1:1. El lavado se realizó en un Laundr-O-Meter (LOM) a 15, 40 o 60 °C. Para el lavado a 15 y 40 °C, se usó Ariel Sensitive White & Color, mientras que se usó el detergente modelo WFK IEC-A* para el lavado a 60 °C. Se preparó Ariel Sensitive White & Color pesando 5,1 g y añadiendo agua del grifo hasta 1000 ml seguido de agitación durante 5 minutos. El detergente modelo WFK IEC-A* (que está disponible de WFK Testgewebe GmbH) se preparó pesando 5 g y añadiendo agua del grifo hasta 1300 ml seguido de agitación durante 15 min. El lavado se realizó durante 1 hora a 15, 40 y 60 °C, respectivamente, seguido de enjuague 2 veces con agua del grifo durante 20 min a 15 °C.

[0492] La colada se muestreó inmediatamente después del lavado a 15, 40 y 60 °C, respectivamente. Veinte gramos de colada se añadieron a 0,9 % (p/v) de NaCl (1.06404; Merck, Damstadt, Alemania) con 0,5 % (p/p) de tween 80 para producir una dilución 1:10 en una bolsa de Stomacher. La mezcla se homogeneizó utilizando un Stomacher durante 2 minutos a velocidad media. Después de la homogeneización, diluciones de diez veces se prepararon en 0,9 % (p/v) de NaCl. Las bacterias se enumeraron en agar de soja triptona (TSA) (CM0129, Oxoid, Basingstoke, Hampshire, Reino Unido) incubado aeróbicamente a 30 °C durante 5-7 días. Para suprimir el crecimiento de levadura y mohos, se añadió 0,2 % de ácido sórbico (359769; Sigma) y 0,1 % de cicloheximida (18079; Sigma). Las colonias bacterianas se seleccionaron de placas contables y se purificaron volviendo a rayar dos veces en TSA. Para el almacenamiento a largo plazo, aislados purificados se almacenaron a -80 °C en TSB que contenía 20 % (p/v) de glicerol (49779; Sigma).

Preparación de muestras de donantes con biopelícula

[0493] La *Brevundimonas sp.* se precultivó en agar de soja triptona (TSA) (pH 7,3) (CM0131; Oxoid Ltd, Basingstoke, Reino Unido) durante 2-5 días a 30 °C a partir de una única colonia, un bucle completo se transfirió a 10 mL de TSB y se incubó durante 1 día a 30 °C con agitación (240 r.p.m.). Después de la propagación, la *Brevundimonas sp.* se granuló mediante centrifugación (Sigma Laboratory Centrifuge 6K15) (3000 g a 21 °C en 7 min) y se resuspendió en 10 mL de TSB diluido dos veces con agua. La densidad óptica (OD) a 600 nm se midió utilizando un espectrofotómetro (POLARstar Omega (BMG Labtech, Ortenberg, Alemania). El TSB fresco diluido dos veces con agua se inoculó para hasta una OD_{600nm} de 0,03, y 1,6 mL se añadieron en cada pocillo de una microplaca de 12 pocillos de fondo plano de poliestireno (3512; Corning Incorporated, Corning, NY, EE.UU.), donde se colocó una muestra redonda (diámetro de 2 cm) de poliéster estéril WFK30A. Después de la incubación (24 h a 15 °C con agitación (100 r.p.m.), las muestras se enjuagaron dos veces con 0,9 % (p/v) de NaCl.

Experimento de lavado

[0494] Cinco muestras enjuagadas con *Brevundimonas sp.* se mezclaron con cinco muestras de poliéster estéril WFK30A en un tubo de ensayo de 50 mL y se añadieron 10 mL de solución de lavado de detergente que comprende la siguiente composición detergente en las concentraciones mencionadas: detergente modelo A (UE, 3,3 g/L), Ariel Actilift (UE, 6,9 g/L), Persil Small & Mighty (UE, 4 g/L), Fairy (UE, 5,6 g/L) y Tide Original (EE.UU.,

3,2 g/L), detergente modelo T (UE, 5,3 g/L), detergente modelo X (D&E, 1,8 g/L), Ariel (UE, 5,3 g/L) y Persil Megaperls (UE, 4,0 g/L) se añadieron junto con 0,7 g/L de suciedad (Pigmentschmutz, 09V, wfk, Krefeld, Alemania) y DNasa de *Aspergillus oryzae* (0,04 ppm) que se encuentraron como DNasa positiva en agar de ensayo de DNasa con verde de metilo (Ensayo I). Los tubos de ensayo se colocaron en un rotador Stuart (Mini LOM) durante 1 hora a 30 °C. Las muestras se enjuagaron dos veces con agua del grifo y se secaron en papel de filtro durante toda la noche. Como controles, lavados con detergentes mencionados y sin adición de DNasa de *A. oryzae* se hicieron en paralelo. La diferencia de color (valores L) se midió utilizando un Color Eye (espectrofotómetro de reflectancia Macbeth Color Eye 7000). Las mediciones se hicieron sin UV en la luz incidente y se extrajo el valor L del espacio de color CIE Lab.

[0495] Cuando anteriormente se hace referencia a condiciones de la UE, por ejemplo (UE, 3,3 g/L), se usó agua con dureza de 15 °dH (Ca:Mg:$NaHCO_3$ 4:1:1,5). Para detergentes de EE.UU. (EE.UU., 3,2 g/L), se usó agua con dureza de 6 °dH (Ca:Mg:$NaHCO_3$2:1:1.5). Para los detergentes de D&E (mercados en desarrollo y emergentes) (D&E, 1,8 g/L), se usó agua con dureza de 14 °dH (Ca:Mg:$NaHCO_3$2:1:1,5).

[0496] El presente ejemplo muestra que la DNasa de *A. oryzae* previene la deposición de la suciedad (antirredeposición) en muestras de poliéster precultivadas con bacterias (donantes) así como en muestras de poliéster estéril (trazadores) añadidas al lavado. La prevención de la deposición de la suciedad se observó tanto en detergentes líquidos con pH 8,0, como también en detergentes en polvo con pH 10 y Tide Pods. El efecto observado se debe a los efectos de limpieza profunda de la DNasa de *A. oryzae* (SEQ ID N.º: 2). De forma más importante, el presente ejemplo muestra que la DNasa de *A. oryzae* evitará la transferencia de suciedad entre diferentes artículos textiles en un lavado y así permitirá que la colada sucia se pueda lavar con colada menos sucia. Esto asegura que se mejore la blancura del textil.

Tabla 1

Detergente	Región	pH	Diferencia de color (ΔL)	
			Muestra de donante	Muestra de trazador
Líquidos:				
Detergente modelo A	UE	7,7	5,6	5,1
Ariel Actilift	UE	8,3	6,9	3,5
OMO Small & Mighty	UE	7,9	5,8	3,2
Fairy	UE	8,1	5,6	3,5
Tide Original	EE.UU.	8,3	5,2	4,8
Gain	EE.UU.	nd	3,8	0,11
Polvos:				
Detergente modelo T	UE	10,4	8,9	2,6
Detergente modelo X	D&E	10,2	7,0	4,5
Ariel Actilift	UE	10,2	5,6	1,2
Persil Megaperls	UE	8,7	4,0	0,4
Vainas:				
Tide Pods	EE.UU.	nd	5,7	1,0
Nd: no determinado				

Ejemplo 5

Rendimiento de la DNasa de *Aspergillus oryzae* (SEQ ID N.º: 2) en diferentes tipos de textiles

[0497] Para investigar los efectos de limpieza profunda y de blanqueamiento de la DNasa de *A. oryzae* en varios tipos de tejidos, se cultivó *Brevundimonas sp*. en muestras redondas (diámetro de 2 cm) de algodón (WFK10A), poliéster/algodón (WKF20A), poliéster (WFK30A), poliamida (WFK40A), poliacrilo (WFK50A) y seda (WFK70) durante 1 día (véase el ejemplo 4 - preparación de muestras de donante).

[0498] Cinco muestras enjuagadas con *Brevundimonas sp*. se mezclaron con cinco muestras estériles en un tubo de ensayo de 50 mL y se adicionaron 10 mL de detergente modelo A de la solución de lavado de detergente modelo A (UE, 3,3 g/L) que contenía 0,7 g/L de suciedad (Pigmentschmutz, 09V, wfk, Krefeld, Alemania) y DNasa de *Aspergillus oryzae* (0,04 ppm). Los tubos de ensayo se colocaron en un rotador Stuart (MiniLOM) durante 1 hora a 30 °C. Las muestras se enjuagaron dos veces con agua del grifo y se secaron en papel de filtro durante toda la noche. Como controles, se hicieron lavados sin adición de DNasa de *A. oryzae* en paralelo. La diferencia de color (valores L) se midió utilizando un Color Eye (espectrofotómetro de reflectancia Macbeth Color Eye 7000). Las mediciones se hicieron sin UV en la luz incidente y se extrajo el valor L del espacio de color CIE Lab. El presente ejemplo muestra que la DNasa de *A. oryzae* previene la deposición de la suciedad (antirredeposición) en varios tipos de textiles y que la blancura del textil se mejora cuando la DNasa de *A. oryzae* está presente.

Tabla 2

Tipo de textil	Diferencia de color (ΔL)
Algodón (WFK10A)	3,5
Algodón/poliéster (WFK20A)	5,4
Poliéster (WFK30A)	7,5
Poliamida (WFK40A)	3,3
Poliacrilo (WFK50A)	7,2
Seda (WFK70A)	4,5

Ejemplo 6

Estabilidad de la DNasa de *Aspergillus oryzae* en el detergente modelo A

[0499] Para investigar la estabilidad del detergente y la proteasa de DNasa de *A. oryzae*, 20 g de detergente modelo A se pesaron en un tubo de ensayo de 50 ml y se añadió 1,35 % (p/p) de proteasa 1 y proteasa 2, respectivamente. Además, se añadieron 2 g/l y 4 g/l de sistema inhibidor de proteasa 1 o 2 g/l de sistema inhibidor de proteasa 2.

[0500] Después de la incubación a -18 °C y 37 °C, respectivamente, los efectos de limpieza profunda se investigaron en muestras de *Brevundimonas sp*. Como controles, se usó detergente modelo A con y sin adición de DNasa de *A. oryzae* antes del lavado. La diferencia de color (valores L) se midió utilizando un Color Eye (espectrofotómetro de reflectancia Macbeth Color Eye 7000). Las mediciones se hicieron sin UV en la luz incidente y se extrajo el valor L del espacio de color CIE Lab. El presente ejemplo muestra que la DNasa de *A. oryzae* es estable en detergente líquido al igual que en el detergente líquido con varias proteasas y sistemas inhibidores de proteasa añadidos.

[0501] La proteasa 1 usada en este experimento es la SEQ ID N.º: 10 con la siguiente modificación M222S. La proteasa 2 es la SEQ ID N.º: 10 con la siguiente modificación: N76D+G195E. El sistema inhibidor de proteasa 1 es ácido 4-formil-fenil-borónico como se describe en la solicitud de patente WO 1996/041859. El sistema inhibidor de proteasa 2 es el compuesto Cbz-Gly-Ala-Tyr-H como se describe en la solicitud de patente WO 2009/118375.

Tabla 3

Composición detergente con mezcla de enzimas	Diferencia de color (valor L)		
	-18 °C	37 °C	Control
Detergente y sin DNasa y sin proteasa			84,7
Detergente y DNasa y sin proteasa			90,3
Detergente y DNasa y sin proteasa	89,5	89,2	
Detergente y DNasa y proteasa 1 y 2 g/l de sistema inhibidor de proteasa 1	91,0	90,7	
Detergente y DNasa y proteasa 1 y 4 g/l de sistema inhibidor de proteasa 1	89,5	88,7	
Detergente y DNasa y proteasa 1 y 2 g/l de sistema inhibidor de proteasa 2	89,7	90,3	
Detergente y DNasa y proteasa 2 y 2 g/l de sistema inhibidor de proteasa 1	91,5	90,8	
Detergente y DNasa y proteasa 2 y 2 g/l de sistema inhibidor de proteasa 2	90,3	89,7	

Ejemplo 7

Efecto añadido de la DNasa

[0502] Para investigar si los efectos observados de limpieza profunda y de blanqueamiento de la DNasa de *A. oryzae* son únicos para la DNasa de *A. oryzae* en comparación con la colada existente se realizó un estudio comparativo. Se cultivó *Brevundimonas sp*. en muestras redondas (diámetro de 2 cm) de poliéster (WFK30A) durante 1 día (véase el ejemplo 4 - preparación de muestras de donante).

[0503] Cinco muestras enjuagadas con *Brevundimonas sp*. se mezclaron con cinco muestras estériles en un tubo de ensayo de 50 mL y se adicionaron 10 mL de solución de lavado de detergente modelo A (para la composición, véase el ejemplo 4) que contenía 0,7 g/L de suciedad (Pigmentschmutz, 09V, wfk, Krefeld, Alemania) y enzima. Se usaron las siguientes enzimas: DNasa de *Aspergillus oryzae* (0,04 ppm) (SEQ ID Nº: 2), Celluclean™ 5000L (0,002 ppm), Celluclean™ 5.0T (0,001 ppm), Carezyme™ (0,2 ppm), Savinase™ (2,7 ppm), Lipex™ (0,06 ppm) y Stainzyme™ (0,2 ppm) (todas las enzimas suministradas por Novozymes A/S). La concentración en ppm representa la concentración de enzima en la solución de lavado. En paralelo, se hizo un control sin enzima adicionada.

[0504] Los tubos de ensayo se colocaron en un rotor Stuart (MiniLOM) durante 1 hora a 30 °C. Las muestras se enjuagaron dos veces con agua del grifo y se secaron en papel de filtro durante toda la noche. La diferencia de color (valor L) se midió utilizando un Color Eye (espectrofotómetro de reflectancia Macbeth Color Eye 7000). Las

mediciones se hicieron sin UV en la luz incidente y se extrajo el valor L del espacio de color CIE Lab. El presente ejemplo muestra que la DNasa de *A. oryzae* previene la deposición de la suciedad (antirredeposición) y mejora el blanqueamiento como la única de las enzimas para la colada evaluadas, lo que indica que el efecto de limpieza profunda y de blanqueamiento mediante la DNasa de *A. Oryzae* es un efecto añadido en comparación con las enzimas para la colada existentes.

Tabla 4

Enzima	Detergente	
	Detergente modelo A	Detergente modelo T
DNasa	89,6	89,6
Celluclean™ 5000L	83,6	-
Celluclean™ 5.0T	-	83,9
Carezyme™	83,2	83,1
Savinase™	83,8	84,9
Lipex™	82,4	84,4
Stainzyme™	82,2	83,6
Sin enzima	82,6	84,3

Ejemplo 8

Detección del olor de sudor en camisetas para correr

[0505] Dos camisetas blancas para correr hechas de 100 % poliéster se prelavaron en una lavadora utilizando 3,33 g/L de detergente modelo A.

[0506] Las dos camisetas fueron llevadas por una persona de prueba (hombre), una camiseta cada vez. La persona de prueba llevó cada una de las camisetas durante actividad física durante una hora. Después del llevado, una camiseta se lavó en una lavadora utilizando 3,33 g/L de detergente modelo A con la DNasa de la SEQ ID N.º: 2 (1 ppm), mientras que la segunda camiseta se lavó en una lavadora utilizando 3,33 g/L de detergente modelo A sin la DNasa (0 ppm). Las camisetas se lavaron como se describe en el lavado a escala completa descrito anteriormente y para el lavado se usaron 15 L de agua del grifo. Ambas camisetas se llevaron durante actividad física y luego se lavaron. Este ciclo de llevado y lavado se repitió 10 veces.

[0507] Para la evaluación del olor, una persona evaluadora formada investigó las camisetas antes del uso para olor a sudor (mal olor) oliendo las camisetas. Si se detectó olor a sudor, se añadió una marca (X) en la tabla siguiente. Las observaciones siguientes muestran que el lavado con DNasa durante 10 lavados previene la acumulación del olor.

Tabla 5

Número de uso	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Camiseta lavada sin DNasa	-	-	-	-	-	x	x	x	x	x
Camiseta lavada con DNasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Ejemplo 9

[0508] Este ejemplo muestra que la eliminación de manchas de enzimas como proteasa, amilasa, lipasa, mananasa, pectato liasa y celulasa en un lavado no se disminuye por la presencia de DNasa.

[0509] La eliminación de manchas se mostró en las siguientes manchas (enzima eficaz entre paréntesis): grasa de mantequilla C-S-10 (lipasa), leche con chocolate/hollín C-S-03 (proteasa), almidón de arroz con color C-S-28 (amilasa), goma de garrofín con pigmento C-S-73 (mananasa), harina de avena/chocolate C-S-54 (celulasa), todas de Center For Testmaterials BV, Países Bajos, y plátano fresco 013KC (pectato liasa) de Warwick Equest Ltd., Reino Unido.

[0510] Todas las manchas se cortaron en muestras de 4x9 cm excepto la grasa de mantequilla C-S-10, que se cortó en muestras de 5x5 cm y la mancha 013KC que era una mancha circular de Ø5 cm en una muestra de 10x10 cm. Dos muestras de cada mancha se fijaron a un paño de cocina (100 % algodón) con una grapadora. Se añadió un paño de cocina con las muestras manchadas fijadas a cada máquina junto con 3 kg de lastre consistente en: 3 camisetas (100 % algodón), 10 camisas de manga corta (55 % algodón, 45 % poliéster), 4 fundas de almohada (35 % algodón, 65 % poliéster) (110x75 cm), 1 sábana de cama pequeña (100 % algodón) (100x75 cm), y 4 paños de cocina (100 % algodón).

[0511] Los lavados se hicieron en lavadoras Miele Softtronic W2445 a 30 °C utilizando un programa de lavado estándar con 12-13 litros de agua para 3 kg de textil. Los lavados se hicieron con 3,33 g/L de detergente modelo

A como se ha descrito anteriormente en agua del grifo de Bagsværd y un medidor de conductividad HI 9635 de Hanna Instruments, Canadá, se usó para medir la conductividad del agua a 919 µS a 21 °C.

[0512] Las enzimas se añadieron a los 4 lavados en las cantidades que se describen en la tabla siguiente:

Tabla 6

Máquina	1	2	3	4
DNasa (SEQ ID N.º: 2)	-	0,04 ppm	-	0,04 ppm
Proteasa (Liquanase 2,5 L)	-	-	874 µL	874 µL
Amilasa (Amplify 12 L)	-	-	151 µL	151 µL
Lipasa (Lipex 100 L)	-	-	98 µL	98 µL
Mananasa (Mannaway 4 L)	-	-	100 µL	100 µL
Pectato liasa (Xpect 1000 L)	-	-	50 µL	50 µL
Celulasa (Celluclean 5000 L)	-	-	821 µL	821 µL

[0513] Las enzimas se añadieron a las lavadoras en vasos de precipitado de plástico separados disueltas en 100 mL de agua con 15 °dH (agua con 15 °dH: 3,00 mL de 0,713 mol/L de CaCl2, 1,50 mL de 0,357 mol/L de MgCl2 y 0,3371 g de NaHCO3 en un cilindro de medida de 1 L, relleno 1 L con agua MilliQ). Un vaso de precipitado de plástico separado se usó para la DNasa, otro vaso de precipitado de plástico se usó para la proteasa y las enzimas restantes (amilasa, lipasa, mananasa, pectato liasa y celulosa) se disolvieron en un tercer vaso de precipitado de plástico. Los vasos de precipitado se colocaron dentro del tambor de la lavadora antes de que se iniciara el lavado.

[0514] Después del lavado, las muestras se secaron durante toda la noche en papel de filtro y se midió la remisión a 460 nm como se ha descrito anteriormente. Las muestras de grasa de mantequilla C-S-10 se midieron 22 horas después del fin del lavado.

[0515] La remisión media a 460 nm para las muestras manchadas después del lavado se muestra en la tabla siguiente. A mayor valor de remisión, mayor limpieza de la muestra después del lavado.

Tabla 7

Máquina	1	2	3	4
Enzimas adicionadas:	No	DNasa	P, A, L, M, PL, C	P, A, L, M, PL, C + DNasa
Remisión a 460 nm				
Harina de avena/chocolate	40,35	9,64	57,22	58,30
Plátano fresco	52,50	47,61	68,37	73,97
Leche con chocolate	36,55	36,61	56,11	55,66
Goma de garrofín	42,63	44,05	55,11	54,65
Almidón de arroz	51,57	47,09	69,17	73,97
Grasa de mantequilla	52,48	52,06	56,44	56,58
P = proteasa, A = amilasa, L = lipasa, M = mananasa, PL = pectato liasa, C = celulasa				

[0516] Basándose en una prueba T bilateral (con varianza desigual), los valores de remisión medios para cada tipo de mancha en el lavado 3 no son significativamente diferentes estadísticamente del lavado 4 en un nivel de importancia del 5 %. Los resultados muestran que la eliminación de manchas de enzimas como proteasa, amilasa, lipasa, mananasa, pectato liasa y celulasa no se disminuye por la presencia de DNasa en un lavado.

Ejemplo 10

[0517] Un experimento de lavado se condujo en una colección de prendas para correr (sudaderas y camisetas para correr), que habían sido llevadas durante ejercicios de entrenamiento durante al menos 50 veces y lavadas entremedias. Durante los ejercicios de entrenamiento, las prendas para correr se mojan con sudor, pero generalmente no se ensucian. Las prendas para correr se habían lavado precedentemente en una Miele Softtronic W5825 a 30 °C (con baja carga de la máquina) usando BioTex Black (Unilever) en una dosis estándar recomendada.

[0518] Antes de conducir el presente experimento, la sudadera y la camiseta para correr (100 % poliéster) se evaluaron por un panelista de olores formado, que encontró un olor pronunciado de sudor agrio (mal olor), en particular presente en el sobaco de las prendas. El mal olor estaba presente después del lavado de la ropa usando BioTex Black y el mal olor se acumuló con el número de veces que se usaron las prendas para correr.

[0519] Las prendas para correr se lavaron en una Miele Softtronic W5825 a 30 °C (con baja carga de la máquina) usando dosis estándar de BioTex Black y una dosis de DNasa de *A. oryzae* (0,4 ppm) en la solución de lavado.

[0520] Entre cada uno de los ejercicios de entrenamiento, las prendas para correr se sometieron a otro ciclo de evaluación por el panelista de olores. El panelista de olores encontró que el mal olor se redujo significativamente y era apenas detectable después de 1 a 3 ciclos de lavado en presencia de la DNasa de *A. oryzae* de la presente invención. En un estudio ampliado, las prendas para correr se lavaron en presencia de la DNasa de *A. oryzae* de la presente invención cada vez que se lavaron las prendas. El panelista de olores descubrió que, cuando las prendas para correr se habían lavado en presencia de la DNasa de *A. oryzae*, se podían llevar durante al menos dos ejercicios de entrenamiento (permitiendo que las prendas se sequen sin lavar las prendas entre los ejercicios de entrenamiento) antes de que el mal olor fuera claramente detectable.

Ejemplo 11

Estabilidad de la DNasa de *Aspergillus oryzae*, estudio comparativo

Preparación del detergente de muestra

[0521] El detergente de muestra se preparó según las especificaciones en la tabla siguiente (tabla 8) y se almacenó durante cuatro semanas a temperatura constante (-18 °C, 30 °C y 37 °C, respectivamente).

Tabla 8

Nombre de detergente	DNasa en detergente	Savinase en detergente	DNasa en la solución de lavado	Savinase en la solución de lavado
Detergente modelo A	DNasa de BI: 120 ppm	0 ppm	DNasa de BI: 0,4 ppm	0 ppm
Detergente modelo A	DNasa de BI: 120 ppm	440 ppm	DNasa de BI: 0,4 ppm	1,5 ppm
Detergente modelo A	DNasa de Ao: 120 ppm	0 ppm	DNasa de Ao: 0,4 ppm	0 ppm
Detergente modelo A	DNasa de Ao: 120 ppm	440 ppm	DNasa de Ao: 0,4 ppm	1,5 ppm
Ariel Actilift Color & Style	DNasa de BI: 120 ppm	ND	DNasa de BI: 0,4 ppm	ND
Ariel Actilift Color & Style	DNasa de Ao: 120 ppm	ND	DNasa de Ao: 0,4 ppm	ND
DNasa de BI: DNasa de *Bacillus licheniformis* (el péptido maduro de la secuencia expuesta en la SEQ ID N.º 11); DNasa de Ao: DNasa de *Aspergillus oryzae*; Savinase (proteasa, secuencia expuesta en la SEQ ID N.º: 10), ND: ninguna información disponible.				

Preparación de muestras de donante con biopelícula

[0522] Se precultivó *Brevundimonas sp*. en agar de soja triptona (TSA) (pH 7,3) (CM0131; Oxoid Ltd, Basingstoke, Reino Unido) durante 2-5 días a 30 °C. A partir de una única colonia, un bucle completo se transfirió a 10 mL de TSB y se incubó durante 1 día a 30 °C con agitación (240 r.p.m.). Después de la propagación, se granuló *Brevundimonas sp.* mediante centrifugación (Sigma Laboratory Centrifuge 6K15) (3000 g a 21 °C en 7 min) y se resuspendió en 10 mL de TSB diluido dos veces con agua. La densidad óptica (OD) a 600 nm se midió utilizando un espectrofotómetro (POLARstar Omega (BMG Labtech, Ortenberg, Alemania). El TSB fresco diluido dos veces con agua se inoculó a una OD600nm de 0,03, y 20 mL se añadieron a una placa de Petri, donde se colocó una muestra de 5 cm x 5 cm de poliéster estéril WFK30A. Tras la incubación (24 h a 15 °C con agitación (100 r.p.m.), las muestras se enjuagaron dos veces con 0,9 % (p/v) de NaCl. Las muestras redondas (1 cm de diámetro) se perforaron posteriormente de las muestras de donante de 5 cm x 5 cm. Las muestras redondas se usaron para el experimento de lavado.

Lavado

[0523] La solución de lavado se preparó pesando la cantidad de detergente necesitada para el ensayo en un matraz, es decir, detergente modelo A 3,3 g/L; Ariel Actilift Color & Style 6,9 g/L disuelto en agua MilliQ estéril con una dureza de 15 °dH. La suciedad se preparó resuspendiendo la suciedad (Pigmentschmutz, 09V, wfk, Krefeld, Alemania) en agua del grifo y agitando la suspensión durante 30 min. antes del uso. La suciedad se añadió posteriormente a cada matraz de suciedad para alcanzar una concentración de 0,35 g de suciedad/L (Pigmentschmutz, 09V, wfk, Krefeld, Alemania) y los matraces se llenaron con agua del grifo hasta el volumen final (4 ml).

[0524] Las muestras redondas se colocaron en una placa de formato con 24 pocillos (dos muestras redondas obtenidas de la misma muestra de donante por pocillo). Un objeto de tensión mecánica (MSO), en forma de un objeto de metal alargado (1 cm) cubierto con plástico, se colocó en cada pocillo. La placa se colocó en un robot Hamilton y se sometió a un programa de simulación de lavado utilizando las siguientes condiciones: duración de

ciclo de lavado: 30 minutos con agitación (1000 r.p.m.); temperatura 30 °C; volumen de solución de lavado (total): 4 ml por pocillo. Durante el tiempo de lavado, la placa se agita de manera orbital para poner la solución de prueba en contacto con el textil y aplicar tensión mecánica de una manera oscilante regular periódica. Después de la finalización del ciclo de simulación de lavado, las muestras se quitaron de la solución de lavado y se dejaron secar en un papel de filtro. Las muestras secas se fijaron en una hoja de papel blanco para el escaneado.

[0525] El rendimiento del lavado se mide como el brillo del color del textil lavado. El brillo también se puede expresar como la intensidad de la luz reflejada desde la muestra cuando se ilumina con luz blanca. Cuando la muestra está manchada, la intensidad de la luz reflejada es inferior que la de una muestra limpia. Por lo tanto, la intensidad de la luz reflejada se puede utilizar para medir el rendimiento del lavado. Las mediciones de color se hacen con un escáner plano (EPSON V750 PRO), que se utiliza para capturar una imagen del textil lavado. Para extraer un valor para la intensidad de la luz a partir de las imágenes escaneadas, valores de píxeles de 24 bits de la imagen se convierten en valores para rojo, verde y azul (RGB). El valor de la intensidad (int) se calcula sumando los valores RGB como vectores y luego tomando la longitud del vector resultante:

$$Int = \sqrt{r^2 + g^2 + b^2}$$

Tabla 9

Detergente	Enzima(s)	Intensidad (-18 °C)	Intensidad (30 °C)	Intensidad (37 °C)	ΔIntensidad (-18 °C - 30 °C)	ΔIntensidad (-18 °C - 37 °C)
Detergente modelo A	DNasa de BI	439	439	438	< 5	< 5
Detergente modelo A	DNasa de BI + Savinase	436	430	416	5	20
Detergente modelo A	DNasa de Ao	439	438	437	< 5	< 5
Detergente modelo A	DNasa de Ao + Savinase	439	439	438	< 5	< 5
Ariel Actilift Colour & Style	DNasa de BI	439	438	439	65	26
Ariel Actilift Colour & Style	DNasa de Ao	439	438	439	< 5	< 5
Detergente modelo A	-	350				
Ariel Actilift Colour & Style	-	392				
DNasa de BI: DNasa de *Bacillus licheniformis* (el péptido maduro de la secuencia expuesta en la SEQ ID N.º 11); DNasa de Ao: DNasa de *Aspergillus oryzae*, Savinase (proteasa, secuencia expuesta en la SEQ ID N.º: 10).						

[0526] Conclusiones: este estudio comparativo demuestra que la DNasa de *Aspergillus oryzae* de la presente invención tiene una estabilidad superior hacia las proteasas en comparación con la DNasa de *Bacillus licheniformis* (el péptido maduro de la secuencia expuesta en la SEQ ID N.º 11).

Ejemplo 12

[0527] Estabilidad de la DNasa de *Aspergillus oryzae* y de la DNasa de *Bacillus licheniformis*, estudio comparativo en el ensayo con miniLOM.

[0528] Para comparar la estabilidad del almacenamiento de la DNasa de *Bacillus licheniformis* y la DNasa de *Aspergillus oryzae* de la presente invención, la estabilidad del almacenamiento de estos dos tipos de DNasa se configuró en el detergente modelo A y Ariel Actilift Colour & Style. Las muestras de detergente se prepararon como se describe en el ejemplo 11 y se almacenaron durante dos y cuatro semanas a una temperatura constante (-18 °C, 35 °C). La dosificación de la DNasa en la solución de lavado fue de 0,4 ppm. La dosificación de la proteasa (Savinase, secuencia expuesta en la SEQ ID N.º: 10)) en la solución de lavado fue de 0,15 ppm. Después del almacenamiento, el rendimiento del lavado se evaluó en el ensayo con miniLOM (descrito en este documento) usando muestras de biopelícula de *Brevundimonas sp*. de poliéster (preparadas como se describe en el ejemplo 11). El rendimiento del lavado se mide como el brillo del color del textil lavado. La diferencia de color (valores L) se midió utilizando un Color Eye (espectrofotómetro de reflectancia Macbeth Color Eye 7000). Las mediciones se hicieron sin UV en la luz incidente y se extrajo el valor L del espacio de color CIE Lab.

Tabla 10

Detergente	Tiempo de incubación	Enzimas	L (-18 °C)	L (35 °C)	ΔL
Detergente modelo A	2 semanas	DNasa de BI	90,6	90,5	< 0,5
Detergente modelo A	2 semanas	DNasa de BI + Savinase	91,5	84,6	6,9
Detergente modelo A	2 semanas	DNasa de Ao	90,4	90,5	< 0,5
Detergente modelo A	2 semanas	DNasa de Ao + Savinase	90,5	91,1	< 0,5

[0529] El detergente modelo A recientemente preparado sin enzimas dio una diferencia de color (L) de 82,6. Diferencia de Color (L), diferencia de color delta (ΔL). DNasa de BI: DNasa de *Bacillus licheniformis* (el péptido maduro de la secuencia expuesta en la SEQ ID N.º 11); DNasa de Ao: DNasa de *Aspergillus oryzae*.

Tabla 11

Detergente	Tiempo de incubación	Enzimas	L (-18 °C)	L (35 °C)	ΔL
Ariel Actilift Colour & Style	2 semanas	DNasa de BI	92,3	87,0	5,3
Ariel Actilift Colour & Style	2 semanas	DNasa de Ao	92,1	92,4	< 0,5
Detergente	**Tiempo de incubación**	**Enzimas**	**L (-18 °C)**	**L (37 °C)**	**ΔL**
Ariel Actilift Colour & Style	4 semanas	DNasa de BI	93,2	87,0	6,2
Ariel Actilift Colour & Style	4 semanas	DNasa de Ao	93,2	93,0	< 0,5

[0530] El detergente modelo A recientemente preparado sin enzimas dio una diferencia de color (L) de 86,9. Diferencia de color (L), diferencia de color delta (ΔL). DNasa de BI: DNasa de *Bacillus licheniformis* (el péptido maduro de la secuencia expuesta en la SEQ ID N.º 11); DNasa de Ao: DNasa de *Aspergillus oryzae*

[0531] Conclusiones: este estudio comparativo demuestra que la DNasa de *Aspergillus oryzae* tiene una estabilidad superior hacia las proteasas en comparación con la DNasa de *Bacillus licheniformis* (el péptido maduro de la secuencia expuesta en la SEQ ID N.º 11).

Ejemplo 13

Eliminación del olor mediante DNasa (nariz electrónica)

Preparación de muestras de ADN con E-2-nonenal

[0532] Se aisló ADN cromosómico de *Pseudomonas sp*. mediante QIAamp DNA Blood Mini Kit siguiendo las instrucciones del fabricabte (Qiagen, Hilden, Alemania). Las muestras de poliéster (WFK30A) (2 cm de diámetro) se esterilizaron en un autoclave Holm & Halby Systec DB-23 durante 60 minutos a 121 °C. Se añadieron 100 µl de ADN de *Pseudomonas sp*. purificado diluido a una concentración final de 1 ng/µl en cada una de las muestras sometidas a autoclave y las muestras se secaron bajo flujo continuo en un banco de flujo de aire laminar durante 2 horas. Tras el secado, 10 muestras con ADN se colocaron en un tubo NUNC estéril de 25 mL (364238; Thermo Scientific), y se añadieron 10 ml de E-2-nonenal 0,2 mM (255653; Sigma-Aldrich). El tubo se colocó en un rotor Stuart (20 r.p.m. a temperatura ambiente durante 20 min). Las 10 muestras se transfirieron a un tubo centrífugo 50 000 MWCO (VS203, Vivaspin 20, Satorius). Los tubos se centrifugaron a 3000 g a 21 °C en 1 min, y las 10 muestras se dividieron en 2 tubos NUNC estériles (364238; Thermo Scientific) con 5 muestras en cada tubo. Adicionalmente, se añadieron 5 muestras de poliéster estéril (WFK30A) (2 cm de diámetro) sin ADN y E-2-nonenal a cada uno de los tubos. Las muestras sin ADN se marcaron para permitir diferenciarlas de las muestras con ADN/E-2-nonenal.

Procedimiento de lavado de las muestras de ADN con E-2-nonenal

[0533] Se prepararon soluciones de lavado de Ariel Actilift Colour & Style en polvo y Ariel Actilift en polvo disolviendo 5,0 g de detergente en 1000 ml de agua MilliQ estéril con una dureza de 15 °dH (condiciones UE). Se preparó una solución de lavado de Tide Pods disolviendo 1,8 g del detergente de fase blanca en 1000 ml de agua milliQ estéril con una dureza de 6 °dH. Las soluciones de lavado se dejaron en un agitador magnético durante 20 min antes del uso.

[0534] La solución de lavado (10 ml) se añadió a cada uno de los dos tubos idénticos con 5 muestras de ADN con E-2-nonenal y 5 muestras estériles, se añadieron 10 µl de DNasa de *Aspergillus oryzae* de la presente invención a uno de los tubos dando como resultado una concentración final de 5 ppm. Los tubos se colocaron en

un rotador Stuart (20 r.p.m. a 30 °C durante 60 min). La solución de lavado se vertió fuera, y las muestras se enjuagaron dos veces con 20 mL de agua milliQ estéril con dureza 15 °dH. Las muestras de cada tubo se transfirieron a un tubo centrífugo de 50 000 MWCO (VS203, Vivaspin 20, Satorius) y se centrifugaron a 3000 g a 21 °C en 1 min. Cada muestra con E-2-nonenal se transfirió entonces a un frasco con espacio vacío GC de 20 mL, utilizando pinzas limpias estériles para colocar cada una de las muestras en cada frasco. Se analizaron luego en una nariz electrónica de cromatografía de gases Flash Alpha MOS HERACLES, equipada con una columna capilar Restek MXT-5, con un automuestreador HS100 y un detector FID.

Tabla 12. Intensidad de E-2-nonenal medida con nariz electrónica.

Detergente	Área de valor máximo (sin DNasa)	Área de valor máximo (con DNasa)	% de reducción
Ariel Actilift en polvo	108325	83177	23 %
Ariel Actilift Colour & Style en polvo	167288	122868	27 %
Tide pods	128945	80895	37 %

[0535] Conclusión: el olor retenido en el ADN en textiles se puede eliminar con la DNasa de *Aspergillus oryzae*, dando así como resultado una reducción del olor.

Ejemplo 14

Eliminación del olor mediante DNasa (análisis sensorial)

[0536] Se ensuciaron muestras de poliéster y de algodón (2 cm de diámetro) con ADN de *Pseudomonas sp*. y 0,5 mM de E-2-nonenal (255653; Aldrich Sigma) (véase el ejemplo 13 para los detalles de la preparación de las muestras de ADN) y se lavaron en un rotador Stuart durante 60 min a 30 °C en el detergente modelo A (preparado disolviendo 3,33 g en 1 litro de agua milliQ con dureza 15 °dH) en presencia o ausencia de DNasa de *Aspergillus oryzae* de la presente invención (5 ppm). Después del lavado, las muestras se enjuagaron dos veces en 20 ml de agua MilliQ con dureza de 15 °dH. Las muestras se evaluaron para la intensidad percibida de E-2-nonenal por cuatro panelistas de olores formados (donde las muestras eran ciegas). Para la evaluación se usó una escala de intensidad percibida de 0 a 9. 0 indicaba ninguna intensidad percibida de E-2-nonenal, mientras que 9 indicaba la mayor intensidad percibida de E-2-nonenal. Los resultados mostraron consenso entre los cuatros panelistas de olores.

Tabla 13

Tipo de textil	Adición de DNasa	Puntuación media de los cuatro panelistas de olores
Algodón	-	5,0
Algodón	+	1,3
Poliéster	-	6,3
Poliéster	+	2,8

[0537] El olor retenido en el ADN en el textil se puede eliminar con la DNasa de *Aspergillus oryzae* dando así como resultado una reducción del olor.

Ejemplo 15

Ensayo para la determinación visual de la eliminación del olor

[0538] Se cultivó *Brevundimonas sp*. en agar de soja triptona (TSA) (pH 7,3) (CM0131; Oxoid Ltd, Basingstoke, Reino Unido) durante 2-5 días a 30 °C. A partir de una única colonia, un bucle completo se transfirió a 10 mL de TSB y se incubó durante 20 horas a 30 °C con agitación (240 r.p.m.). Después de la propagación, se granuló *Brevundimonas sp.* por centrifugación (Sigma Laboratory Centrifuge 6K15) (3000 g a 21 °C en 7 min) y se resuspendió en 10 mL de TSB diluido dos veces con agua. La densidad óptica (OD) a 600 nm se midió utilizando un espectrofotómetro (POLARstar Omega (BMG Labtech, Ortenberg, Alemania). El TSB fresco diluido dos veces con agua se inoculó para una OD600nm de 0,03, y se añadieron 20 mL a una placa de Petri, donde se colocó una muestra de 5 cm x 5 cm de poliéster estéril WFK30A. Después de la incubación (24 h a 15 °C con agitación (75 r.p.m.), las muestras se enjuagaron dos veces con 0,9 % (p/v) de NaCl. Las muestras se lavaron en TOM o bien directamente después del enjuague o bien tras el secado durante 24 horas en un banco de LAF.

[0539] El agente indicador visual rojo de fenol en la solución se preparó disolviendo 0,1 g en 100 ml de etanol 99 %. Se añadió solución de indicador (50 µL) a un papel de filtro (diámetro de 2 cm) y se secó durante toda la noche en la campana extractora para formar un agente de captura de olores que incluye el agente indicador visual (rojo de fenol). Cuatro muestras lavadas se colocaron en el fondo de un contenedor de vidrio (un contenedor para cada muestra) y se añadieron 500 µL de TSB 17 %. Como un control, el poliéster textil limpio lavado se colocó en el fondo de otro contenedor de vidrio y se añadieron 500 µL de TSB 17 %. Los contenedores

con las muestras se incubaron a 37 °C. Los contenedores se monitorearon hasta 48 horas para detectar cambio de color del trazador rojo de fenol.

Tabla 14. Resultados de la incubación

Detergente	Sin enzima	DNasa de *Aspergillus oryzae* (10 ppm)
Tide Original	Rojo (24 h)	Amarillo (24 h)
Ariel sensitive White & Color	Rojo (48 h)	Amarillo (48 h)
Detergente modelo T	Rojo (24 h)	Amarillo (24 h)
Las horas en la tabla indican puntos temporales para cambio de color detectado.		

Ejemplo 16

Efecto de la presencia de DNasa en el detergente en la biopelícula de *Pseudomonas aeruginosa* en textil

[0540] Una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* aislada de la colada se usó en el presente ejemplo. La cepa de *P. aeruginosa* se precultivó en agar de soja triptona (TSA) (pH 7,3) (CM0131; Oxoid Ltd, Basingstoke, Reino Unido) durante 3 días a 30 °C. A partir de una única colonia, un bucle completo se transfirió a 10 mL de TSB y se incubó durante toda la noche a 30 °C con agitación (200 r.p.m.). Después de la propagación, el cultivo durante toda la noche se diluyó 1000 veces en el medio TSB fresco y 1,62 mL de esta dilución de cultivo se añadieron en cada pocillo de una microplaca de 12 pocillos de fondo plano de poliestireno (3512; Corning Incorporated, Corning, NY, EE.UU.), donde se colocaron muestras redondas (diámetro de 2 cm) de poliéster estéril (WFK30A). Después de 48 h a 30 °C con agitación (70 r.p.m.), se eliminó el medio de cultivo, y las muestras se enjuagaron dos veces con 3 mL de NaCl 0,9 % (p/v).

[0541] Cinco muestras enjuagadas con *P. aeruginosa* se colocaron en una probeta de ensayo de 50 mL y se adicionaron 10 mL de detergente líquido modelo A preparado en agua con dureza de 15 °dH con 0,7 g/L de suciedad de pigmento (Pigmentschmutz 09V, wfk, Krefeld, Alemania) y la DNasa de *Aspergillus oryzae* de la presente invención (0,1 ppm en la solución de lavado). Como control, se realizó un lavado sin DNasa en paralelo. El lavado se realizó en un rotador Stuart durante 1 hora a 30 °C (ensayo con miniLOM como se ha descrito en este documento). La solución de lavado se eliminó, y las muestras se enjuagaron dos veces con agua del grifo y se secaron en papel de filtro durante toda la noche.

[0542] La diferencia de color (valor L en el espacio de color L*a*b) se midió utilizando un cabezal de cromómetro Minolta CR-300 y un procesador de datos Minolta DP-301. La diferencia de color (valor L, L*) representa el negro más oscuro a L* = 0, y el blanco más brillante a L* = 100.

[0543] Los resultados muestran que la DNasa es capaz de reducir la pegajosidad y/o reducir la cantidad de la biopelícula de *P. aeruginosa* en el textil.

Tabla 15. Efecto de la DNasa en el detergente en la biopelícula de *Pseudomonas aeruginosa* en textil.

Concentración de DNasa (ppm)	Valor L	Valor L (con DNasa) - Valor L (sin DNasa)
0	84,6	
0,1	87,3	2,7

Ejemplo 17

Rendimiento del lavado de DNasa en presencia de abrillantador óptico

Materiales y métodos

Preparación de muestras de biopelícula

[0544] Se prepararon muestras redondas (diámetro de 2 cm) de poliéster estéril WFK30A con biopelícula de *Brevundimonas sp.* como se describe en el ejemplo 4.

Experimento de lavado

[0545] Se preparó solución de lavado de detergente modelo T en polvo sin blanqueador disolviendo detergente (5,33 g/l) en agua con dureza de 15 °dH. El componente AEO Biosoft N25-7 (NI) (0,16 g/l) del detergente modelo T se añadió por separado. La suciedad de pigmento (Pigmentschmutz, 09V, wfk, Krefeld, Alemania) (0,7 g/L) se añadió a la solución de lavado. La solución de lavado (10 ml) se añadió a un tubo de 50 ml con cinco muestras enjuagadas con *Brevundimonas sp.* y cinco muestras de poliéster estéril (WFK30A). En los lavados donde se incluía DNasa, se añadió DNasa (0,5 ppm). En los lavados donde se incluía abrillantador óptico, se añadió Tinopal CBS-X (0,1 g/l) a la solución de lavado. El lavado se realizó en rotador Stuart durante 1 hora a 30 °C (ensayo con miniLOM como se ha descrito en este documento). Después del lavado, las muestras con

Brevundimonas sp. se enjuagaron dos veces en agua del grifo y se secaron en papel de filtro durante toda la noche. La diferencia de color (valores L) se midió utilizando un Color Eye (espectrofotómetro de reflectancia Macbeth Color Eye 7000). Las mediciones se hicieron sin UV en la luz incidente y se extrajo el valor L del espacio de color CIE Lab.

Tabla 16. Rendimiento del lavado de la DNasa en presencia de un abrillantador óptico.

Detergente modelo T (g/l) + NI (g/l)	CBS-X (g/l)	DNasa de *A. oryzae* (ppm)	Valor L	Valor L Delta (Valor L - valor L (sin abrillantador óptico, sin DNasa)
5,33 + 0,16	0	0	85,4	
5,33 + 0,16	0	0,5	89,3	3,9
5,33 + 0,16	0,1	0	83,9	< 0
5,33 + 0,16	0,1	0,5	89,3	0

[0546] Los datos presentados en la tabla 16 demuestran que el rendimiento del lavado de la DNasa de *A. oryzae* de la presente invención no se ve afectado por la presencia de un abrillantador óptico.

Listado de secuencias

[0547]

<110> Novozymes A/S

<120> Composición detergente

<130> 12785-WO-PCT

<160> 12

<170> Versión de PatentIn 3.5

<210> 1
<211> 910
<212> ADN
<213> Aspergillus oryzae

<220>
<221> exón
<222> (1)..(242)

<220>
<221> Intrón
<222> (243)..(308)

<220>
<221> exón
<222> (309)..(494)

<220>
<221> Intrón
<222> (495)..(555)

<220>
<221> exón
<222> (556)..(714)

<220>
<221> Intrón
<222> (715)..(765)

<220>
<221> exón
<222> (766)..(907)

<220>
<221> Intrón

<222> (908)..(910)

<400> 1

```
atg cag ctt act aag tcc ctc ctg gta ttc gcg ctt tac atg ttt ggc          48
Met Gln Leu Thr Lys Ser Leu Leu Val Phe Ala Leu Tyr Met Phe Gly
1               5                   10                  15

act cag cac gtt cta gct gtg cct gtc aat ccc gag cct gat gct acg          96
Thr Gln His Val Leu Ala Val Pro Val Asn Pro Glu Pro Asp Ala Thr
            20                  25                  30

agc gtc gaa aat gtt gcc ctt aaa aca ggc agc ggt gat agc cag agc         144
Ser Val Glu Asn Val Ala Leu Lys Thr Gly Ser Gly Asp Ser Gln Ser
        35                  40                  45
```

```
gat ccc atc aag gcg gac ttg gag gtc aaa ggc caa agt gct ttg cct        192
Asp Pro Ile Lys Ala Asp Leu Glu Val Lys Gly Gln Ser Ala Leu Pro
    50                  55                  60

ttc gac gtc gac tgc tgg gct atc ctg tgc aag ggc gcc ccg aat gtc        240
Phe Asp Val Asp Cys Trp Ala Ile Leu Cys Lys Gly Ala Pro Asn Val
65                  70                  75                  80

ct  gtatgtcttc ctttattgaa gctcttgatg tggcttgtat gtttgactaa             292
Leu

tatatcgcac ccttag g cag cgc gtg aat gaa aag acg aaa aat agt aat        342
                   Gln Arg Val Asn Glu Lys Thr Lys Asn Ser Asn
                                85                  90

cgc gat cgg agc ggt gcg aac aaa ggg cct ttc aaa gat cct cag aaa        390
Arg Asp Arg Ser Gly Ala Asn Lys Gly Pro Phe Lys Asp Pro Gln Lys
        95                  100                 105

tgg ggc atc aaa gcc ctt cca cct aag aat cca tcc tgg agc gca caa        438
Trp Gly Ile Lys Ala Leu Pro Pro Lys Asn Pro Ser Trp Ser Ala Gln
    110                 115                 120

gac ttc aaa tca ccc gaa gaa tac gca ttt gcg tct tcc ctt caa ggc        486
Asp Phe Lys Ser Pro Glu Glu Tyr Ala Phe Ala Ser Ser Leu Gln Gly
125                 130                 135                 140

gga acc aa  gtatgctaag atcatcactg cttcaatcaa tgtgttgtta              534
Gly Thr Asn

gctgactccg atgtgaccaa g t gcc atc cta gcg ccc gtc aac ctc gct tct      586
                         Ala Ile Leu Ala Pro Val Asn Leu Ala Ser
                             145                 150

cag aac tcc caa ggc ggc gtc ttg aac ggt ttc tac tcg gcg aac aaa        634
Gln Asn Ser Gln Gly Gly Val Leu Asn Gly Phe Tyr Ser Ala Asn Lys
    155                 160                 165

gta gca caa ttt gat cct agc aag ccc caa cag aca aag gga aca tgg        682
Val Ala Gln Phe Asp Pro Ser Lys Pro Gln Gln Thr Lys Gly Thr Trp
170                 175                 180                 185

ttt cag atc act aag ttc aca ggt gca gct gg  gtaagaactt ccagtaccat      734
Phe Gln Ile Thr Lys Phe Thr Gly Ala Ala Gly
                190                 195

ggtcatatgc aatttactaa gaaaatacta g t cct tac tgc aag gct ctg ggg      787
                                    Pro Tyr Cys Lys Ala Leu Gly
                                        200

agt aat gat aag agt gtg tgc gat aag aac aag aat att gca ggg gac        835
Ser Asn Asp Lys Ser Val Cys Asp Lys Asn Lys Asn Ile Ala Gly Asp
    205                 210                 215

tgg ggc ttc gac ccg gcg aaa tgg gca tat cag tat gat gag aag aat        883
Trp Gly Phe Asp Pro Ala Lys Trp Ala Tyr Gln Tyr Asp Glu Lys Asn
220                 225                 230                 235

aac aag ttc aac tat gtt ggt aag taa                                   910
Asn Lys Phe Asn Tyr Val Gly Lys
                240
```

<210> 2
<211> 243
<212> PRT
<213> Aspergillus oryzae

<220>
<221> SEÑAL
<222> (1)..(22)

<220>
<221> PROPEP
<222> (23)..(37)

<220>
<221> CADENA
<222> (38)..(243)
<223> polipéptido maduro

<400> 2

```
Met Gln Leu Thr Lys Ser Leu Leu Val Phe Ala Leu Tyr Met Phe Gly
1               5                  10                  15

Thr Gln His Val Leu Ala Val Pro Val Asn Pro Glu Pro Asp Ala Thr
            20                  25                  30

Ser Val Glu Asn Val Ala Leu Lys Thr Gly Ser Gly Asp Ser Gln Ser
        35                  40                  45

Asp Pro Ile Lys Ala Asp Leu Glu Val Lys Gly Gln Ser Ala Leu Pro
    50                  55                  60

Phe Asp Val Asp Cys Trp Ala Ile Leu Cys Lys Gly Ala Pro Asn Val
65                  70                  75                  80

Leu Gln Arg Val Asn Glu Lys Thr Lys Asn Ser Asn Arg Asp Arg Ser
                85                  90                  95

Gly Ala Asn Lys Gly Pro Phe Lys Asp Pro Gln Lys Trp Gly Ile Lys
            100                 105                 110

Ala Leu Pro Pro Lys Asn Pro Ser Trp Ser Ala Gln Asp Phe Lys Ser
        115                 120                 125

Pro Glu Glu Tyr Ala Phe Ala Ser Ser Leu Gln Gly Gly Thr Asn Ala
    130                 135                 140

Ile Leu Ala Pro Val Asn Leu Ala Ser Gln Asn Ser Gln Gly Gly Val
145                 150                 155                 160
```

Leu Asn Gly Phe Tyr Ser Ala Asn Lys Val Ala Gln Phe Asp Pro Ser
165 170 175

Lys Pro Gln Gln Thr Lys Gly Thr Trp Phe Gln Ile Thr Lys Phe Thr
180 185 190

Gly Ala Ala Gly Pro Tyr Cys Lys Ala Leu Gly Ser Asn Asp Lys Ser
195 200 205

Val Cys Asp Lys Asn Lys Asn Ile Ala Gly Asp Trp Gly Phe Asp Pro
210 215 220

Ala Lys Trp Ala Tyr Gln Tyr Asp Glu Lys Asn Asn Lys Phe Asn Tyr
225 230 235 240

Val Gly Lys

<210> 3
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador oJAL316

<400> 3
gacggatcca ccatgcagct tactaagtcc ct 32

<210> 4
<211> 31
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador oJAL317

<400> 4
gacctcgagt tacttaccaa catagttgaa c 31

<210> 5
<211> 931
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Fragmento PCR

<400> 5
gacggatcca ccatgcagct tactaagtcc ctcctggtat tcgcgcttta catgtttggc 60

actcagcacg ttctagctgt gcctgtcaat cccgagcctg atgctacgag cgtcgaaaat 120

gttgccctta aaacaggcag cggtgatagc cagagcgatc ccatcaaggc ggacttggag 180

gtcaaaggcc aaagtgcttt gcctttcgac gtcgactgct gggctatcct gtgcaagggc 240

gccccgaatg tcctgtatgt cttcctttat tgaagctctt gatgtggctt gtatgtttga 300

ctaatatatc gcacccttag gcagcgcgtg aatgaaaaga cgaaaaatag taatcgcgat 360

cggagcggtg cgaacaaagg gcctttcaaa gatcctcaga aatggggcat caaagccctt 420

ccacctaaga atccatcctg gagcgcacaa gacttcaaat cacccgaaga atacgcattt 480

gcgtcttccc ttcaaggcgg aaccaagtat gctaagatca tcactgcttc aatcaatgtg 540

ttgttagctg actccgatgt gaccaagtgc catcctagcg cccgtcaacc tcgcttctca 600

gaactcccaa ggcggcgtct tgaacggttt ctactcggcg aacaaagtag cacaatttga 660

tcctagcaag ccccaacaga caaagggaac atggtttcag atcactaagt tcacaggtgc 720

agctgggtaa gaacttccag taccatggtc atatgcaatt tactaagaaa atactagtcc 780

ttactgcaag gctctgggga gtaatgataa gagtgtgtgc gataagaaca agaatattgc 840

aggggactgg ggcttcgacc cggcgaaatg ggcatatcag tatgatgaga agaataacaa 900

gttcaactat gttggtaagt aactcgaggt c 931

<210> 6
<211> 7
<212> PRT
<213> Aspergillus oryzae

<400> 6

Ala Leu Lys Thr Gly Ser Gly
1 5

<210> 7
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> aminoácidos

<400> 7

Lys Thr Gly Ser Gly Asp Ser
1 5

<210> 8
<211> 206
<212> PRT
<213> Aspergillus oryzae

<220>
<221> CADENA
<222> (1)..(206)
<223> Polipéptido maduro

<400> 8

```
Ala Leu Lys Thr Gly Ser Gly Asp Ser Gln Ser Asp Pro Ile Lys Ala
1               5                   10                  15

Asp Leu Glu Val Lys Gly Gln Ser Ala Leu Pro Phe Asp Val Asp Cys
            20                  25                  30

Trp Ala Ile Leu Cys Lys Gly Ala Pro Asn Val Leu Gln Arg Val Asn
        35                  40                  45

Glu Lys Thr Lys Asn Ser Asn Arg Asp Arg Ser Gly Ala Asn Lys Gly
    50                  55                  60

Pro Phe Lys Asp Pro Gln Lys Trp Gly Ile Lys Ala Leu Pro Pro Lys
65                  70                  75                  80

Asn Pro Ser Trp Ser Ala Gln Asp Phe Lys Ser Pro Glu Glu Tyr Ala
                85                  90                  95

Phe Ala Ser Ser Leu Gln Gly Gly Thr Asn Ala Ile Leu Ala Pro Val
            100                 105                 110

Asn Leu Ala Ser Gln Asn Ser Gln Gly Gly Val Leu Asn Gly Phe Tyr
        115                 120                 125

Ser Ala Asn Lys Val Ala Gln Phe Asp Pro Ser Lys Pro Gln Gln Thr
    130                 135                 140

Lys Gly Thr Trp Phe Gln Ile Thr Lys Phe Thr Gly Ala Ala Gly Pro
145                 150                 155                 160

Tyr Cys Lys Ala Leu Gly Ser Asn Asp Lys Ser Val Cys Asp Lys Asn
                165                 170                 175

Lys Asn Ile Ala Gly Asp Trp Gly Phe Asp Pro Ala Lys Trp Ala Tyr
            180                 185                 190

Gln Tyr Asp Glu Lys Asn Asn Lys Phe Asn Tyr Val Gly Lys
        195                 200                 205
```

<210> 9
<211> 204
<212> PRT
<213> Aspergillus oryzae

<220>
<221> CADENA
<222> (1)..(204)
<223> polipéptido maduro

<400> 9

```
Lys Thr Gly Ser Gly Asp Ser Gln Ser Asp Pro Ile Lys Ala Asp Leu
1               5                  10                  15

Glu Val Lys Gly Gln Ser Ala Leu Pro Phe Asp Val Asp Cys Trp Ala
            20                  25                  30

Ile Leu Cys Lys Gly Ala Pro Asn Val Leu Gln Arg Val Asn Glu Lys
        35                  40                  45

Thr Lys Asn Ser Asn Arg Asp Arg Ser Gly Ala Asn Lys Gly Pro Phe
    50                  55                  60

Lys Asp Pro Gln Lys Trp Gly Ile Lys Ala Leu Pro Pro Lys Asn Pro
65                  70                  75                  80

Ser Trp Ser Ala Gln Asp Phe Lys Ser Pro Glu Glu Tyr Ala Phe Ala
                85                  90                  95

Ser Ser Leu Gln Gly Gly Thr Asn Ala Ile Leu Ala Pro Val Asn Leu
            100                 105                 110

Ala Ser Gln Asn Ser Gln Gly Gly Val Leu Asn Gly Phe Tyr Ser Ala
        115                 120                 125

Asn Lys Val Ala Gln Phe Asp Pro Ser Lys Pro Gln Gln Thr Lys Gly
    130                 135                 140

Thr Trp Phe Gln Ile Thr Lys Phe Thr Gly Ala Ala Gly Pro Tyr Cys
145                 150                 155                 160

Lys Ala Leu Gly Ser Asn Asp Lys Ser Val Cys Asp Lys Asn Lys Asn
                165                 170                 175

Ile Ala Gly Asp Trp Gly Phe Asp Pro Ala Lys Trp Ala Tyr Gln Tyr
            180                 185                 190

Asp Glu Lys Asn Asn Lys Phe Asn Tyr Val Gly Lys
        195                 200
```

<210> 10
<211> 269
<212> PRT
<213> Bacillus lentus

<400> 10

```
Ala Gln Ser Val Pro Trp Gly Ile Ser Arg Val Gln Ala Pro Ala Ala
1               5                  10                  15

His Asn Arg Gly Leu Thr Gly Ser Gly Val Lys Val Ala Val Leu Asp
            20                  25                  30

Thr Gly Ile Ser Thr His Pro Asp Leu Asn Ile Arg Gly Gly Ala Ser
        35                  40                  45

Phe Val Pro Gly Glu Pro Ser Thr Gln Asp Gly Asn Gly His Gly Thr
    50                  55                  60

His Val Ala Gly Thr Ile Ala Ala Leu Asn Asn Ser Ile Gly Val Leu
65                  70                  75                  80

Gly Val Ala Pro Ser Ala Glu Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu Gly Ala
                85                  90                  95

Ser Gly Ser Gly Ser Val Ser Ser Ile Ala Gln Gly Leu Glu Trp Ala
            100                 105                 110

Gly Asn Asn Gly Met His Val Ala Asn Leu Ser Leu Gly Ser Pro Ser
        115                 120                 125

Pro Ser Ala Thr Leu Glu Gln Ala Val Asn Ser Ala Thr Ser Arg Gly
    130                 135                 140

Val Leu Val Val Ala Ala Ser Gly Asn Ser Gly Ala Gly Ser Ile Ser
145                 150                 155                 160

Tyr Pro Ala Arg Tyr Ala Asn Ala Met Ala Val Gly Ala Thr Asp Gln
                165                 170                 175

Asn Asn Asn Arg Ala Ser Phe Ser Gln Tyr Gly Ala Gly Leu Asp Ile
            180                 185                 190

Val Ala Pro Gly Val Asn Val Gln Ser Thr Tyr Pro Gly Ser Thr Tyr
        195                 200                 205

Ala Ser Leu Asn Gly Thr Ser Met Ala Thr Pro His Val Ala Gly Ala
    210                 215                 220

Ala Ala Leu Val Lys Gln Lys Asn Pro Ser Trp Ser Asn Val Gln Ile
225                 230                 235                 240

Arg Asn His Leu Lys Asn Thr Ala Thr Ser Leu Gly Ser Thr Asn Leu
                245                 250                 255

        Tyr Gly Ser Gly Leu Val Asn Ala Glu Ala Ala Thr Arg
                    260                 265
```

<210> 11
<211> 142
<212> PRT
<213> Bacillus licheniformis

<220>
<221> SEÑAL
<222> (1)..(33)

<220>
<221> CADENA
<222> (34)..(142)
<223> Polipéptido maduro

<400> 11

```
Met Ile Lys Lys Trp Ala Val His Leu Leu Phe Ser Ala Leu Val Leu
1               5                   10                  15

Leu Gly Leu Ser Gly Gly Ala Ala Tyr Ser Pro Gln His Ala Glu Gly
            20                  25                  30

Ala Ala Arg Tyr Asp Asp Ile Leu Tyr Phe Pro Ala Ser Arg Tyr Pro
        35                  40                  45

Glu Thr Gly Ala His Ile Ser Asp Ala Ile Lys Ala Gly His Ser Asp
    50                  55                  60

Val Cys Thr Ile Glu Arg Ser Gly Ala Asp Lys Arg Arg Gln Glu Ser
65                  70                  75                  80

Leu Lys Gly Ile Pro Thr Lys Pro Gly Phe Asp Arg Asp Glu Trp Pro
                85                  90                  95

Met Ala Met Cys Glu Glu Gly Gly Lys Gly Ala Ser Val Arg Tyr Val
            100                 105                 110

Ser Ser Ser Asp Asn Arg Gly Ala Gly Ser Trp Val Gly Asn Arg Leu
        115                 120                 125

Ser Gly Phe Ala Asp Gly Thr Arg Ile Leu Phe Ile Val Gln
    130                 135                 140
```

<210> 12
<211> 732
<212> ADN
<213> Aspergillus oryzae

<400> 12

atgcagctta ctaagtccct cctggtattc gcgctttaca tgtttggcac tcagcacgtt 60

ctagctgtgc ctgtcaatcc cgagcctgat gctacgagcg tcgaaaatgt tgcccttaaa 120

acaggcagcg gtgatagcca gagcgatccc atcaaggcgg acttggaggt caaaggccaa 180

agtgctttgc ctttcgacgt cgactgctgg gctatcctgt gcaagggcgc cccgaatgtc 240

ctgcagcgcg tgaatgaaaa gacgaaaaat agtaatcgcg atcggagcgg tgcgaacaaa 300

gggcctttca aagatcctca gaaatggggc atcaaagccc ttccacctaa gaatccatcc 360

tggagcgcac aagacttcaa atcacccgaa gaatacgcat ttgcgtcttc ccttcaaggc 420

ggaaccaatg ccatcctagc gcccgtcaac ctcgcttctc agaactccca aggcggcgtc 480

ttgaacggtt tctactcggc gaacaaagta gcacaatttg atcctagcaa gccccaacag 540

acaaagggaa catggtttca gatcactaag ttcacaggtg cagctggtcc ttactgcaag 600

gctctgggga gtaatgataa gagtgtgtgc gataagaaca agaatattgc aggggactgg 660

ggcttcgacc cggcgaaatg ggcatatcag tatgatgaga agaataacaa gttcaactat 720

gttggtaagt aa 732

REIVINDICACIONES

1. Uso de un polipéptido que tiene actividad de DNasa para prevenir, reducir o eliminar una biopelícula de un artículo, donde el polipéptido se obtiene a partir de una fuente fúngica y el artículo es un textil y donde el polipéptido que tiene actividad de DNasa tiene al menos el 80 % de identidad de secuencia con el polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 9.

2. Uso según la reivindicación 1 para prevenir, reducir o eliminar la pegajosidad del artículo.

3. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 para pretratar las manchas en el artículo.

4. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-3 para prevenir, reducir o eliminar la redeposición de la suciedad durante un ciclo de lavado.

5. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para prevenir, reducir o eliminar la adherencia de la suciedad al artículo.

6. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores para mantener o mejorar la blancura del artículo.

7. Uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el mal olor se reduce o se elimina del artículo.

8. Composición detergente que comprende un polipéptido que tiene actividad de desoxirribonucleasa (DNasa) y un ingrediente adjunto detergente, donde el polipéptido se obtiene a partir de una fuente fúngica y, donde el polipéptido se obtiene de *Aspergillus*.

9. Composición detergente según la reivindicación 8, donde el ingrediente adjunto detergente se selecciona del grupo que consiste en tensioactivos, adyuvantes, auxiliares de floculación, agentes quelantes, inhibidores de la transferencia de tintes, enzimas, estabilizadores enzimáticos, inhibidores enzimáticos, materiales catalíticos, activadores de blanqueo, peróxido de hidrógeno, fuentes de peróxido de hidrógeno, perácidos preformados, agentes de dispersión poliméricos, agentes de eliminación/antirredeposición de la suciedad arcillosa, abrillantadores, supresores de jabonadura, tintes, perfumes, agentes elastizantes de la estructura, suavizantes de tejidos, portadores, hidrótropos, adyuvantes y coadyuvantes, agentes de matizado de tejidos, agentes antiespumantes, dispersantes, auxiliares de procesamiento, y/o pigmentos.

10. Composición detergente según la reivindicación 8, donde el ingrediente adjunto es una proteasa.

11. Método de lavado para el lavado de un artículo que incluye las etapas de:

a. Exponer un artículo a una solución de lavado que comprende un polipéptido donde el polipéptido que tiene actividad de DNasa tiene al menos el 80 % de identidad de secuencia con el polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 9 o una composición detergente según cualquiera de las reivindicaciones 8-10;
b. Completar al menos un ciclo de lavado; y
c. Opcionalmente enjuagar el artículo,

donde el artículo es un textil.