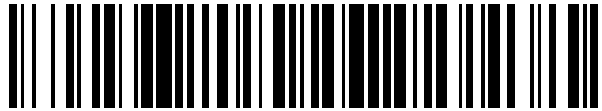


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 547 135**

51 Int. Cl.:

**C02F 3/34** (2006.01)

**C02F 1/72** (2006.01)

**C02F 101/30** (2006.01)

**C02F 103/28** (2006.01)

**C02F 103/30** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.03.2010 E 10706881 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.06.2015 EP 2403809**

54 Título: **Método de decoloración oxidativa de tintes con perácido generado enzimáticamente**

30 Prioridad:

**03.03.2009 US 157099 P**

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

**02.10.2015**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**BARNETT, CHRISTOPHER C. y  
SALA, RAFAEL F.**

74 Agente/Representante:

**RIZZO, Sergio**

**ES 2 547 135 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

**Método de decoloración oxidativa de tintes con perácido generado enzimáticamente**5 **PRIORIDAD**

**[0001]** La presente solicitud reivindica prioridad de la solicitud provisional de los Estados Unidos n. ° serie 61/157.099 presentada el 3 de marzo de 2009.

10 **CAMPO TÉCNICO**

**[0002]** Los métodos se refieren a la decoloración de moléculas de tinte en un medio acuoso por medio de perácido generado enzimáticamente.

15 **ANTECEDENTES**

**[0003]** El teñido de materiales textiles no es un proceso eficaz, puesto que gran parte del tinte empleado para teñir textiles se queda en el medio de tinte. Puesto que varía la composición exacta del medio de tinte parcialmente empobrecido, la reutilización del medio de tinte empobrecido puede producir resultados inconsistentes. En consecuencia, normalmente se descarta este medio de tinte residual, lo que da lugar a la liberación de grandes cantidades de aguas residuales contaminadas con tinte al medio ambiente. El efluente industrial coloreado puede provocar un daño considerable al ecosistema, por ejemplo debido a sus efectos sobre la actividad de fotosíntesis de los organismos acuáticos a consecuencia de una escasa penetración de la luz.

**[0004]** Las técnicas convencionales de tratamiento aplicadas a las aguas residuales textiles para la eliminación de tinte incluyen métodos físicos (coagulación/floculación), filtración a través de membrana (ultrafiltración, ósmosis inversa) y supresión mediante adsorción en carbón activo. Dichos métodos son costosos y también dan lugar a una transferencia de fase de contaminantes. Los métodos microbiológicos actuales no son una solución eficaz para el tratamiento de las aguas residuales debido a las complejas estructuras de algunos tintes que los hacen resistentes a la biodegradación.

**[0005]** Por lo general, la descomposición química de un tinte se lleva a cabo de dos maneras distintas. El tinte puede eliminarse parcialmente por medio de soluciones diluidas de ácido clorhídrico o ácido fórmico en un proceso conocido como «avivamiento». De manera alternativa, el tinte puede descomponerse mediante reductores, agentes oxidantes y auxiliares corrosivos en un proceso conocido como «desmontado».

**[0006]** La oxidación mediante peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) se utiliza normalmente porque se generan subproductos más limpios en comparación con agentes como el cloro o la lejía convencional (es decir, hipoclorito). El  $H_2O_2$  es conocido por no resultar eficaz con tintes antraquinónicos o azoicos, que se emplean en general y que tienen un importante impacto medioambiental. Asimismo, la reacción de decoloración con  $H_2O_2$  es lenta. Los métodos de decoloración oxidativa más rápidos emplean un proceso de procesos de oxidación avanzada (POA), que normalmente usan ozono ( $O_3$ ), ozono activado con luz ultravioleta (UV)/ $O_3$ , peróxido de hidrógeno activado con UV (UV/  $H_2O_2$ ) o «activadores» que generan agentes oxidantes más fuertes como los perácidos. Dichos procesos pueden ser prohibitivamente caros a gran escala, por ejemplo debido al coste de los activadores químicos o de la energía ultravioleta.

**[0007]** El desmontado se realiza normalmente con ditionita de sodio alcalino, clorato de sodio, hipoclorito de sodio o dióxido de tiourea. Estos productos químicos no son respetuosos con el medio ambiente y, desde un aspecto sanitario y de seguridad, exigen un manejo cuidadoso.

**[0008]** Existe la necesidad de métodos más eficaces y respetuosos con el medio ambiente para la decoloración de tintes.

**[0009]** El documento WO 2005/056782 da a conocer métodos y composiciones que comprenden al menos una enzima perhidrolasa, un sustrato para la enzima perhidrolasa y una fuente de peróxido de hidrógeno para limpieza y otras aplicaciones. El documento WO 2008/140988 da a conocer composiciones estables que comprenden una enzima perhidrolasa, una fuente de peróxido de hidrógeno y un sustrato de éster que genera eficazmente soluciones acuosas de perácidos. El documento WO 2007/103050 da a conocer composiciones de perhidrolasa y métodos para el uso de perhidrolasa para blanquear los dientes. El documento WO 2008/019069 da a conocer métodos para manipular enzimas pertenecientes a la clase de enzimas conocidas como hidrolasas SGNH y alfa/beta hidrolasas para crear composiciones que comprenden al menos una enzima adecuada para el uso en acilación enzimática acuosa y/o perhidrólisis.

## SUMARIO

**[0010]** Se proporcionan métodos para la decoloración de un tinte en un medio acuoso.

5 **[0011]** En la presente memoria se da a conocer un método para decolorar un tinte, que comprende la puesta en contacto del tinte con una composición que comprende: una enzima perhidrolasa, un sustrato para la enzima perhidrolasa y una fuente de peróxido de hidrógeno; donde un perácido es producido por acción catalítica de la enzima perhidrolasa sobre el sustrato en presencia de peróxido de hidrógeno; y donde el tinte se pone en contacto con la composición durante un periodo de tiempo y en unas condiciones adecuadas para producir una cantidad de perácido suficiente para decolorar al menos una parte del tinte.

10 **[0012]** También se da a conocer en la presente memoria un método para decolorar un tinte, que incluye la puesta en contacto del tinte con un perácido generado enzimáticamente, donde el perácido decolora el tinte en mayor medida que con una composición equivalente que carece de perácido generado enzimáticamente. También se da a conocer en la presente memoria un método para decolorar un tinte, que incluye la puesta en contacto del tinte con una composición que incluye una enzima perhidrolasa, un sustrato para la enzima perhidrolasa y una fuente de peróxido de hidrógeno, donde un perácido es producido por acción catalítica de la enzima perhidrolasa sobre el sustrato en presencia de peróxido de hidrógeno, donde el tinte se pone en contacto con la posición durante un periodo de tiempo y en condiciones adecuadas para producir una cantidad de perácido suficiente para decolorar el tinte, lo que incluye cambiar el tono, matiz, tinta o brillo del tinte. La invención está definida por las reivindicaciones.

15 **[0013]** El tinte está presente en efluente de aguas residuales. En algunas formas de realización, el efluente de aguas residuales procede de un proceso de elaboración textil. En algunas formas de realización, el proceso de elaboración textil es un proceso de teñido textil. En algunas formas de realización, el efluente de aguas residuales procede de un proceso de procesamiento de pulpa o papel. En algunas formas de realización, el proceso de procesamiento de pulpa o papel es un proceso de destintado.

20 **[0014]** En varias formas de realización, se decolora al menos alrededor de un 40 %, al menos alrededor de un 50 %, al menos alrededor de un 60 %, al menos alrededor de un 70 %, al menos alrededor de un 80 %, al menos alrededor de un 90 % o incluso al menos alrededor de un 95 % del tinte en el medio acuoso. En formas de realización concretas, se decolora al menos un 40 % del tinte. En formas de realización concretas, se decolora al menos un 50 % del tinte. En formas de realización concretas, se decolora al menos un 60 % del tinte. En formas de realización concretas, se decolora al menos un 70 % del tinte. En formas de realización concretas, se decolora al menos un 80 % del tinte.

25 **[0015]** En algunas formas de realización, al menos el doble del tinte del efluente se decolora en comparación con la cantidad de tinte que se decolora en un método equivalente que carece de la enzima perhidrolasa. En algunas formas de realización, se decolora al menos tres veces más de tinte en el efluente en comparación con la cantidad de tinte que se decolora en un método equivalente que carece de la enzima perhidrolasa.

30 **[0016]** En algunas formas de realización, la enzima perhidrolasa cataliza la perhidrólisis del sustrato de éster con una razón de perhidrólisis:hidrólisis igual o superior a 1. En algunas formas de realización, la enzima perhidrolasa comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:1, o una variante u homóloga de esta. En algunas formas de realización, la enzima perhidrolasa comprende una secuencia de aminoácidos que presenta al menos un 70 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de amino expuesta en la SEQ ID NO: 1. En algunas formas de realización, la enzima perhidrolasa es la variante S54V de la enzima perhidrolasa que presenta la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1. En algunas formas de realización, la enzima perhidrolasa comprende una secuencia de aminoácidos que presenta al menos un 70 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de amino expuesta en la SEQ ID NO:3. En algunas formas de realización, la enzima perhidrolasa comprende una secuencia de aminoácidos que presenta al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 % o incluso al menos un 95 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de amino expuesta en las SEQ ID NO: 1 o 3.

35 **[0017]** En algunas formas de realización, el sustrato de éster se selecciona del grupo que consiste en diacetato de propilenglicol (PGDA), diacetato de etilenglicol (EGDA), tracetina, acetato de etilo y tributirina. En formas de realización concretas, el sustrato es PGDA. En formas de realización concretas, el sustrato es EGDA. En algunas formas de realización, el peróxido de hidrógeno se proporciona en forma de una fuente de peróxido de hidrógeno seleccionada del grupo que consiste en peróxido de hidrógeno, percarbonato y perborato. En algunas formas de realización, el tinte es un tinte textil.

40 **[0018]** En algunas formas de realización, la proporción molar entre fracciones de éster de ácido carboxílico en el sustrato y moléculas enzimáticas es de alrededor de  $4 \times 10^3/1$  a alrededor de  $4 \times 10^6/1$ . La proporción molar entre fracciones de éster de ácido carboxílico en el sustrato y moléculas enzimáticas en el medio acuoso es de al menos  $2 \times 10^5/1$ . En algunas formas de realización, la proporción molar entre fracciones de éster de ácido carboxílico en

el sustrato y moléculas enzimáticas es de al menos de alrededor de  $4 \times 10^5/1$ . En algunas formas de realización, la proporción molar entre fracciones de éster de ácido carboxílico en el sustrato y moléculas de tinte es de al menos alrededor de 1000/1. En algunas formas de realización, la proporción molar entre fracciones de éster de ácido carboxílico en el sustrato de éster y moléculas de tinte es de alrededor de 1000/1 a alrededor de 10 000/1. En algunas formas de realización, la concentración de enzima perhidrolasa es inferior o igual a  $5 \times 10^{-6}$  M.

[0019] También se da a conocer en la presente memoria un

[0020] Estos y otros aspectos y formas de realización de los presentes métodos y composición se pondrán de manifiesto a partir de la descripción.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0021]

La Figura 1 es un gráfico que muestra la decoloración oxidativa de Reactive Black 5 a temperatura ambiente, opcionalmente en presencia de EGDA o EGDA y enzima perhidrolasa.

La Figura 2 es un gráfico que muestra la decoloración oxidativa de Reactive Black 5 a temperatura ambiente mediante diferentes razones de EGDA, enzima y peróxido de hidrógeno.

La Figura 3 es un gráfico que muestra el porcentaje de decoloración de Reactive Black 5 a temperatura ambiente.

La Figura 4 es un gráfico que muestra los porcentajes de decoloración de Reactive Black 5 a temperatura ambiente con diferentes razones de EGDA/enzima/  $H_2O_2$ .

Las Figuras 5A y 5B son gráficos que muestran el efecto de los cambios de las razones de enzima y  $H_2O_2$  sobre la velocidad de decoloración de Reactive Black 5 a temperatura ambiente.

La Figura 6 es un gráfico que muestra el efecto de aumentar la temperatura a  $40^\circ C$  sobre la velocidad de decoloración oxidativa de Reactive Black 5.

Las Figuras 7A y 7B son gráficos que muestran el efecto de aumentar la temperatura a  $40^\circ C$  y  $45^\circ C$ , respectivamente, sobre la decoloración de Reactive Black 5 a diferentes razones de EGDA y enzima.

Las Figuras 8A y 8B son gráficos que muestran los porcentajes de decoloración de Reactive Black 5 a  $40^\circ C$  y  $45^\circ C$ , respectivamente, a diferentes razones de EGDA/enzima/ $H_2O_2$ .

La Figura 9 es un gráfico que muestra el efecto de las razones de EGDA/enzima/  $H_2O_2$  sobre la decoloración oxidativa de Reactive Violet 5R a temperatura ambiente.

La Figura 10 es un gráfico que muestra los porcentajes de decoloración de Reactive Violet 5R a temperatura ambiente.

Las Figuras 11A y 11B son gráficos que muestran el efecto de diferentes razones de EGDA/enzima/  $H_2O_2$  sobre la decoloración de Reactive Violet 5R a  $40^\circ C$ , controlada a dos longitudes de onda, 325 nm y 560 nm, respectivamente.

Las Figuras 12A y 12B son gráficos que muestran los porcentajes de decoloración de Reactive Violet 5R a  $25^\circ C$  (barras de color claro) y a  $40^\circ C$  (barras oscuras), cuando se controla a 325 nm.

La Figura 13 es un gráfico que muestra el efecto de diferentes razones de EGDA/enzima/ $H_2O_2$  sobre la decoloración de Reactive Violet 5R a  $40^\circ C$  durante 2 horas, controlada a 560 nm.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA

### Definiciones

[0022] Antes de describir con detalle los presentes métodos, se definen las siguientes expresiones por claridad. A las expresiones sin definir se les deben asignar sus significados corrientes que se empleen en la técnica relevante.

**[0023]** Como se usa en la presente memoria, una «perhidrolasa» es una enzima capaz de catalizar una reacción de perhidrólisis que da como resultado la producción de una cantidad lo bastante alta de perácido para su uso en un método de decoloración de tinte oxidativa como se describe. Por lo general, la enzima perhidrolasa presenta una razón entre perhidrólisis e hidrólisis alta. En algunas formas de realización, la perhidrolasa comprende, 5  
consiste en o consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos de la perhidrolasa *Mycobacterium smegmatis* expuesta en la SEQ ID NO:1 o una variante u homóloga de esta. En algunas formas de realización, la enzima perhidrolasa comprende actividad aciltransferasa y/o arilesterasa.

**[0024]** Como se usa en la presente memoria, las expresiones «perhidrolización», «perhidrolizar» o «perhidrólisis» 10  
se refieren a una reacción donde un perácido se genera a partir de un sustrato de éster y peróxido de hidrógeno. En algunas formas de realización, la reacción de perhidrolización se cataliza con una perhidrolasa, por ejemplo enzima aciltransferasa o arilesterasa. En algunas formas de realización, un perácido se produce por perhidrólisis de un sustrato de éster de la fórmula  $R_1C(=O)OR_2$ , donde  $R_1$  y  $R_2$  son las mismas fracciones orgánicas o diferentes, en presencia de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). En algunas formas de realización,  $-OR_2$  es  $-OH$ . En algunas formas 15  
de realización,  $-OR_2$  se sustituye por  $-NH_2$ . En algunas formas de realización, un perácido se produce por perhidrólisis de un sustrato de ácido carboxílico o de amida.

**[0025]** Como se usa en la presente memoria, una «cantidad eficaz de enzima perhidrolasa» se refiere a la cantidad de enzima perhidrolasa necesaria para producir los efectos de decoloración descritos en la presente memoria. Dichas cantidades eficaces las determina el experto en la materia de acuerdo con la presente descripción, y se basan en diversos factores, como la variante de enzima concreta usada, el pH usado, la temperatura usada y similares, así como los resultados deseados (por ejemplo, nivel de blancura). 20

**[0026]** Como se usa en la presente memoria, la expresión «perácido» se refiere a una molécula procedente de un éster de ácido carboxílico que ha sido reaccionada con peróxido de hidrógeno con el fin de formar un producto extremadamente reactivo que presenta la fórmula general  $RC(=O)OOH$ . Dichos productos de perácido son capaces de transferir uno de sus átomos de oxígeno a otra molécula, como por ejemplo un tinte. Esta habilidad de transferir átomos de oxígeno permite a un perácido, por ejemplo ácido peracético, funcionar como agente de blanqueo. 25  
30

**[0027]** Como se usa en la presente memoria, un «sustrato de éster», con referencia a un sistema de decoloración de tinte oxidativa que contiene una enzima perhidrolasa, se refiere a un sustrato de perhidrolasa que contiene un enlace de éster. Pueden utilizarse los ésteres que comprenden alcoholes y ácidos carboxílicos aromáticos y/o alifáticos como sustratos con enzimas perhidrolasa. En algunas formas de realización, la fuente de éster es un éster de acetato. En algunas formas de realización, la fuente de éster se selecciona de uno o varios de diacetato de propilenglicol, diacetato de etilenglicol, triacetina, acetato de etilo y tributirina. En algunas formas de realización, la fuente de éster se selecciona de los ésteres de uno o varios de los siguientes ácidos: ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico, ácido butírico, ácido valérico, ácido caproico, ácido caprílico, ácido nonanoico, ácido decanoico, ácido dodecanoico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico y ácido oleico. 35  
40

**[0028]** Como se usa en la presente memoria, la expresión «fuente de peróxido de hidrógeno» se refiere a una molécula capaz de generar peróxido de hidrógeno, por ejemplo *in situ*. Las fuentes de peróxido de hidrógeno incluyen peróxido de hidrógeno en sí mismo, así como moléculas que producen de forma espontánea o enzimática peróxido de hidrógeno como producto de reacción. Dichas moléculas incluyen, por ejemplo, perborato y percarbonato. 45

**[0029]** Como se usa en la presente memoria, la frase «razón entre perhidrólisis e hidrólisis» se refiere a la razón entre perácido producido enzimáticamente y ácido producido enzimáticamente (por ejemplo, en moles) que produce una enzima perhidrolasa a partir de un sustrato de éster en unas condiciones definidas y en un periodo de tiempo definido. En algunas formas de realización, los ensayos proporcionados en el documento WO 05/056782 se usan para determinar las cantidades de perácido y de ácido producidas por la enzima. 50

**[0030]** Como se usa en la presente memoria, la expresión «acilo» se refiere a un grupo orgánico con la fórmula general  $RCO-$ , procedente de un ácido orgánico mediante la eliminación del grupo  $-OH$ . Normalmente, los nombres de grupos acilo terminan con el sufijo «-oilo»; por ejemplo, el cloruro de metanoilo,  $CH_3CO-Cl$ , es el cloruro de acilo formado a partir de ácido metanoico,  $CH_3CO-OH$ . 55

**[0031]** Como se usa en la presente memoria, la expresión «acilación» se refiere a una transformación química en la que uno de los sustituyentes de una molécula se sustituye por un grupo acilo, o al proceso de introducción de un grupo acilo en una molécula. 60

**[0032]** Como se usa en la presente memoria, la expresión «transferasa» se refiere a una enzima que cataliza la transferencia de un grupo funcional de un sustrato a otro sustrato. Por ejemplo, una aciltransferasa puede transferir un grupo acilo de un sustrato de éster a un sustrato de peróxido de hidrógeno para formar un perácido.

**[0033]** Como se usa en la presente memoria, la expresión «oxidasa que genera peróxido de hidrógeno» se refiere a una enzima que cataliza una reacción de oxidación-reducción que implica oxígeno molecular (O<sub>2</sub>) como el aceptador de electrones. En dicha reacción, el oxígeno se reduce a agua (H<sub>2</sub>O) o peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Una oxidasa adecuada para el uso en la presente memoria es una oxidasa que genera peróxido de hidrógeno (en comparación con el agua) en su sustrato. Un ejemplo de una oxidasa que genera peróxido de hidrógeno y su sustrato adecuado para el uso en la presente memoria es glucosa oxidasa y glucosa. Otras enzimas de oxidasa que pueden usarse para la generación de peróxido de hidrógeno incluyen alcohol oxidasa, etilenglicol oxidasa, glicerol oxidasa, aminoácido oxidasa, etc. En algunas formas de realización, la oxidasa que genera peróxido de hidrógeno es una carbohidrato oxidasa.

**[0034]** Como se usa en la presente memoria, la expresión «textil» se refiere a fibras, hilos, tejidos, prendas y no tejidos. La expresión abarca textiles naturales, sintéticos (por ejemplo, manufacturados) y de diversas mezclas naturales y sintéticas. Por tanto, la expresión «textil(es)» se refiere a fibras, hilos, tejidos o tejidos de punto, no tejidos y prendas tanto procesadas como sin procesar. En algunas formas de realización, un textil contiene celulosa.

**[0035]** Como se usa en la presente memoria, la expresión «tejido» se refiere a un conjunto manufacturado de fibras y/o hilos que presenta una zona superficial sustancial en relación con su grosor y suficiente cohesión para proporcionar al conjunto una resistencia mecánica útil.

**[0036]** Como se usa en la presente memoria, la expresión fibra, hilo o tejido «celulósico no de algodón» se refiere a fibras, hilos o tejidos que están compuestos principalmente de una composición a base de celulosa distinta del algodón. Ejemplos de dichas composiciones incluyen tela, ramio, yute, lino, rayón, lyocell, acetato de celulosa, bambú y otras composiciones similares que se derivan de celulósicos no de algodón.

**[0037]** Como se usan en la presente memoria, las expresiones «purificado/a» y «aislado/a» se refieren a la eliminación de contaminantes de una muestra y/o a un material (por ejemplo, una proteína, ácido nucleico, célula, etc.) que se elimina de al menos un componente con el cual está asociado naturalmente. Por ejemplo, estas expresiones pueden referirse a un material que está sustancialmente o fundamentalmente exento de componentes que normalmente lo acompañan tal y como se encuentra en su estado nativo, como por ejemplo un sistema biológico intacto.

**[0038]** Como se usa en la presente memoria, la expresión «polinucleótido» se refiere a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud y a cualquier estructura tridimensional y monocatenaria o de cadena múltiple (monocatenaria, bicatenaria, de triple hélice, etc.), que contiene desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos y/o análogos o formas modificadas de desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos, que incluye nucleótidos modificados o bases o sus análogos. Puesto que el código genético es redundante, puede usarse más de un codón para codificar un aminoácido concreto. Puede utilizarse cualquier tipo de nucleótido modificado o de análogo de nucleótido, siempre que el polinucleótido retenga la funcionalidad deseada en las condiciones de uso, lo que incluye modificaciones que aumentan la resistencia a la nucleasa (por ejemplo, deoxi, 2'-O--Me, fosforotioatos, etc.). También pueden incorporarse marcadores a efectos de detección o captura, como por ejemplo marcadores o anclajes radiactivos o no radiactivos, como por ejemplo biotina. La expresión polinucleótido también incluye ácidos nucleicos peptídicos (PNA). Los polinucleótidos pueden ser de origen natural o no natural. Las expresiones «polinucleótido» y «ácido nucleico» y «oligonucleótido» se usan en la presente memoria indistintamente. Los polinucleótidos pueden contener ARN, ADN o ambos, y/o formas modificadas y/o análogos de estos. Puede interrumpirse una secuencia de nucleótidos mediante componentes no nucleotídicos. Uno o varios enlaces fosfodiéster pueden sustituirse por grupos de enlace alternativos. Estos grupos de enlace alternativos incluyen, entre otros, formas de realización donde el fosfato se sustituye por P(O)S («tioato»), P(S)S («ditioato»), (O)NR<sub>2</sub> («amidato»), P(O)R, P(O)OR', CO o CH<sub>2</sub> («formacetal»), donde cada R o R' es independientemente H o alquilo (1-20 C) sustituido o no sustituido que contiene opcionalmente un enlace éter (-O-), arilo, alquenilo, cicloalquilo, cicloalquenilo o araldilo. No todos los enlaces de un polinucleótido tienen por qué ser idénticos. Los polinucleótidos pueden ser lineales o circulares o comprender una combinación de partes lineales y circulares.

**[0039]** Como se usa en la presente memoria, «polipéptido» se refiere a cualquier composición compuesta de aminoácidos y reconocida como proteína por los expertos en la materia. En la presente memoria, se usa el código convencional de una letra o de tres letras para residuos de aminoácidos. En la presente memoria, se usan las expresiones «polipéptido» y «proteína» indistintamente para referirse a polímeros de aminoácidos de cualquier longitud. El polímero puede ser lineal o ramificado, puede comprender aminoácidos modificados y puede verse interrumpido por no aminoácidos. Las expresiones también abarcan un polímero de aminoácidos que ha sido modificado naturalmente o por intervención; por ejemplo, formación con enlace de disulfuro, glicosilación, lipidación, acetilación, fosforilación o cualquier otra manipulación o modificación, como por ejemplo la conjugación con un componente marcador. También se encuentran incluidos dentro de la definición, por ejemplo, los polipéptidos que contienen uno o varios análogos de un aminoácido (que incluyen, por ejemplo, aminoácidos no naturales, etc.), así como otras modificaciones conocidas en la técnica.

**[0040]** Como se usan en la presente memoria, proteínas similares desde el punto de vista funcional y/o estructural se consideran «proteínas relacionadas». En algunas formas de realización, dichas proteínas proceden de un género y/o especie diferente, lo que incluye las diferencias entre clases de organismos (por ejemplo, una proteína bacteriana y una proteína fúngica). En formas de realización adicionales, las proteínas relacionadas se proporcionan de la misma especie. Por supuesto, no se pretende que los procesos, métodos y/o composiciones descritos en la presente memoria estén limitados a proteínas relacionadas de una fuente o fuentes concretas. Asimismo, la expresión «proteínas relacionadas» abarca homólogas de estructura terciaria y homólogas de secuencia primaria. En formas de realización adicionales, la expresión abarca proteínas que reaccionan inmunológicamente de forma cruzada.

**[0041]** Como se usa en la presente memoria, la expresión «derivada» se refiere a una proteína que procede de una proteína mediante la adición de uno o varios aminoácidos tanto en uno como en ambos extremos N y C-terminal, la sustitución de uno o varios aminoácidos en un sitio o número de sitios diferentes de la secuencia de aminoácidos y/o la eliminación de uno o varios aminoácidos en uno o en ambos extremos de la proteína o en uno o varios sitios de la secuencia de aminoácidos, y/o la inserción de uno o varios aminoácidos en uno o varios sitios de la secuencia de aminoácidos. La preparación de una proteína derivada se logra preferiblemente mediante la modificación de una secuencia de ADN que codifica la proteína nativa, la transformación de dicha secuencia de ADN en un huésped adecuado y la expresión de la secuencia de ADN modificada con el fin de formar la proteína derivada.

**[0042]** Las proteínas relacionadas (y derivadas) comprenden «proteínas variables». En algunas formas de realización, las proteínas variables difieren de una proteína original, por ejemplo de una proteína natural, y de otra en un pequeño número de residuos de aminoácidos. El número de residuos de aminoácidos diferentes puede ser uno o más de uno, por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 o más residuos de aminoácidos. En algunos aspectos, las proteínas relacionadas y, en concreto, las proteínas variables, comprenden al menos un 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o incluso un 99 % o más de identidad de secuencia de aminoácidos. De manera adicional, una proteína relacionada o una proteína variable se refiere a una proteína que difiere de otra proteína relacionada o de una proteína original en el número de regiones prominentes. Por ejemplo, en algunas formas de realización, las proteínas variables presentan 1, 2, 3, 4, 5 o 10 regiones prominentes correspondientes que difieren de la proteína original. Las regiones prominentes incluyen características estructurales, regiones conservadas, epítomos, dominios, motivos y similares.

**[0043]** En la técnica se conocen métodos que son adecuados para generar variables de las enzimas descritas en la presente memoria, que incluyen, entre otros, mutagénesis saturada, mutagénesis de barrido, mutagénesis insercional, mutagénesis al azar, mutagénesis dirigida y evolución dirigida, así como otros enfoques recombinatorios diversos.

**[0044]** Como se usa en la presente memoria, la expresión «secuencia análoga» se refiere a una secuencia dentro de una proteína que ofrece una función, estructura terciaria y/o residuos conservados similares a los de la proteína de interés (es decir, normalmente la proteína original de interés). Por ejemplo, en las regiones epítomos que contienen una estructura de hélice alfa o lámina beta, los aminoácidos de sustitución en la secuencia análoga preferiblemente mantienen la misma estructura específica. La expresión también se refiere a secuencias de nucleótidos, así como a secuencias de aminoácidos. En algunas formas de realización, las secuencias análogas se desarrollan de modo que los aminoácidos de sustitución den como resultado una enzima variable que muestre una función similar o mejorada. En algunas formas de realización, la estructura terciaria y/o residuos conservados de los aminoácidos en la proteína de interés se sitúan en o cerca del segmento o fragmento de interés. Por consiguiente, en los casos en que el segmento o fragmento de interés contiene, por ejemplo, una estructura de hélice alfa o lámina beta, los aminoácidos de sustitución mantienen preferiblemente dicha estructura específica.

**[0045]** Como se usa en la presente memoria, la expresión «proteína homóloga» se refiere a una proteína que presenta actividad y/o estructura similares a las de una proteína de referencia. No se pretende que las homólogas estén necesariamente relacionadas evolutivamente. Por consiguiente, se pretende que la expresión abarque la misma o mismas enzimas, similares o correspondientes (es decir, en términos de estructura y función) obtenidas de diferentes organismos. En algunas formas de realización, es deseable identificar una homóloga que presente una estructura cuaternaria, terciaria y/o primaria similar a la de la proteína de referencia. En algunas formas de realización, las proteínas homólogas inducen una respuesta o respuestas inmunológicas similares a las de una proteína de referencia. En algunas formas de realización, las proteínas homólogas están manipuladas para producir enzimas con una actividad o actividades deseadas.

**[0046]** El grado de homología entre secuencias puede determinarse mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica (véase, por ejemplo, Smith y Waterman (1981) *Adv. Appl. Math.* 2:482; Needleman y Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.*, 48:443; Pearson y Lipman (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444; programas como GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el paquete de *software* de Wisconsin Genetics (Genetics Computer Group, Madison, WI); y Devereux *et al.* (1984) *Nucleic Acids Res.* 12:387-395).

**[0047]** Por ejemplo, PILEUP es un programa de utilidad para determinar los niveles de homología entre secuencias. PILEUP crea un alineamiento de secuencias múltiple a partir de un grupo de secuencias relacionadas mediante alineamientos progresivos por pares. También puede representar un árbol que muestre las relaciones de agrupamiento usadas para crear el alineamiento. PILEUP usa una simplificación del método de alineamiento progresivo de Feng y Doolittle, (Feng y Doolittle (1987) *J. Mol. Evol.* 35:351-5 360). El método es similar al descrito por Higgings y Sharp (Higgings y Sharp (1989) *CABIOS* 5:151-153). Los parámetros útiles de PILEUP incluyen un peso del espacio predeterminado de 3,00, un peso de la longitud del espacio predeterminado de 0,10 y espacios de los extremos ponderados. Otro ejemplo de un algoritmo útil es el algoritmo BLAST, descrito por Altschul *et al.* (Altschul *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410; y Karlin *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-5787). Un programa BLAST que resulta particularmente útil es el programa WUBLAST-2 (véase Altschul *et al.* (1996) *Meth. Enzymol.* 266:460-480). Los parámetros «W», «T» y «X» determinan la sensibilidad y velocidad del alineamiento. El programa BLAST usa de manera predeterminada una longitud de palabra (W) de 11, la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915), alineamientos (B) de 50, una expectativa (E) de 10, M'5, N'-4, y una comparación de ambas cadenas.

**[0048]** Como se usan en la presente memoria, las frases «sustancialmente similar» y «sustancialmente idéntico», en el contexto de al menos dos ácidos nucleicos o polipéptidos, normalmente se refiere a que un polinucleótido o polipéptido comprende una secuencia que presenta al menos alrededor de un 40 % de identidad, más preferiblemente al menos alrededor de un 50 % de identidad, todavía más preferiblemente al menos alrededor de un 60 % de identidad, preferiblemente al menos alrededor de un 75 % de identidad, más preferiblemente al menos alrededor de un 80 % de identidad, todavía más preferiblemente al menos alrededor de un 90 %, al menos alrededor de un 91 %, al menos alrededor de un 92 %, al menos alrededor de un 93 %, al menos alrededor de un 94 %, al menos alrededor de un 95 %, al menos alrededor de un 96 %, al menos alrededor de un 97 %, al menos alrededor de un 98 % o incluso al menos alrededor de un 99 % de identidad con la secuencia, en comparación con la secuencia de referencia (es decir, natural). La identidad con la secuencia puede determinarse mediante programas como BLAST, ALIGN y CLUSTAL por medio de parámetros estándar. (Véase, por ejemplo, Altschul, *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410; Henikoff *et al.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915; Karin *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873; y Higgins *et al.* (1988) *Gene* 73:237-244). El software para realizar los análisis BLAST está disponible públicamente a través del National Center for Biotechnology Information. También puede buscarse en bases de datos por medio de FASTA (Pearson *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444-2448). Un indicativo de que dos polipéptidos son sustancialmente idénticos es que el primer polipéptido reacciona inmunológicamente de forma cruzada con el segundo polipéptido. Normalmente, los polipéptidos que difieren en sustituciones de aminoácidos conservadoras reaccionan inmunológicamente de forma cruzada. Por consiguiente, un polipéptido es sustancialmente idéntico a un segundo polipéptido, como por ejemplo cuando los dos péptidos difieren únicamente en una sustitución conservadora. Otro indicativo de que dos secuencias de ácido nucleico son sustancialmente idénticas es que las dos moléculas hibridan entre sí sometidas a condiciones rigurosas (por ejemplo, en un intervalo de rigor medio a alto).

**[0049]** Como se usan en la presente memoria, las proteínas «naturales» y «nativas» son aquellas que se encuentran en la naturaleza. Las expresiones «secuencia natural» y «gen natural» se usan indistintamente en la presente memoria para referirse a una secuencia que es nativa o de origen natural en una célula hospedadora. En algunas formas de realización, la secuencia natural se refiere a una secuencia de interés que es el punto de partida de un proyecto de ingeniería de proteínas. Los genes que codifican la proteína de origen natural pueden obtenerse de acuerdo con los métodos generales conocidos por los expertos en la materia. En general, los métodos comprenden la síntesis de sondas marcadas que presentan secuencias putativas que codifican regiones de la proteína de interés, la preparación de genotecas genómicas a partir de organismos que expresan la proteína y el cribado de las genotecas en busca del gen de interés mediante hibridación con las sondas. A continuación, se mapean y secuencian los clones de hibridación positiva.

**[0050]** Como se usa en la presente memoria, la expresión «teñido» se refiere a la aplicación de color, especialmente mediante remojo en una solución colorante a, por ejemplo, textiles.

**[0051]** Como se usa en la presente memoria, la expresión «tinte» se refiere a una sustancia coloreada (es decir, cromófora) que presenta afinidad con un sustrato al cual se aplica. En la presente memoria se describen numerosas clases de tintes.

**[0052]** Como se usan en la presente memoria, las expresiones «decolorar» y «decoloración» se refieren a la supresión o reducción de color por medio de la destrucción, modificación o eliminación de tinte, por ejemplo, de un medio acuoso. En algunas formas de realización, decolorar o decoloración se define como un porcentaje de eliminación de color de un medio acuoso. La cantidad de eliminación de color puede determinarse mediante la comparación del nivel de color tras el tratamiento con una enzima perhidrolasa (es decir, el nivel de color residual) con el nivel de color del medio acuoso de inicio (es decir, el nivel de color original) mediante métodos conocidos espectrofotométricos o de inspección visual.



**[0053]** Como se usa en la presente memoria, la expresión «nivel de color original» se refiere al nivel de color de un medio acuoso que comprende al menos un componente de tinte antes del contacto con una enzima perhidrolasa del modo descrito en la presente memoria. El nivel de color original puede medirse por medio de métodos conocidos espectrofotométricos o de inspección visual.

5

**[0054]** Como se usa en la presente memoria, la expresión «nivel de color residual» se refiere al nivel de color de un medio acuoso que comprende al menos un componente de tinte antes del contacto con una enzima perhidrolasa del modo descrito en la presente memoria. El nivel de color original puede medirse por medio de métodos conocidos espectrofotométricos o de inspección visual.

10

**[0055]** Como se usa en la presente memoria, un «medio acuoso» es una solución y/o suspensión que principalmente comprende agua como disolvente. El medio acuoso incluye normalmente al menos un tinte para decolorarse, así como cualquier número de componentes disueltos o suspendidos, que incluyen, entre otros, tensioactivos, sales, tampones, estabilizadores, agentes complejantes, agentes quelantes, adyuvantes, iones metálicos, enzimas y sustratos adicionales y similares. Los medios acuosos de ejemplo son soluciones de tinte textiles. También pueden estar presentes en o en contacto con el medio acuoso materiales como pulpa de papel, artículos textiles, fibras textiles y otros materiales sólidos.

15

**[0056]** Como se usa en la presente memoria, «envase» se refiere a un recipiente capaz de ofrecer una enzima perhidrolasa, un sustrato para la enzima perhidrolasa y/o una fuente de peróxido de hidrógeno en un formato de fácil manejo y transporte. Los envases de ejemplo incluyen cajas, tubos, bidones, barriles, toneles, bolsas o incluso camiones cisterna.

20

**[0057]** Como se usa en la presente memoria, la expresión «puesta en contacto» se refiere a incubar en la presencia de, normalmente en una solución acuosa.

25

**[0058]** Como se usan en la presente memoria, los artículos singulares «un», «una», «el», «la» abarcan los referentes plurales a menos que el contexto diga claramente lo contrario.

30

**[0059]** Salvo que se especifique lo contrario, las siguientes abreviaturas/siglas tienen los siguientes significados:

	ADNc	ADN complementario
	ADN	ácido desoxirribonucleico
	EC	comisión de enzimas
35	kDa	kiloDalton
	PM	peso molecular
	SDS-PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida de sulfato sódico de dodecilo
	p/v	peso/volumen
	p/p	peso/peso
40	v/v	volumen/volumen
	% p	por ciento en peso
	°C	grados centígrados
	H <sub>2</sub> O	agua
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	peróxido de hidrógeno
45	dH <sub>2</sub> O o DI	agua desionizada
	dIH <sub>2</sub> O	agua desionizada, filtración Milli-Q
	g	gramo
	µg	microgramo
	mg	miligramo
50	kg	kilogramo
	µL y µl	microlitro
	mL y ml	mililitro
	mm	milímetro
	µm	micrómetro
55	M	molar
	mM	milimolar
	µM	micromolar
	U	unidad
	ppm	partes por millón
60	s y "	segundo
	min y '	minuto
	h	hora
	EtOH	etanol
	eq.	equivalente
65	N	normal

IC Índice de Color  
CAS Chemical Abstracts Society

### **Enzima perhidrolasa**

5

**[0060]** Una característica de los presentes métodos para decoloración oxidativa de tinte es la presencia de una o varias enzimas perhidrolasa.

10

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

15

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

20

25

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

30

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

MAKRILCFGDSLWTGWVVEDGAPTERFAPDVRWTGVLAQQLGADFEVIEEGLSARTT  
NIDDPTDPRNLNGASYLPSCLATHLPLDLVIIMLGTNDTKAYFRRTPLDIALGMSVLVTQV  
LTSAGVGTTYAPPKVLVSPPLAPMPHPWFQLIFEGGEQKTELARVYSALASFMKV  
PFFDAGSVISTDGVVDGIHFTEANNRDLGVALAEQVRSLL

35

**[0065]** La correspondiente secuencia de polinucleótidos que codifica la perhidrolasa *M. smegmatis* se muestra a continuación (SEQ ID NO:2):

5'-ATGGCCAAGCGAATTCTGTGTTTCGGTGATTCCCTGACCTGGGGCTGGGTCC  
CCGTCGAAGACGGGGCACCCACCGAGCGGTTCCGCCCGACGTGCGCTGGACCGGT  
GTGCTGGCCCAGCAGCTCGGAGCGGACTTCGAGGTGATCGAGGAGGGACTGAGCGC  
GCGCACCAACATCGACGACCCACCGATCCGCGGCTCAACGGCGCGAGCTACC  
TGCCGTCGTGCCTCGCGACGCACCTGCCGCTCGACCTGGTGATCATCATGCTGGGCA  
CCAACGACACCAAGGCCTACTTCCGGCGCACCCCGCTCGACATCGCGCTGGGCATG  
TCGGTGCTCGTCACGCAGGTGCTCACCAGCGCGGGCGGCGTCCGCCACCGTACCC  
GGTCCAGTTGATCTTCGAGGGCGGCGAGCAGAAGACCACTGAGCTCGCCCGCGTG  
TACAGCGCGCTCGCGTTCATGAAGGTGCCGTTCTTCGACGCGGGTTCGGTGATC  
AGCACCGACGGCGTTCGACGGAATCCACTTCACCGAGGCCAACAAATCGCGATCTCGG  
GGTGGCCCTCGCGGAACAGGTGCGGAGCCTGCTGTAA-3'

40

**[0066]** En algunas formas de realización, la enzima perhidrolasa comprende una o varias sustituciones en una o varias posiciones de aminoácidos equivalentes a la posición o posiciones en la secuencia de aminoácidos de la perhidrolasa *M. smegmatis* expuesta en la SEQ ID NO: 1. En algunas formas de realización, la enzima perhidrolasa comprende una cualquiera o cualquier combinación de sustituciones de aminoácidos seleccionadas de M1, K3, R4, I5, L6, C7, D10, S11, L12, T13, W14, W16, G15, V17, P18, V19, D21, G22, A23, P24, T25, E26, R27, F28,

A29, P30, D31, V32, R33, W34, T35, G36, L38, Q40, Q41, D45, L42, G43, A44, F46, E47, V48, I49, E50, E51, G52, L53, S54, A55, R56, T57, T58, N59, I60, D61, D62, P63, T64, D65, P66, R67, L68, N69, G70, A71, S72, Y73, S76, C77, L78, A79, T80, L82, P83, L84, D85, L86, V87, N94, D95, T96, K97, Y99F100, R101, R102, P104, L105, D106, I107, A108, L109, G110, M111, S112, V113, L114, V115, T116, Q117, V118, L119, T120, S121, A122, G124, V125, G126, T127, T128, Y129, P146, P148, W149, F150, I153, F154, I194 y F196.

**[0067]** En algunas formas de realización, la enzima perhidrolasa comprende una o varias de las siguientes sustituciones en una o varias posiciones de aminoácidos equivalentes a la posición o posiciones en la secuencia de aminoácidos de la perhidrolasa *M. smegmatis* expuesta en la SEQ ID NO: 1: L12C, Q, o G; T25S, G, o P; L53H, Q, G, o S; S54V, L A, P, T, o R; A55G o T; R67T, Q, N, G, E, L, o F; K97R; V125S, G, R, A, o P; F154Y; F196G.

**[0068]** En algunas formas de realización, la enzima perhidrolasa comprende una combinación de sustituciones de aminoácidos en posiciones de aminoácidos equivalentes a las posiciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la perhidrolasa *M. smegmatis* expuesta en la SEQ ID NO: 1: L12IS54V; L12M S54T; L12T S54V; L12Q T25S S54V; L53H S54V; S54P V125R; S54V V125G; S54V F196G; S54V K97R V125G; o A55G R67T K97R V125G.

**[0069]** En formas de realización concretas, la enzima perhidrolasa es la variante S54V de la perhidrolasa *M. smegmatis*, que se muestra a continuación (SEQ ID NO: 3; sustitución por S54V subrayada):

MAKRILCFGDSL TWGWVPVEDGAPTERFAPDVRWTGVLAQQLGADFEVIEEGLYARTT  
 NIDDPTDPR L NGASYLPSCLATHLPLDLVIIMLGTNDTKAYFRRTPLDIALGMSVLVTQV  
 LTSAGGVGTTYPAPKVLVVSPPPLAPMPHPWFQLIFEGGEQKTTELARVYSALASFMKV  
 PFFDAGSVISTDGV DGIHFTEANNRDLGVALAEQVRSLL

**[0070]** En algunas formas de realización, la enzima perhidrolasa incluye la sustitución por S54V, pero es de otro modo al menos alrededor de un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o incluso un 99,5 % idéntica a la secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID NO: 1 o 3.

**[0071]** En algunas formas de realización, la enzima perhidrolasa presenta una razón de perhidrólisis:hidrólisis de al menos 1. En algunas formas de realización, una enzima perhidrolasa presenta una razón de perhidrólisis:hidrólisis superior a 1.

**[0072]** En algunas formas de realización, la enzima perhidrolasa se proporciona en una proporción molar con respecto a la cantidad de tinte que va a decolorarse. En algunas formas de realización, la proporción molar es de alrededor de 1/10 000 a alrededor de 1/100 o incluso de alrededor de 1/5000 a alrededor de 1/100.

**[0073]** En algunas formas de realización, la concentración de enzima perhidrolasa presente en el medio acuoso durante la decoloración de tinte es de alrededor de  $10^{-9}$  M a alrededor de  $10^{-5}$  M, de alrededor de  $10^{-8}$  M a alrededor de  $10^{-5}$  M, de alrededor de  $10^{-8}$  M a alrededor de  $10^{-6}$  M, alrededor de  $5 \times 10^{-8}$  M a alrededor de  $5 \times 10^{-7}$  M, o incluso de alrededor de  $10^{-7}$  M a alrededor de  $5 \times 10^{-7}$  M, por ejemplo, alrededor de  $1,7 \times 10^{-7}$  a alrededor de  $3,4 \times 10^{-7}$  M. En formas de realización concretas, se usa alrededor de 0,2  $\mu$ M a alrededor de 0,5  $\mu$ M de enzima perhidrolasa para decolorar un medio acuoso que comprende alrededor de 34  $\mu$ M de tinte.

**[0074]** En algunas formas de realización, la cantidad de enzima perhidrolasa está por debajo de una cantidad predeterminada para mejorar la eficacia de la decoloración. Se cree que un exceso de enzima produce reacciones secundarias no deseadas, entre las que se incluye la destrucción de perácidos generados enzimáticamente, y que la decoloración de tinte se produce de manera más eficaz en determinadas condiciones. En consecuencia, en algunas formas de realización, la concentración de enzima perhidrolasa presente en el medio acuoso durante la decoloración de tinte es inferior a alrededor de  $10^{-6}$  M, inferior a alrededor de  $5 \times 10^{-7}$  M, o incluso inferior a alrededor de  $10^{-7}$  M. En formas de realización concretas, la concentración de enzima perhidrolasa presente en el medio acuoso durante la decoloración de tinte es inferior a alrededor de  $3,4 \times 10^{-7}$  M, o incluso inferior a alrededor de  $1,7 \times 10^{-7}$  M. Dichos valores se refieren generalmente a una concentración de tinte de alrededor de 34  $\mu$ M, y pueden ajustarse en función de la concentración real de tinte en el medio acuoso.

**[0075]** Aunque la cantidad absoluta de enzima perhidrolasa para uso en una reacción de decoloración puede aumentar o disminuir en función de la cantidad de tinte para decolorarse, por lo general se cree que se prefieren unos tiempos de incubación mayores, en lugar de una concentración más alta de enzima, para decolorar una cantidad mayor de tinte.

**Sustrato de éster**

**[0076]** Otra característica de los presentes métodos para la decoloración de tinte oxidativa es la presencia de una molécula de éster que sirve de sustrato para la enzima perhidrolasa para la producción de un perácido en presencia de peróxido de hidrógeno.

**[0077]** En algunas formas de realización, el sustrato de éster es un éster de un alcohol o ácido carboxílico alifático y/o aromático. El sustrato de éster puede ser un éster monovalente, divalente o multivalente o una mezcla de estos. Por ejemplo, el sustrato de éster puede ser un ácido carboxílico y un solo alcohol (monovalente, por ejemplo etilacetato, propilacetato), dos ácidos carboxílicos y un diol [por ejemplo, diacetato de propilenglicol (PGDA), diacetato de etilenglicol (EGDA) o una mezcla, por ejemplo 2-acetiloxi-1-propionato, donde el propilenglicol tiene un éster de acetato sobre el grupo alcohol 2 y un éster de propilo sobre el grupo alcohol 1], o tres ácidos carboxílicos y un triol (por ejemplo, triacetato de glicerol o una mezcla de acetato/propionato, etc., ligada a glicerol o a otro alcohol multivalente). En algunas formas de realización, el sustrato de éster puede ser un éster de un nitroalcohol (por ejemplo, 2-nitro-1-propanol). En algunas formas de realización, el sustrato de éster es un éster polimérico, por ejemplo un alcohol policarboxi parcialmente acilado (acetilado, propionilado, etc.), almidón acetilado, etc. En algunas formas de realización, el sustrato de éster es un éster de uno o varios de los siguientes: ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico, ácido butírico, ácido valérico, ácido caproico, ácido caprílico, ácido nonanoico, ácido decanoico, ácido dodecanoico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico y ácido oleico. En algunas formas de realización, triacetina, tributirina y otros ésteres sirven de donadores de acilo para la formación de perácidos. En algunas formas de realización, el sustrato de éster es diacetato de propilenglicol, diacetato de etilenglicol o acetato de etilo. En una forma de realización, el sustrato de éster es diacetato de propilenglicol.

**[0078]** Como se ha indicado anteriormente, los sustratos adecuados pueden ser monovalentes (es decir, que comprenden una sola fracción de éster de ácido carboxílico) o plurivalentes (es decir, que comprenden más de una fracción de éster de ácido carboxílico). La cantidad de sustrato usada para la decoloración oxidativa puede ajustarse en función del número de fracciones de éster de ácido carboxílico en la molécula del sustrato. En algunas formas de realización, la concentración de fracciones de éster de ácido carboxílico en el medio acuoso es de alrededor de 20-500 mM, por ejemplo, de alrededor de 40 mM a alrededor de 400 mM, de alrededor de 40 mM a alrededor de 200 mM, o incluso de alrededor de 60 mM a alrededor de 200 mM. Las concentraciones de fracciones de éster de ácido carboxílico de ejemplo incluyen alrededor de 60 mM, alrededor de 80 mM, alrededor de 100 mM, alrededor de 120 mM, alrededor de 140 mM, alrededor de 160 mM, alrededor de 180 mM y alrededor de 200 mM. Dichas cantidades de sustrato son adecuadas para el uso en una reacción de decoloración en la que la concentración de tinte es de alrededor de 34  $\mu\text{M}$ , y pueden ajustarse para la decoloración de más o menos tinte.

**[0079]** En algunas formas de realización, en los casos en que el sustrato de éster es divalente (como en el caso de EGDA) se proporciona en una cantidad de alrededor de 10-200 mM en el medio acuoso para decolorarse, por ejemplo, de alrededor de 20 mM a alrededor de 200 mM, de alrededor de 20 mM a alrededor de 100 mM o incluso de alrededor de 30 mM a alrededor de 100 mM. Las cantidades de sustrato de éster de ejemplo incluyen alrededor de 30 mM, alrededor de 40 mM, alrededor de 50 mM, alrededor de 60 mM, alrededor de 70 mM, alrededor de 80 mM, alrededor de 90 mM y alrededor de 100 mM. Al igual que antes, dichas cantidades de sustrato son adecuadas para el uso en una reacción de decoloración en la que la concentración de tinte es de alrededor de 34  $\mu\text{M}$ , y pueden ajustarse para la decoloración de más o menos tinte. El experto puede calcular fácilmente las cantidades correspondientes de sustratos de éster trivalentes o de otros plurivalentes en función del número de fracciones de éster de ácido carboxílico por molécula.

**[0080]** En algunas formas de realización, el sustrato de éster se proporciona en un exceso molar con respecto a la cantidad molar de tinte para decolorar. En algunas formas de realización, las fracciones de éster de ácido carboxílico del sustrato de éster se proporcionan entre alrededor de 20 y alrededor de 20 000 veces la cantidad molar de tinte. Las proporciones molares de ejemplo de fracciones de éster de ácido carboxílico y moléculas de tinte son de alrededor de 100/1 a alrededor de 10 000/1, de alrededor de 1000/1 a alrededor de 10 000/1 o incluso de 2000/1 a alrededor de 6000/1. En algunos casos, la proporción molar de sustrato de éster y moléculas de tinte es de al menos 2000/1, o de al menos 6000/1.

**[0081]** En algunas formas de realización, en los casos en que el sustrato de éster es divalente (como en el caso de EGDA), el sustrato de éster se proporciona entre alrededor de 10 y alrededor de 10 000 veces la cantidad molar de tinte. Las proporciones molares de ejemplo de sustrato de éster y moléculas de tinte son de alrededor de 50/1 a alrededor de 5000/1, de alrededor de 500/1 a alrededor de 5000/1, o incluso de 1000/1 a alrededor de 3000/1. En algunos casos, la proporción molar de sustrato de éster y moléculas de tinte es de al menos 1000/1, o de al menos 3000/1. Al igual que antes, el experto puede calcular fácilmente las cantidades correspondientes de sustratos de éster trivalentes o de otros plurivalentes en función del número de fracciones de éster de ácido carboxílico por molécula.

**[0082]** En algunas formas de realización, el sustrato de éster se proporciona en un exceso molar con respecto a la enzima perhidrolasa. En algunas formas de realización, la proporción molar de fracciones de éster de ácido carboxílico y enzima perhidrolasa es de al menos de alrededor de  $2 \times 10^5/1$ , de al menos de alrededor de  $4 \times 10^5/1$ , de al menos de alrededor de  $1 \times 10^6/1$ , de al menos de alrededor de  $2 \times 10^6/1$ , de al menos de alrededor de  $4 \times 10^6/1$  o incluso de al menos de alrededor de  $1 \times 10^7/1$  o más. En algunas formas de realización, el sustrato de éster se proporciona en un exceso molar de alrededor de  $4 \times 10^5/1$  a alrededor de  $4 \times 10^6/1$ , con respecto a la enzima perhidrolasa.

**[0083]** En algunas formas de realización, en los casos en que el sustrato de éster es divalente (como en el caso de EGDA), la proporción molar de sustrato de éster y enzima perhidrolasa es de al menos de alrededor de  $1 \times 10^7/1$ , de al menos de alrededor de  $2 \times 10^5/1$ , de al menos de alrededor de  $5 \times 10^5/1$ , de al menos de alrededor de  $1 \times 10^6/1$ , de al menos de alrededor de  $2 \times 10^6/1$  o incluso de al menos de alrededor de  $5 \times 10^6/1$  o más. En algunas formas de realización, el sustrato de éster se proporciona en un exceso molar de alrededor de  $2 \times 10^5/1$  a alrededor de  $2 \times 10^6/1$ , con respecto a la enzima perhidrolasa. El experto puede calcular fácilmente las cantidades correspondientes de sustratos de éster trivalentes o de otros plurivalentes en función del número de fracciones de éster de ácido carboxílico por molécula.

**Fuente de peróxido de hidrógeno**

**[0084]** Otra característica de los presentes métodos para la decoloración oxidativa de tinte es la presencia de una fuente de peróxido de hidrógeno. Por lo general, el peróxido de hidrógeno puede venir provisto directamente (es decir, en lote) o generarse continuamente (es decir, *in situ*) por medios químicos, electroquímicos y/o enzimáticos.

**[0085]** En algunas formas de realización, la fuente de peróxido de hidrógeno es peróxido de hidrógeno en sí mismo. En algunas formas de realización, la fuente de peróxido de hidrógeno es un compuesto que genera peróxido de hidrógeno tras la adición de agua. El compuesto puede ser un compuesto sólido. Dichos compuestos incluyen aductos de peróxido de hidrógeno con diversos compuestos inorgánicos u orgánicos, de los cuales el más empleado es el carbonato de sodio por hidrato, también denominado percarbonato de sodio.

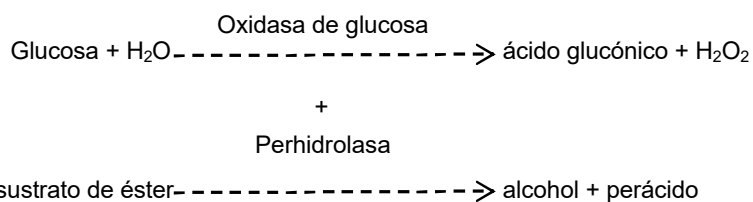
**[0086]** En algunas formas de realización, la fuente de peróxido de hidrógeno es una sal perhidratada inorgánica. Ejemplos de sales perhidratadas inorgánicas son sales de perborato, percarbonato, perfosfato, persulfato y persilicato. Las sales perhidratadas inorgánicas son normalmente sales de metal alcalino.

**[0087]** Las fuentes de peróxido de hidrógeno adicionales incluyen aductos de peróxido de hidrógeno con zeolitas, o peróxido de hidrógeno de urea.

**[0088]** La fuente de peróxido de hidrógeno puede estar en forma cristalina y/o en forma sustancialmente sólida y pura sin protección adicional. Para determinadas sales perhidratadas, las formas preferidas son composiciones granuladas que implican un recubrimiento, lo que ofrece una mejor estabilidad en el almacenamiento para la sal perhidratada del producto granulado. Los recubrimientos adecuados comprenden sales inorgánicas como sales de silicato, carbonato o borato de metal alcalino o mezclas de estas, o materiales orgánicos como ceras, aceites o jabones grasos.

**[0089]** En algunas formas de realización, la fuente de peróxido de hidrógeno es un sistema de generación enzimática de peróxido de hidrógeno. En una forma de realización, el sistema de generación enzimática de peróxido de hidrógeno comprende una oxidasa y su sustrato. Las enzimas de oxidasa adecuadas incluyen, entre otras: oxidasa de glucosa, oxidasa de sorbitol, oxidasa de hexosa, oxidasa de colina, oxidasa de alcohol, oxidasa de glicerol, oxidasa de colesterol, oxidasa de piranosa, oxidasa de carboxialcohol, oxidasa de L-aminoácido, oxidasa de glicina, oxidasa de piruvato, oxidasa de glutamato, oxidasa de sarcosina, oxidasa de lisina, oxidasa de lactato, oxidasa de vanillil, oxidasa de glicolato, oxidasa de galactosa, uricasa, oxidasa de oxalato y oxidasa de xantina.

**[0090]** La siguiente ecuación ofrece un ejemplo de un sistema asociado de producción enzimática de peróxido de hidrógeno.



**[0091]** No se pretende que la generación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  esté limitada a una enzima específica, puesto que se puede usar cualquier enzima que genere  $\text{H}_2\text{O}_2$  con un sustrato adecuado. Por ejemplo, se pueden usar las oxidasas de lactato procedentes de la especie *Lactobacillus*, conocidas por crear  $\text{H}_2\text{O}_2$  a partir de ácido láctico y oxígeno. Una ventaja

de una reacción de este tipo es la generación enzimática de ácido (por ejemplo, ácido glucónico en el ejemplo anterior), que reduce el pH de una solución acuosa básica al intervalo de pH en el que el perácido resulta más eficaz en el blanqueo (es decir, en o por encima del pKa). Dicha reducción del pH también la ocasiona directamente la producción de perácido. Otras enzimas (por ejemplo, oxidasa de alcohol, oxidasa de etilenglicol, oxidasa de glicerol, oxidasa de aminoácido, etc.) que sean capaces de generar peróxido de hidrógeno también se pueden usar con sustratos de éster en combinación con una enzima perhidrolasa para generar perácidos.

**[0092]** En los casos en que el peróxido de hidrógeno se genera electroquímicamente, este puede producirse, por ejemplo, mediante una celda de combustible provista de gas de oxígeno e hidrógeno.

**[0093]** En algunas formas de realización, el sustrato de éster se proporciona en una cantidad de alrededor de 10-200 mM en el medio acuoso para decolorarse, por ejemplo de alrededor de 20 mM a alrededor de 200 mM, de alrededor de 20 mM a alrededor de 100 mM o incluso de alrededor de 30 mM a alrededor de 100 mM. Las cantidades de ejemplo de sustrato de éster incluyen alrededor de 30 mM, alrededor de 40 mM, alrededor de 50 mM, alrededor de 60 mM, alrededor de 70 mM, alrededor de 80 mM, alrededor de 90 mM y alrededor de 100 mM. Estas cantidades de peróxido de hidrógeno son adecuadas para el uso en una reacción de decoloración en la que la concentración de tinte es de alrededor de 34  $\mu\text{M}$ , y pueden ajustarse para la decoloración de más o menos tinte.

**[0094]** En algunas formas de realización, el peróxido de hidrógeno se proporciona en un exceso molar con respecto a la cantidad molar de tinte para decolorarse. En algunas formas de realización, el peróxido de hidrógeno se proporciona entre alrededor de 10 y alrededor de 10 000 veces la cantidad molar de tinte. Las proporciones molares de ejemplo de peróxido de hidrógeno y moléculas de tinte son de alrededor de 500/1 a alrededor de 5000/1, o incluso de 1000/1 a alrededor de 3000/1. En algunos casos, la proporción molar entre peróxido de hidrógeno y moléculas de tinte es de al menos 1000/1 o de al menos 3000/1.

**[0095]** En algunas formas de realización, el peróxido de hidrógeno se proporciona en un exceso molar con respecto a la enzima perhidrolasa. En algunas formas de realización, la proporción molar entre peróxido de hidrógeno y enzima perhidrolasa es de al menos alrededor de  $1 \times 10^5/1$ , de al menos alrededor de  $2 \times 10^5/1$ , de al menos alrededor de  $5 \times 10^5/1$ , de al menos alrededor de  $1 \times 10^6/1$ , de al menos alrededor de  $2 \times 10^6/1$  o incluso de al menos alrededor de  $5 \times 10^6/1$  o más. En algunas formas de realización, el peróxido de hidrógeno se proporciona en un exceso molar de alrededor de  $2 \times 10^5/1$  y  $2 \times 10^6/1$ , con respecto a la enzima perhidrolasa.

**[0096]** En algunas circunstancias puede ser deseable añadir catalasa al medio acuoso final tratado para destruir el peróxido de hidrógeno residual.

#### *Tintes*

**[0097]** Cualquier tinte que pueda decolorarse oxidativamente por un perácido puede tratarse con los métodos descritos en la presente memoria. Ejemplos de tintes que pueden decolorarse oxidativamente según los métodos descritos en la presente memoria incluyen, entre otros, tintes azoicos, monoazoicos, disazoicos, nitro, de xanteno, quinolina, antraquinona, triarilmetano, paraazooanilina, azinaoxazina, estilbena, anilina y ftalocianina, o mezclas de estos. En una forma de realización, el tinte es un tinte azoico (por ejemplo, Reactive Black 5 (ácido 2,7-naftalenodisulfónico, 4-amino-5-hidroxi-3,6-bis(sal (4-((2-(sulfonoxi)etil)sulfonil)fenil)azo)-tetrasódica), Reactive Violet 5, amarillo de metilo, rojo Congo). En algunas formas de realización, el tinte es un tinte de antraquinona (por ejemplo, azul remazol), índigo (carmin de índigo), un tinte de triarilmetano/paraazooanilina (por ejemplo, cristal violeta, verde malaquita) o un tinte a base de azufre. En diversas formas de realización, el tinte es un tinte reactivo, directo, disperso o pigmentario. En algunas formas de realización, el tinte es un componente de una tinta. En algunas formas de realización, el tinte es una molécula adecuada para transferir color a un textil.

**[0098]** Una clase de tintes que pueden decolorarse oxidativamente por medio de perácido generado enzimáticamente son los tintes reactivos. Los tintes reactivos son cromóforos que incluyen un grupo funcional activado o activable capaz de interactuar químicamente con la superficie de un objeto para teñirse, como una superficie textil. Dicha interacción puede adoptar la forma de un enlace covalente. Los grupos funcionales de ejemplo incluyen monoclorotriazina, monofluoroclorotriazina, diclorotriazina, difluorocloropirimidina, dicloroquinoxalina, tricloropirimidina, vinil amida, vinil sulfona y similares. Los tintes reactivos pueden tener más de un grupo funcional (por ejemplo, tintes reactivos bifuncionales), permitiendo de este modo un grado mayor de fijación a un tejido.

**[0099]** Los tintes reactivos de ejemplo están enumerados en la Tabla 1, donde IC= Índice de color según la Society of Dyers and Colourists (Reino Unido) y la American Association of Textile Chemists and Colorists (Estados Unidos) y la CAS = Chemical Abstracts Society.

Tabla 1. Tintes reactivos de ejemplo

NOMBRE IC	N. ° IC	N. ° CAS
Reactive Yellow 15	11859	12226-47-0
Reactive Yellow 17	18852	20317-19-5
Reactive Yellow 24	--	12226-51-6
Reactive Yellow 37	--	--
Reactive Yellow 42	--	12226-63-0
Reactive Yellow 57	--	--
Reactive Yellow 77	--	85854-36-0
Reactive Yellow 107	--	--
Reactive Yellow 186	--	--
Reactive Orange 16	17757	12225-88-6
Reactive Orange 16a	--	--
Reactive Orange 78	--	--
Reactive Orange 82	--	--
Reactive Red 21	--	--
Reactive Red 35	--	--
Reactive Red 49	--	--
Reactive Red 106	--	105635-66-3
Reactive Red 174	--	--
Reactive Red 180a	--	--
Reactive Red 198 A	--	--
Reactive Violet 5	18097	12226-38-9
Reactive Blue 19	61200	2580-78-1
Reactive Blue 19	--	--
Reactive Blue 21	--	12236-86-1
Reactive Blue 28	--	12225-45-5
Reactive Blue 89	--	--
Reactive Blue 203	--	147826-71-9
Reactive Blue 220	--	--
Reactive Blue 221	--	--
Reactive Green 38	--	--
Reactive Brown 18	--	12225-73-9
Reactive Black 5	20505	2225-25-1
Reactive Black 31	--	12731-63-4

- 5 [0100] El tinte puede estar presente en un amplio intervalo de concentraciones, y puede estar presente más de un tinte en un medio acuoso. En muchos casos, en concreto cuando la concentración de tinte está dentro de un intervalo conocido, la concentración exacta de tinte no es crucial y no hace falta calcularla ni determinarla antes de la decoloración. Por lo general, los ejemplos adjuntos usan una concentración de tinte de alrededor de  $3,5 \times 10^{-5}$  M, pero la cantidad de tinte puede ser fácilmente de al menos una orden de magnitud mayor o menor.
- 10 En algunas formas de realización, puede ser deseable ajustar la concentración de sustrato de éster y de peróxido de hidrógeno de modo que sean proporcionales a la cantidad de tinte para decolorarse (las proporciones molares se ofrecen en la presente memoria). En algunas formas de realización, puede ser deseable ajustar la concentración de enzima perhidrolasa de modo que sea proporcional a la cantidad de tinte para decolorarse, aunque por lo general se cree que la cantidad de enzima no es tan crucial. Pueden ser necesarios unos tiempos de incubación mayores para decolorar una mayor cantidad de tinte, en concreto cuando la concentración de tinte no se aumenta
- 15 proporcionalmente para coincidir con la cantidad de tinte.

**Métodos**

[0101] En un aspecto, se proporcionan métodos para la decoloración oxidativa de un tinte en un medio acuoso. Un medio acuoso de ejemplo es un efluente de aguas residuales que contiene un tinte, como un efluente de un proceso textil o un proceso de pulpa/papel. Por lo general, los métodos incluyen la puesta en contacto de un medio acuoso que contiene un tinte con un perácido generado enzimáticamente.

[0102] En algunas formas de realización, el tinte se pone en contacto con una composición que contiene una enzima perhidrolasa, un sustrato para la enzima perhidrolasa y una fuente de peróxido de hidrógeno, donde la acción catalítica de la enzima perhidrolasa sobre el sustrato en presencia de peróxido de hidrógeno produce un perácido. El tinte se pone en contacto con la composición durante un periodo de tiempo y en condiciones adecuadas para producir una cantidad del perácido que sea suficiente para decolorar al menos una parte del tinte.

[0103] En algunas formas de realización, por ejemplo, para decolorar un tinte en un efluente de aguas residuales, el método se lleva a cabo a un pH de alrededor de 6 a alrededor de 11, de alrededor de 9 a alrededor de 11 o de alrededor de 9 a alrededor de 10. En algunas formas de realización, el método se lleva a cabo a una temperatura de alrededor de 20 °C a alrededor de 70 °C, de alrededor de 40 °C a alrededor de 70 °C, de alrededor de 40 °C a alrededor de 50 °C o de alrededor de 40 °C a alrededor de 45 °C. En algunas formas de realización, el método se lleva a cabo durante al menos alrededor de 30,60, 90 o 120 minutos.

[0104] En algunas formas de realización, el método de decoloración se realiza mediante cantidades preseleccionadas de enzima perhidrolasa, sustrato de éster y peróxido de hidrógeno para proporcionar una cantidad sustancial de decoloración, por ejemplo al menos alrededor de un 30 %, al menos alrededor de un 40 %, al menos alrededor de un 50 %, al menos alrededor de un 60 %, al menos alrededor de un 70 %, al menos alrededor de un 80 % o incluso al menos alrededor de un 90 % en relación con la cantidad de tinte (color) antes de la decoloración. La cantidad de decoloración puede determinarse mediante la comparación de la cantidad de color presente en el medio acuoso original con la cantidad de color presente en el medio acuoso residual tras el tratamiento según se ha descrito.

[0105] En algunas formas de realización, la cantidad de decoloración obtenida mediante el método descrito es al menos 1,5 veces, al menos 2 veces, al menos 2,5 veces o incluso al menos 3 veces mayor que la cantidad de decoloración conseguida mediante un método equivalente que carece de una enzima perhidrolasa.

[0106] Las cantidades preferidas de enzima perhidrolasa, sustrato de éster y peróxido de hidrógeno se describen en la presente memoria.

[0107] Estos y otros aspectos y formas de realización de las presentes composiciones y método se pondrán de manifiesto para el experto en la materia a la vista de la presente descripción. Los siguientes ejemplos pretenden ilustrar adicionalmente, pero no limitar, las composiciones y métodos.

**EJEMPLOS****Ejemplo 1: decoloración de tintes en una solución acuosa****Materiales**

[0108] La variante S54V de la perhidrolasa *M. smegmatis* (SEQ ID NO: 3) se usó como la enzima perhidrolasa de ejemplo. Esta enzima se denomina en otras partes arilesterasa (ArE) o acetiltransferasa (AcT) (véanse, por ejemplo, los documentos WO 05/056782A, WO 08/063400A, US2008145353 y US2007167344). La enzima se diluyó a partir de una concentración de 16 mg/ml en tampón de acetato sódico 50 mM, pH 5,0 carbonato sódico 100 mM, pH 10,3, que se usó como tampón para reacciones enzimáticas. El peróxido de hidrógeno de calidad comercial (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; p/p al 50 %), el diacetato de etilenglicol (EGDA), el Reactive Black 5 (55 % de contenido de tinte) y el Remazol Brilliant Violet 5 R se adquirieron de Sigma-Aldrich. Las soluciones madre de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y los tintes se prepararon mediante dilución en agua desionizada. El EGDA se disolvió en etanol al 50 % (v/v).

**Oxidación del tinte**

[0109] Se prepararon muestras experimentales en tubos Falcon de 15 ml. Cada muestra de 4 ml contenía tampón de carbonato sódico y una cantidad suficiente de las soluciones madre de tinte, EGDA y enzima para lograr las concentraciones deseadas. Los experimentos de oxidación de tinte se realizaron al transferir las muestras experimentales a placas de 96 pocillos (normalmente una hilera de pocillos por condición experimental). Las muestras normales de 200 µl contenían 3,4 x 10<sup>-5</sup> M de tinte, 3,4 x 10<sup>-2</sup> M de EGDA y 3,4 x 10<sup>-7</sup> M de enzima. La concentración de tinte se mantuvo baja para evitar la agregación. Se añadieron 20 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con una pipeta multicanal a una hilera de pocillos y se registró la absorbencia a una longitud de onda apropiada (590 nm para



Reactive Black 5; 325 nm y 560 nm para Reactive Violet 5R) durante 90 o 120 minutos. Las reacciones se realizaron a temperatura ambiente a menos que se indique de otro modo.

#### Decoloración oxidativa de Reactive Black 5

5

[0110] Las muestras experimentales se prepararon del modo descrito en la Tabla 2.

**Tabla 2**

Muestra	1	2	3	4	5	6
Tinte (M)	$3,4 \times 10^{-5}$	$3,4 \times 10^{-5}$	$3,4 \times 10^{-5}$	$3,4 \times 10^{-5}$	$3,4 \times 10^{-5}$	$3,4 \times 10^{-5}$
EGDA (M)	0	0,0340	0,0340	0,0340	0,0680	0,0680
Enzima (M)	0	0	$3,4 \times 10^{-7}$	$1,7 \times 10^{-7}$	$3,4 \times 10^{-7}$	$1,7 \times 10^{-7}$
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (M)	0,0340	0,0340	0,0340	0,0340	0,0340	0,0340

10

[0111] La Figura 1 es un gráfico que muestra el efecto de EGDA solo y EGDA con enzima perhidrolasa. Las etiquetas de series de datos indican las cantidades relativas de EGDA/enzima/tinte. Se incluyó un exceso multiplicado por 1000 de EGDA y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con respecto a la cantidad de tinte, indicado como «1000/0.01/1000». Las muestras de control no contenían enzima (es decir, «1000/0/1000») o no contenían EGDA ni enzima (es decir, «0/0/1000»). El efecto de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solo (es decir, «0/0/1000») sobre la decoloración fue mínimo en estas condiciones. Se observó algo de decoloración con EGDA en ausencia de enzima (es decir, 1000/0/1000). Es posible que la combinación de EGDA y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en un medio básico generara una pequeña cantidad de ácido peracético que fuera capaz de decolorar a una velocidad mayor que el peróxido solo. Se observó una decoloración significativamente mayor en presencia de EGDA y enzima (es decir, «1000/0/1000»), lo que demuestra los beneficios de la enzima perhidrolasa.

15

20

[0112] La Figura 2 es un gráfico que muestra el efecto de cambiar la razón entre EGDA y enzima y de cambiar la cantidad de enzima. La decoloración se vio favorecida a una razón mayor entre EGDA y enzima (es decir, «2000/0,005/1000» en comparación con «1000/0.005/1000»). La decoloración también se vio favorecida por la presencia de enzima adicional (es decir, «2000/0,01/1000» en comparación con «2000/0,005/1000»), aunque se mejoró la linealidad de la curva de decoloración por medio de una cantidad reducida de enzima.

25

[0113] La Figura 3 es un gráfico que muestra el porcentaje de decoloración observado por medio de cada una de las muestras experimentales identificadas en la Tabla 2. Se observó una mayor decoloración por medio de una razón mayor de EGDA/enzima (es decir, la muestra 5 en comparación con la muestra 3). El uso de una cantidad adicional de enzima aumentó la velocidad de decoloración en combinación con la mayor concentración de EGDA (es decir, la muestra 5 en comparación con la muestra 6), pero no la concentración menor de EGDA (es decir, la muestra 3 en comparación con la muestra 4). En general, las presentes composiciones y métodos fueron capaces de producir un aumento al menos tres veces mayor de la decoloración en comparación con los controles (hasta alrededor de un 60 %).

30

35

#### Efecto de la razón de sustrato/enzima/peróxido sobre la decoloración de Reactive Black 5

[0114] Se investigó el efecto de cambiar la razón de sustrato:enzima:peróxido sobre la decoloración oxidativa de Reactive Black 5. Las muestras se prepararon del modo descrito en la Tabla 3.

40

**Tabla 3**

Muestra	1	2	3	4	5	6
Tinte (M)	$3,4 \times 10^{-5}$	$3,4 \times 10^{-5}$	$3,4 \times 10^{-5}$	$3,4 \times 10^{-5}$	$3,4 \times 10^{-5}$	$3,4 \times 10^{-5}$
EGDA (M)	0	0,0340	0,0340	0,0680	0,0680	0,0340
Enzima (M)	0	$3,4 \times 10^{-7}$	$1,7 \times 10^{-6}$	$3,4 \times 10^{-7}$	$1,7 \times 10^{-6}$	$3,4 \times 10^{-7}$
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (M)	0,0340	0,0340	0,0340	0,0340	0,0340	0,0680

45

[0115] Los gráficos de las Figuras 4, 5A y 5B muestran los efectos de añadir un exceso de enzima, correspondiente a alrededor de 5 veces más de lo empleado anteriormente. El uso de un exceso de enzima disminuyó la velocidad de decoloración (es decir, Figura 4, muestras 3 y 5 en comparación con las muestras 4 y 6; Figura 5A, «1000/0,05/1000» en comparación con «1000/0,01/1000»), lo que sugiere de nuevo un intervalo óptimo para la cantidad de enzima. Al igual que antes, la decoloración se vio favorecida a una razón mayor entre EGDA y enzima (es decir, «2000/0,01/1000» en comparación con «1000/0,01/1000»; Figura 5B).

50

**Efecto de la temperatura sobre la decoloración de Reactive Black 5**

[0116] Se investigó el efecto de aumentar la temperatura de una nominal de 23-25 °C (temperatura ambiente) a 40 °C y 45 °C sobre la decoloración oxidativa de Reactive Black 5. La cantidad de EGDA se cambió a 1500 a 3000 veces la cantidad molar de tinte. Las muestras se prepararon del modo descrito en la Tabla 4.

**Tabla 4**

Muestra	1	2	3	4	5	6
Tinte (M)	$3,4 \times 10^{-5}$	$3,4 \times 10^{-5}$	$3,4 \times 10^{-5}$	$3,4 \times 10^{-5}$	$3,4 \times 10^{-5}$	$3,4 \times 10^{-5}$
EGDA (M)	0	0,0510	0,0510	0,1020	0,1020	0,0510
Enzima (M)	0	0	$1,7 \times 10^{-7}$	$8,5 \times 10^{-8}$	$1,7 \times 10^{-7}$	$8,5 \times 10^{-8}$
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (M)	0,0340	0,0340	0,0340	0,0340	0,0340	0,0340

[0117] El gráfico de la Figura 6 muestra el efecto de aumentar la temperatura a 40 °C. El aumento de temperatura produjo una velocidad de decoloración más rápida. Se observó un empobrecimiento de alrededor de un 80 % de la absorbencia inicial para la muestra que contenía EGDA/enzima/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a una razón de 3000/0,005/1000 tras 1 hora a 40 °C. En comparación, se observó poca decoloración en el control.

[0118] Las Figuras 7A y 7B muestran los efectos de la temperatura (40 °C y 45 °C, respectivamente) sobre la decoloración a distintas razones de EGDA/enzima, como indican las etiquetas de series de datos. La proporción molar de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/tinte se mantuvo constante a 1000. Al igual que antes, el aumento de la cantidad de EGDA aumentó la velocidad de decoloración. Los mínimos de absorbencia, a los cuales el sistema muestra una velocidad de decoloración insignificante (meseta a la absorbencia mínima), se alcanzaron con mayor rapidez a una concentración de enzima mayor. El uso de concentraciones de enzima menores pareció producir unos mínimos de color residual menores, lo que se logró tras un periodo de incubación más largo. Este efecto se acentuó a una temperatura mayor. Se propone que unas concentraciones de enzima menores den lugar a una velocidad menor de hidrólisis de ácido peracético, manteniendo mejor de este modo la concentración de ácido peracético en solución a un nivel suficiente para afectar la decoloración, si bien con unos tiempos de incubación más largos.

[0119] Las Figuras 8A y 8B muestran el porcentaje de decoloración observado mediante cada una de las muestras identificadas en la Tabla 4 a diferentes temperaturas (40 °C y 45 °C, respectivamente). Los efectos beneficiosos de aumentar la razón de EGDA/enzima resultan evidentes. El efecto de usar diferentes cantidades de enzima es menos pronunciado en este experimento.

**Decoloración de Reactive Violet 5R**

[0120] Las muestras experimentales se prepararon del modo descrito en la Tabla 5.

**Tabla 5**

Muestra	1	2	3	4	5	6
Tinte (M)	$3,4 \times 10^{-5}$	$3,4 \times 10^{-5}$	$3,4 \times 10^{-5}$	$3,4 \times 10^{-5}$	$3,4 \times 10^{-5}$	$3,4 \times 10^{-5}$
EGDA (M)	0	0,0510	0,0510	0,1020	0,1020	0,0510
Enzima (M)	0	0	$1,7 \times 10^{-7}$	$8,5 \times 10^{-8}$	$1,7 \times 10^{-7}$	$8,5 \times 10^{-8}$
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (M)	0,0510	0,0510	0,0510	0,0510	0,0510	0,0510

[0121] El gráfico de la Figura 9 muestra la disminución de la absorbencia a 325 nm a temperatura ambiente con diferentes razones de EGDA/enzima. Durante el transcurso del experimento (1,5 h), las velocidades de decoloración (calculadas por medio de las pendientes negativas de las series de datos) parecieron ser similares para todas las muestras que contenían enzima (es decir, las series de datos A3-A6). La decoloración con las muestras de control [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solo (es decir, «0/0») y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/EGDA (es decir, «1500/0»)] fue más pronunciada que la observada para Reactive Black 5; aunque la adición de EGDA y enzima aumentó claramente la cantidad de decoloración.

[0122] El gráfico de la Figura 10 muestra el porcentaje de decoloración observado mediante cada una de las muestras descritas en la Tabla 5. Tras 1,5 h, se observó algo de decoloración para H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solo (aproximadamente un 5 %; muestra 1). La presencia de EGDA aumentó la decoloración a alrededor de un 10 % (muestra 2). Como también se observó para Reactive Black 5, es posible que la combinación de EGDA y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en un medio básico generara un nivel bajo de ácido peracético que fuera capaz de decolorar a una velocidad mayor que con peróxido

solo. La adición de enzima tuvo un efecto pronunciado sobre el aumento de la decoloración, aumentándola a alrededor de 18-22 %, en función de la razón de EGDA/enzima y de la cantidad de enzima.

5 [0123] El experimento de decoloración se repitió a 40 °C por medio del mismo conjunto de muestras, como se muestra en la Tabla 5. Las placas de 96 pocillos que contenían las muestras se incubaron previamente a 40 °C antes de la adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, y la absorbencia se leyó a 325 nm y a 560 nm durante 1,5 h en un lector de placas acondicionado a 40 °C. Las curvas de decoloración resultantes se muestran en las Figuras 11A y 11B, junto con las curvas obtenidas a temperatura ambiente, para su comparación.

10 [0124] El gráfico de la Figura 12A muestra el porcentaje de decoloración observado tras 1,5 h para cada muestra experimental de la Tabla 4 a 40 °C. El gráfico de la Figura 12B incluye además una comparación con la decoloración a temperatura ambiente.

15 [0125] El gráfico de la Figura 13 muestra los resultados después de 2 horas a 40 °C, tras una absorbencia a 560 nm. El porcentaje de decoloración para las muestras que contenían enzima alcanzó un nivel de hasta un 90 %. El mejor rendimiento con respecto a la decoloración se produjo con muestras que contenían una razón más pequeña de enzima.

20 **Ejemplo 2: decoloración de aguas residuales de fábricas de papel**

[0126] Se usó la siguiente composición acuosa para la generación enzimática de ácido peracético:

1,25 g de percarbonato sódico,

1,8 ml de diacetato de propilenglicol (PGDA),

25 27 mg de enzima perhidrolasa (variante S54V de la perhidrolasa *M. smegmatis*; SEQ ID NO: 3) en una formulación granulada que contenía enzima perhidrolasa al 6,6 % (p/p), y

250 ml de agua destilada.

30 [0127] Esta composición produjo un 0,18 % (1800 ppm) de ácido peracético (APA) tras 20 minutos de incubación. En este experimento, se indicó el punto en el tiempo de 20 minutos para la acumulación de APA. Las diluciones se emplearon para producir unas concentraciones menores de APA. El APA se midió por medio de tiras de ensayo de ácido peracético (Merck).

35 [0128] Se trataron muestras de 50 ml de efluente de aguas residuales de fábricas de papel fino con 20, 45, 150 y 300 ppm de APA generado enzimáticamente durante 30 minutos después. El APA generado enzimáticamente (APA enz) se comparó con cantidades equivalentes de APA destilado (APAd) y sin control/referencia de APA.

40 [0129] La eliminación de color se determinó según la norma ISO 7887:1994. En pocas palabras, las muestras se filtraron por medio de filtros de 0,45 µm y se midió la absorbencia a 436, 525 y 620 nm. El coeficiente de absorción espectral se calculó con la fórmula:  $a(\lambda) = A/d \cdot f$ ; donde  $a(\lambda)$  es el coeficiente de absorción espectral, m<sup>-1</sup>; d es la longitud del camino óptico, mm; y f es el factor usado para dar el coeficiente espectral en metros recíprocos (f = 1000). Los resultados están organizados en la Tabla 6.

**Tabla 6.** Coeficientes de absorción espectral para efluente de aguas residuales de fábricas de papel tratado

Muestra	620 nm, (m <sup>-1</sup> )	525 nm, (m <sup>-1</sup> )	436 nm, (m <sup>-1</sup> )
Referencia	1,5	2,7	4,4
APA enz, 20 ppm	0,95	1,95	3,95
APA enz, 48 ppm	0,65	1,45	3,15
APA enz, 150 ppm	0,4	0,6	2,05
APA enz, 300 ppm	0,45	0,55	1,8
APAd, 20 ppm	0,7	1,35	3,55
APAd, 48 ppm	1,35	1,7	3,55
APAd, 150 ppm	0,5	1,05	4,3
APAd, 300 ppm	0,05	0,05	1,15

[0130] Tanto el APA generado enzimáticamente como el APA destilado disminuyeron el color de las aguas residuales de un modo dependiente de la dosis.

**Ejemplo 3: eliminación de color a partir de pulpa destintada**

5 [0131] Se evaluó la eliminación de color a partir de pulpa reciclada en 750 ml de pulpa destintada al 2 % a temperatura ambiente durante 30 minutos con mezclador mecánico (400 rpm). El APA generado enzimáticamente y el APA destilado se sometieron a ensayo en dosis de 1000 ppm. El APA destilado se diluyó en 10 ml de agua destilada y se añadió a la muestra de pulpa para producir una concentración calculada de 1000 ppm. Para  
10 muestras tratadas con enzima, la composición que contenía enzima se añadió directamente a la pulpa. Hojas de papel elaboradas a partir de las muestras de pulpa se sometieron a un análisis de brillo según la norma ISO 2470:1999. El color de la fase acuática se determinó según la norma ISO 7887:1994, como se describe en el Ejemplo 2. Los resultados están organizados en las Tablas 7 y 8.

**Tabla 7.** Brillo de hojas de papel tratado elaboradas a partir de pulpa destintada

Punto de medida	Número de ensayos	Brillo de referencia, % (desv. típica)	Brillo APA enz, % (desv. típica)	Brillo APAd, % (desv. típica)
Lado inferior	4	57,5 (0,3)	59,9 (0,1)	58,8 (0,6)
Lado superior	4	58,6 (0,2)	59,9 (0,4)	59,8 (0,3)
Promedio	8	58 (0,6)	59,9 (0,3)	59,3 (0,7)

15

**Tabla 8.** Coeficientes de absorción espectral de fase acuática a partir de muestras de pulpa destintada

Muestra	620 nm, (m <sup>-1</sup> )	525 nm, (m <sup>-1</sup> )	436 nm, (m <sup>-1</sup> )
Referencia	0,4	1,35	2,03
APA enz	0	0,1	0,53
APAd	0	0,15	0,83

20

[0132] El tratamiento tanto con APA generado enzimáticamente como con APA destilado dio lugar a menos compuestos residuales coloreados en la fase acuática y a hojas de papel ligeramente más brillantes.

## REIVINDICACIONES

- 5                   1. Método de decoloración de un tinte que está presente en efluente de aguas residuales a partir de un proceso de elaboración textil, que comprende la puesta en contacto del tinte con una composición que comprende:
- una enzima perhidrolasa
- un sustrato de éster para la enzima perhidrolasa que presenta fracciones de éster de ácido carboxílico, y
- 10                   una fuente de peróxido de hidrógeno;
- donde dichas fracciones de éster de ácido carboxílico de dicho sustrato de éster se proporcionan en:
- 15                   (i) 20 a 20 000 veces la cantidad molar de tinte para decolorarse, y
- (ii) una proporción molar de al menos  $2 \times 10^5/1$  con respecto a la enzima perhidrolasa, y;
- donde un perácido es producido por acción catalítica de la enzima perhidrolasa sobre dicho sustrato de éster en presencia de peróxido de hidrógeno.
- 20                   2. Método de la reivindicación 1, donde el proceso de elaboración textil es un proceso de teñido textil.
3. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la enzima perhidrolasa cataliza la perhidrólisis del sustrato de éster con una razón de perhidrólisis:hidrólisis igual o superior a 1.
- 25                   4. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la enzima perhidrolasa comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:1 o una variante u homóloga de esta.
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde:
- 30                   (i) la enzima perhidrolasa comprende una secuencia de aminoácidos que presenta al menos un 70 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de amino expuesta en la SEQ ID NO: 1;
- (ii) la enzima perhidrolasa es la variante S54V de la enzima perhidrolasa que presenta la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1; o
- 35                   (iii) la enzima perhidrolasa comprende una secuencia de aminoácidos que presenta al menos un 70 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de amino expuesta en la SEQ ID NO:3.
- 40                   6. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el sustrato de éster se selecciona del grupo que consiste en diacetato de propilenglicol (PGDA), diacetato de etilenglicol (EGDA), tracetina, acetato de etilo y tributirina.
- 45                   7. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el peróxido de hidrógeno se proporciona en forma de una fuente de peróxido de hidrógeno seleccionada del grupo que consiste en peróxido de hidrógeno, percarbonato y perborato.
8. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el tinte es un tinte textil.
- 50                   9. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde:
- (i) la proporción molar entre fracciones de éster de ácido carboxílico en el sustrato y moléculas de enzima es de  $4 \times 10^5/1$  a  $4 \times 10^6/1$ ; o
- 55                   (ii) la proporción molar entre fracciones de éster de ácido carboxílico en el sustrato y moléculas de enzima es de al menos  $4 \times 10^5/1$ .
10. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la proporción molar entre fracciones de éster de ácido carboxílico en el sustrato y molécula de tinte es de 1000/1 a 10 000/1.
- 60                   11. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la concentración de enzima perhidrolasa es inferior o igual a  $5 \times 10^6$  M.

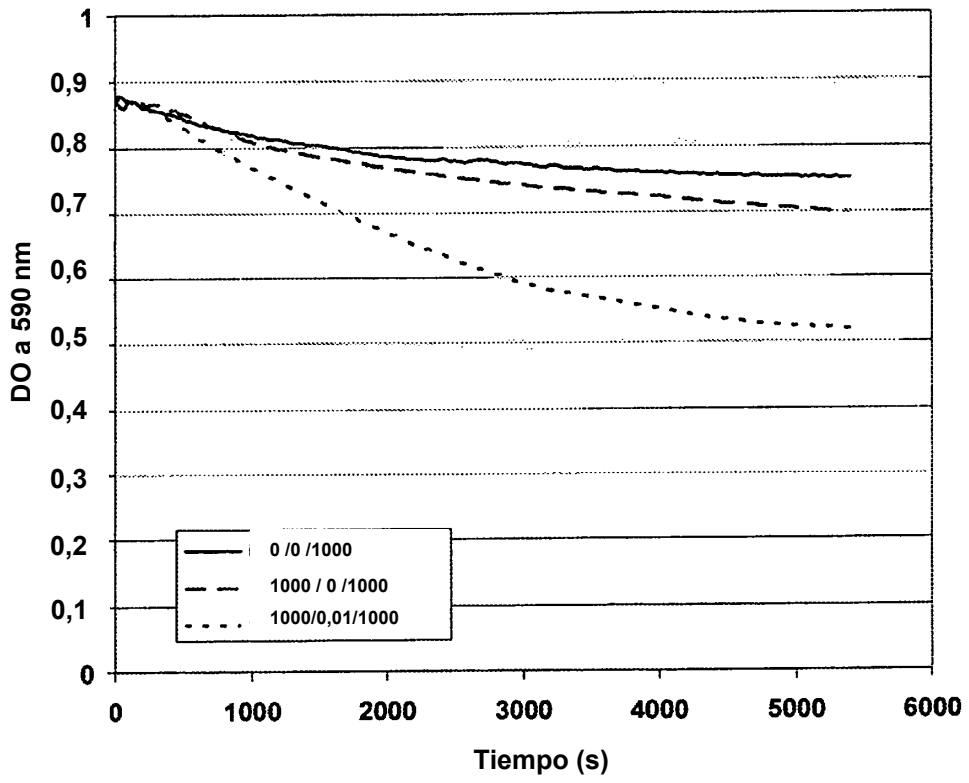


Figura 1

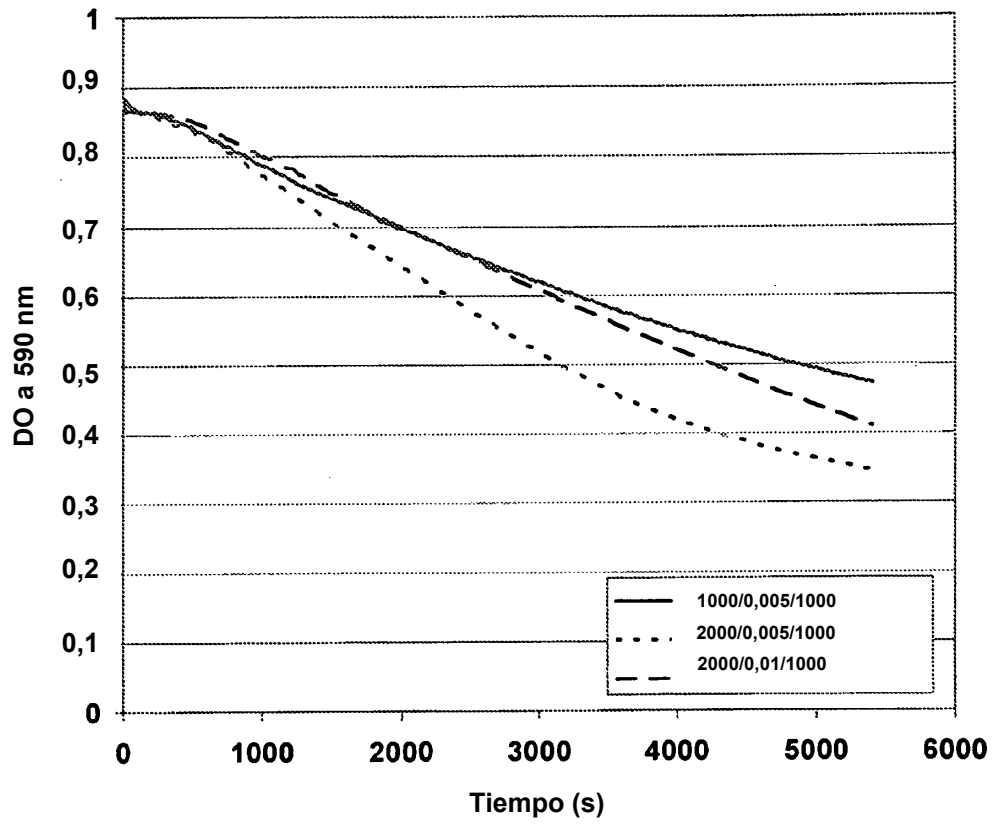
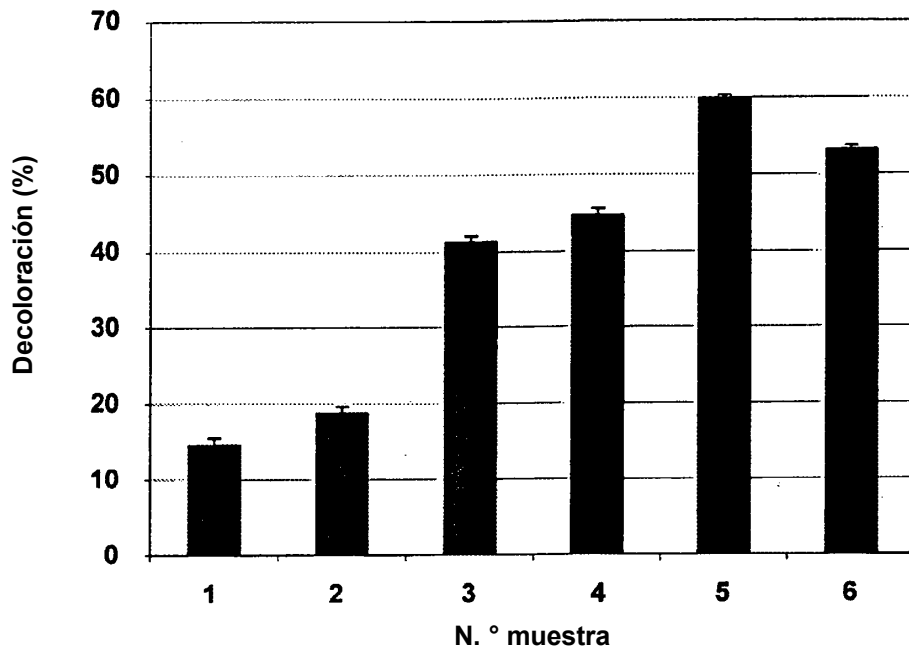
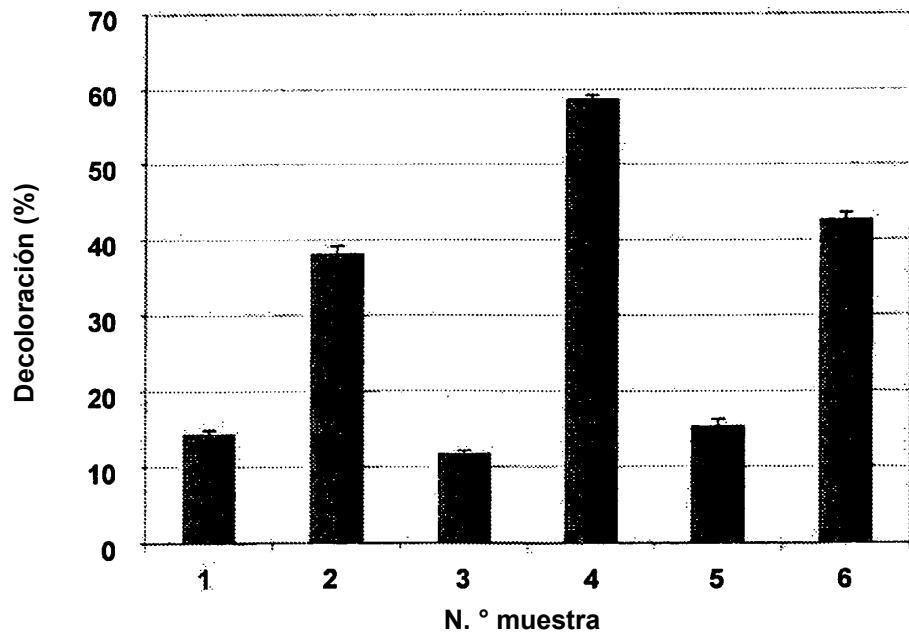


Figura 2



**Figura 3**



**Figura 4**



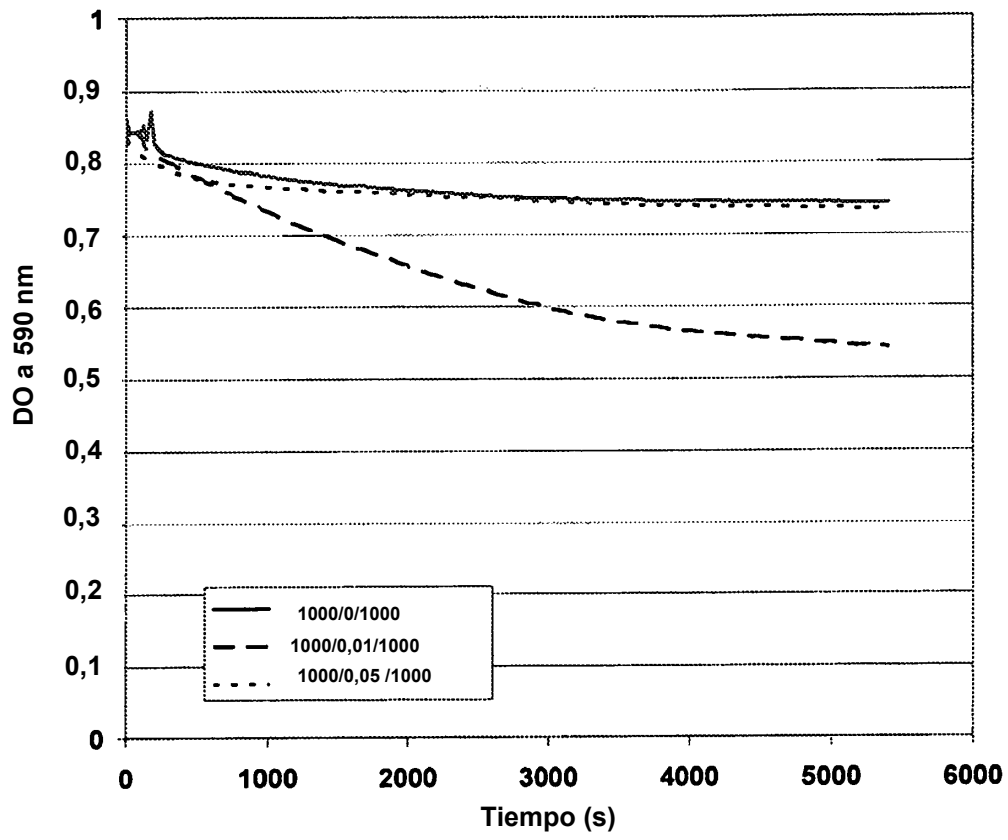


Figura 5A

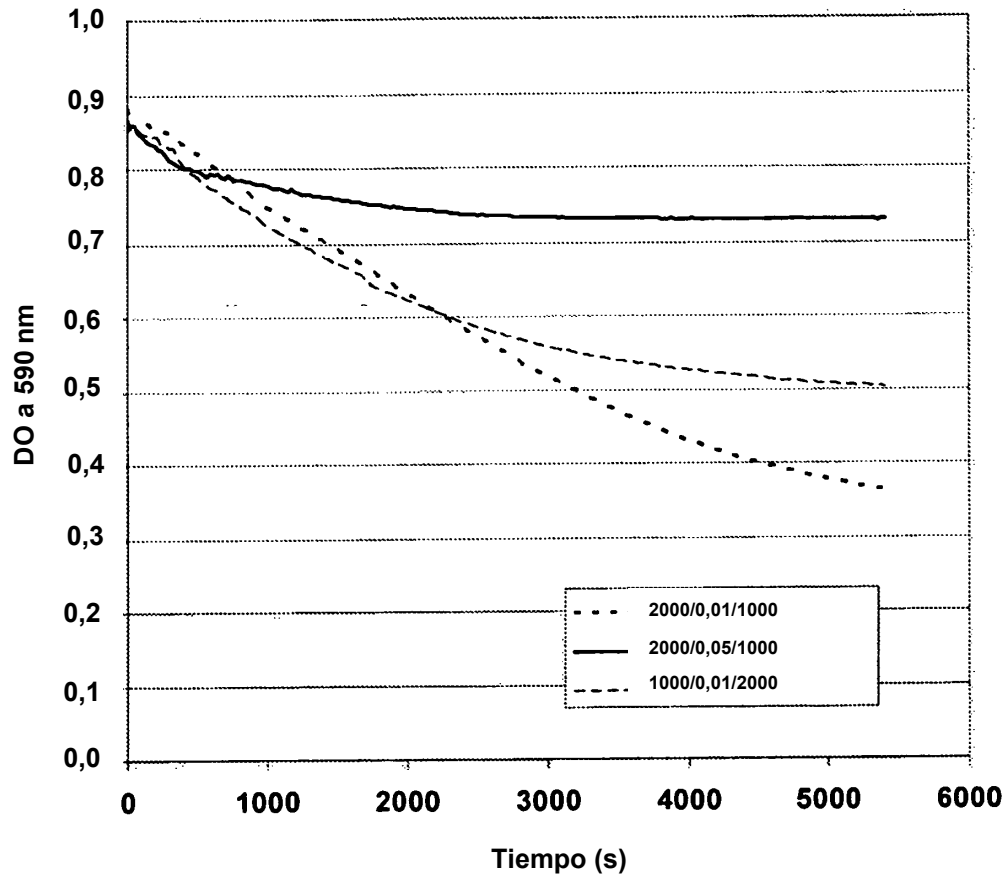


Figura 5B

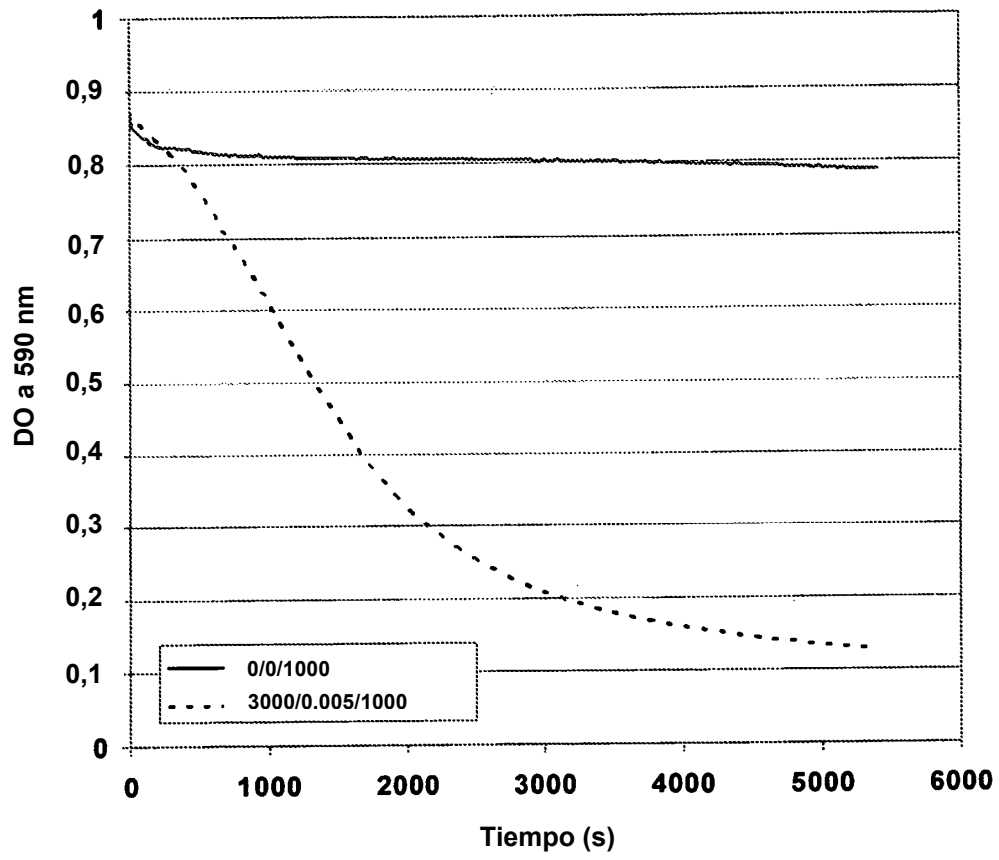


Figura 6

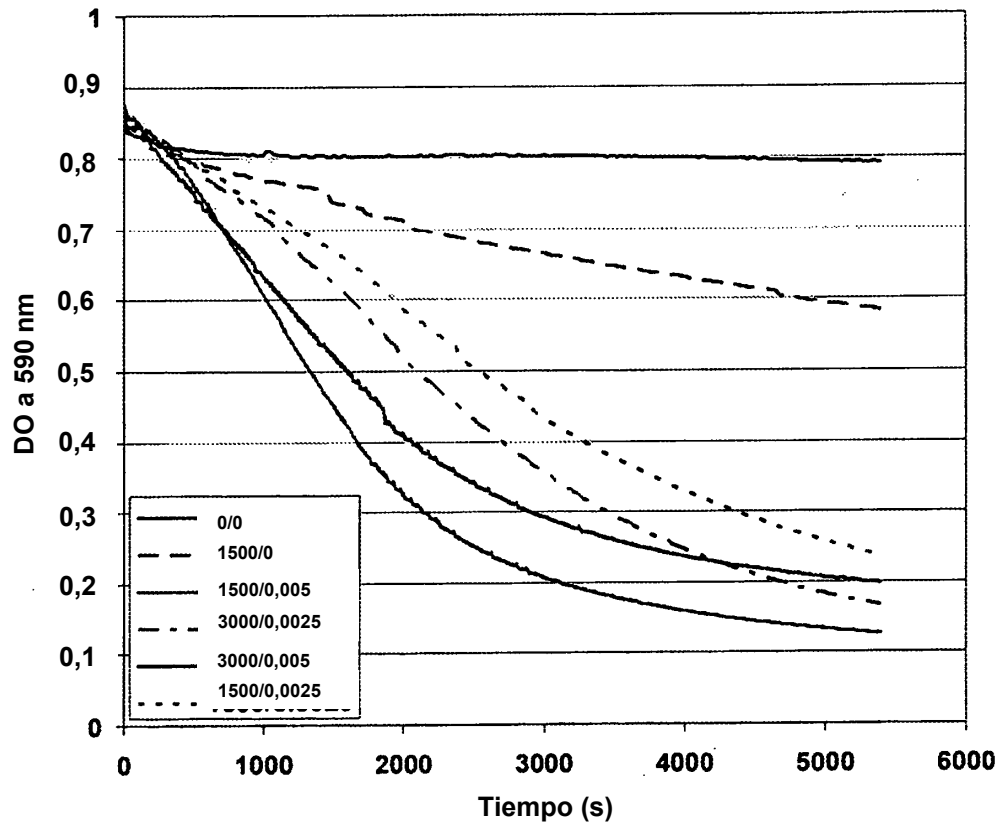


Figura 7A

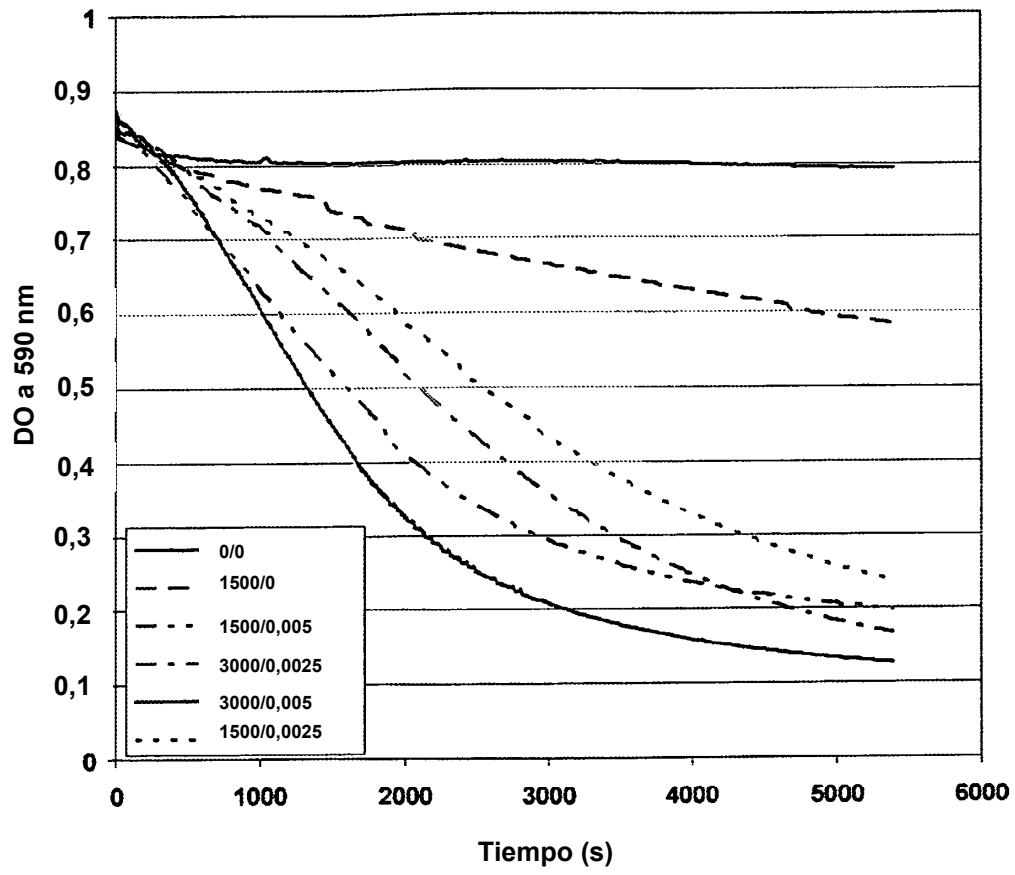


Figura 7B

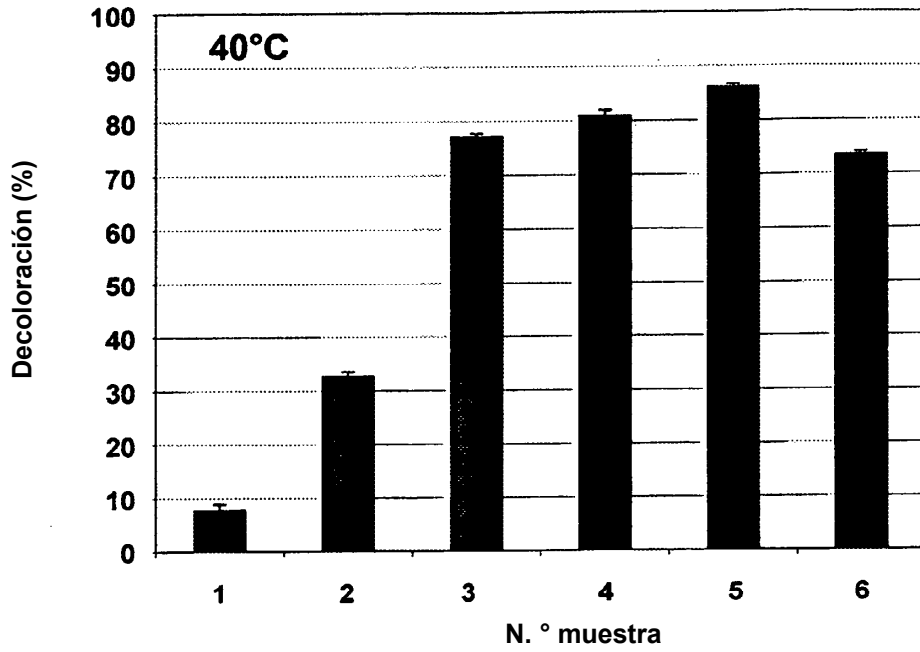


Figura 8A

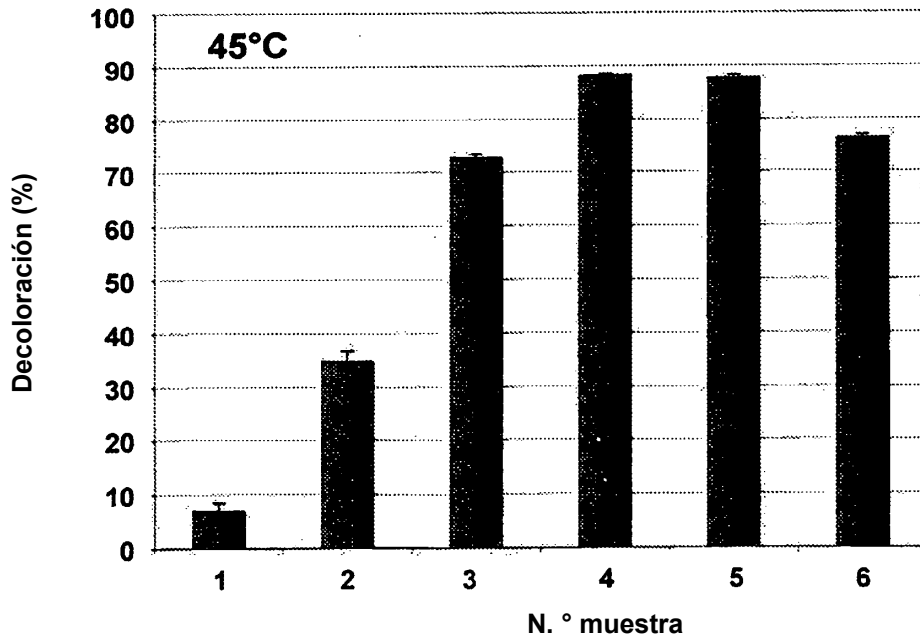


Figura 8B

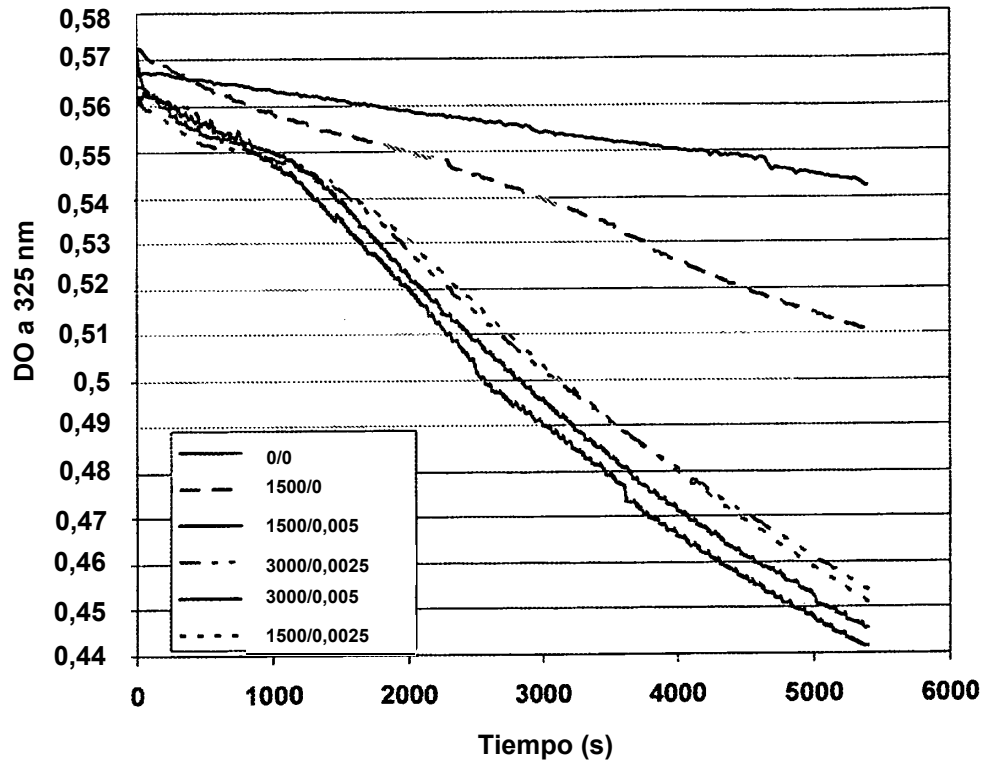
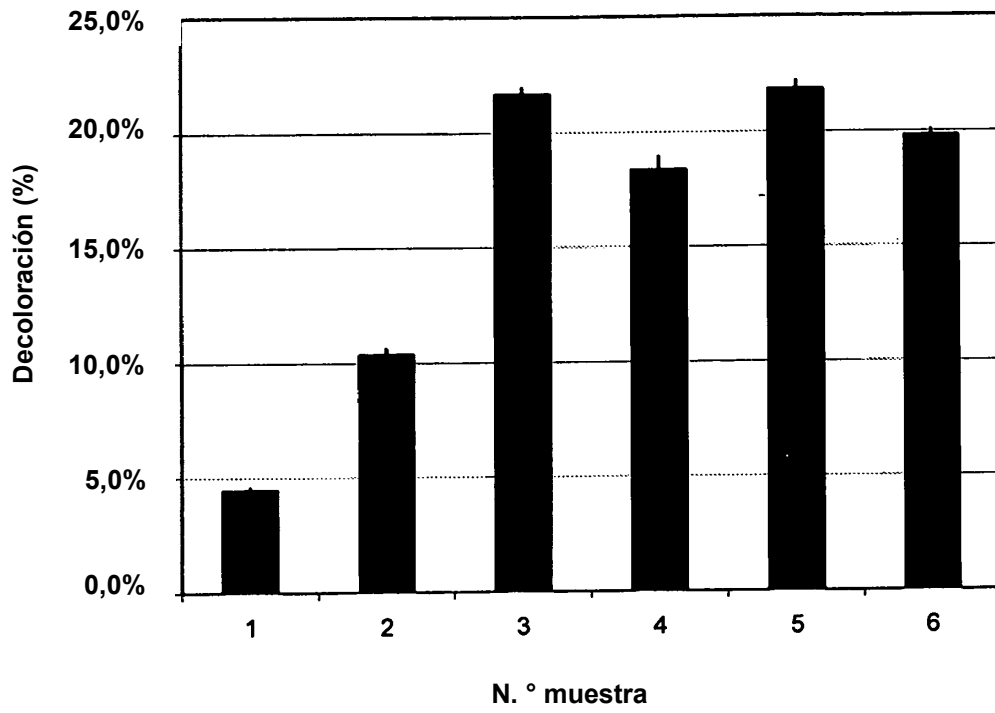


Figura 9



**Figura 10**



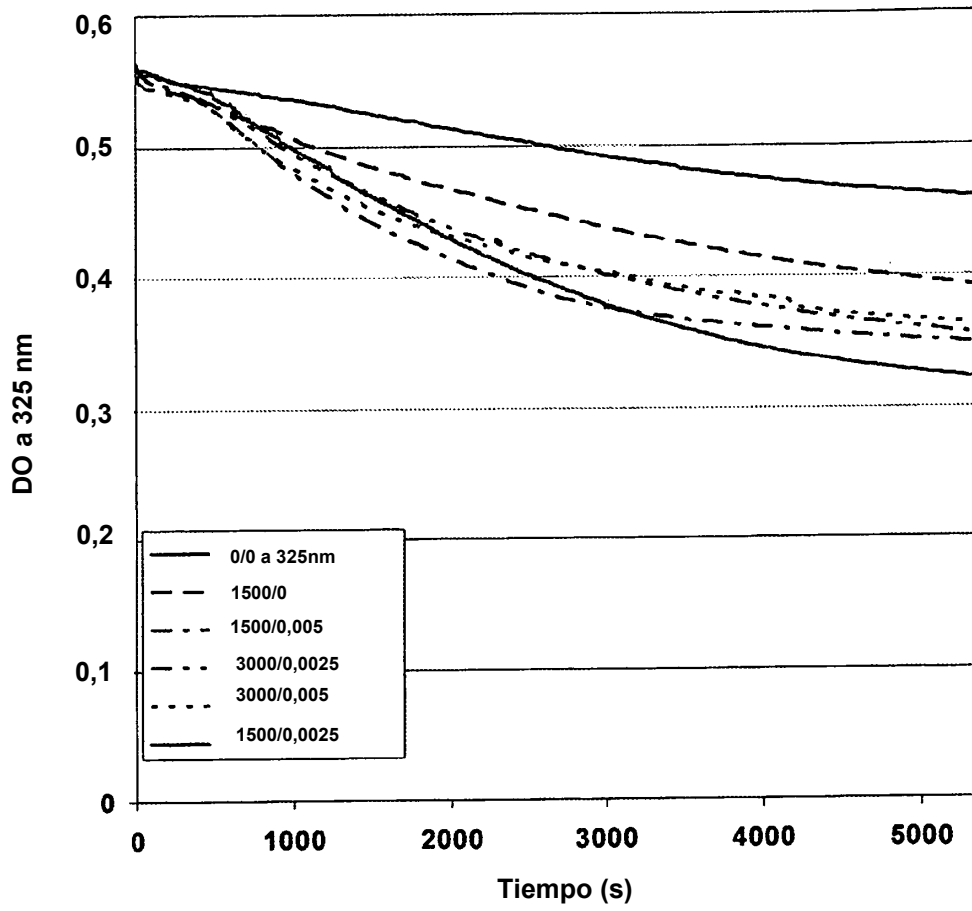


Figura 11 A

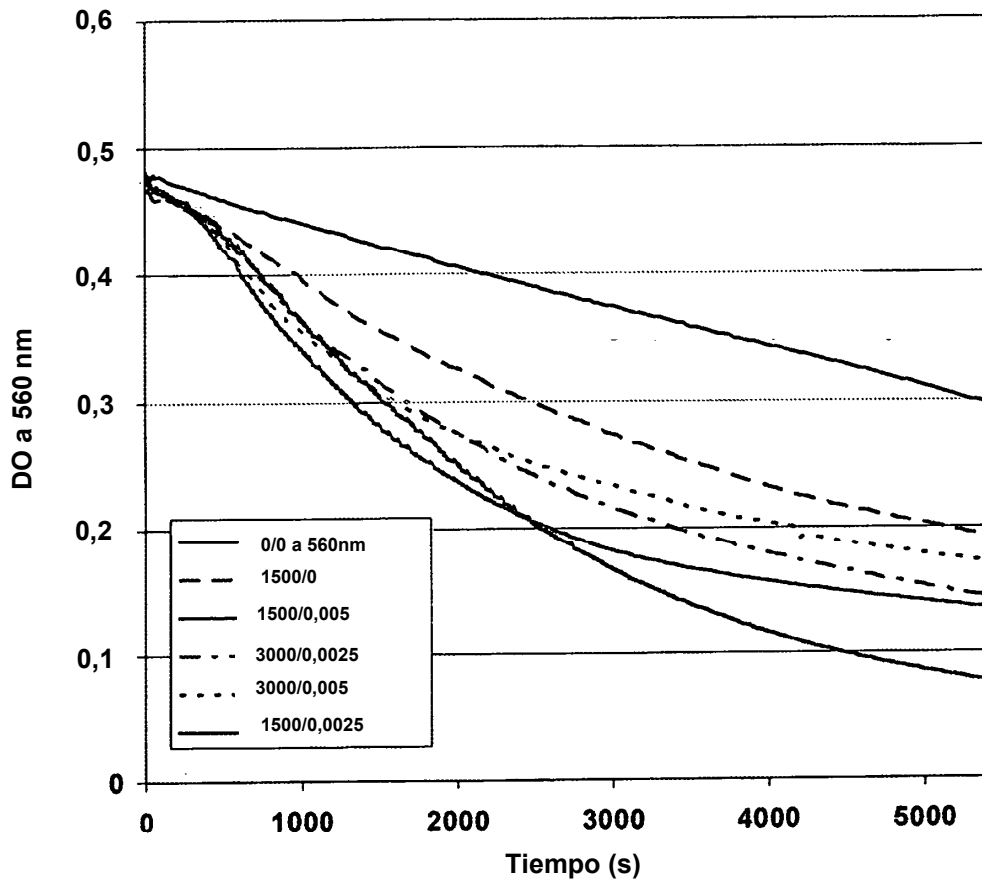
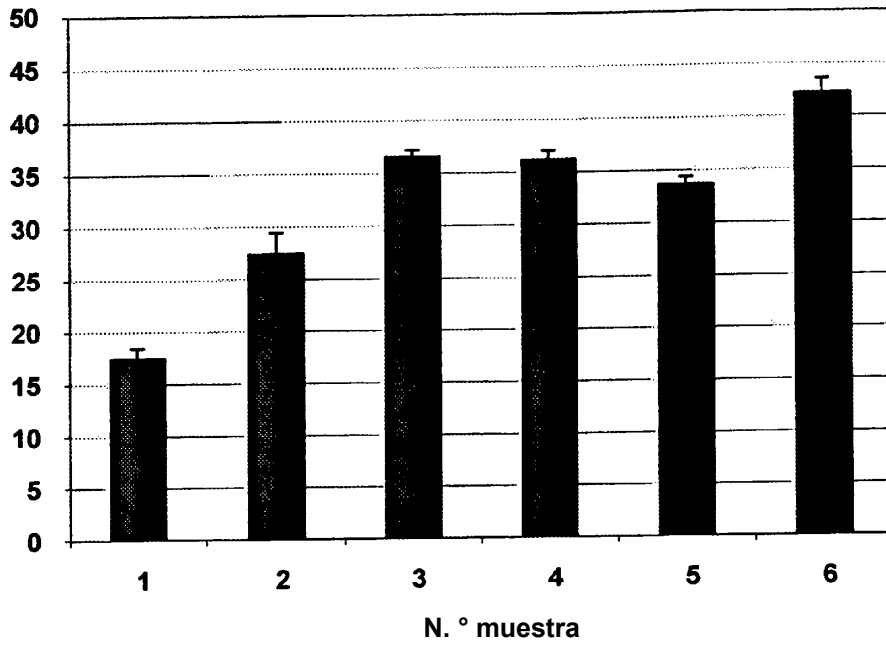
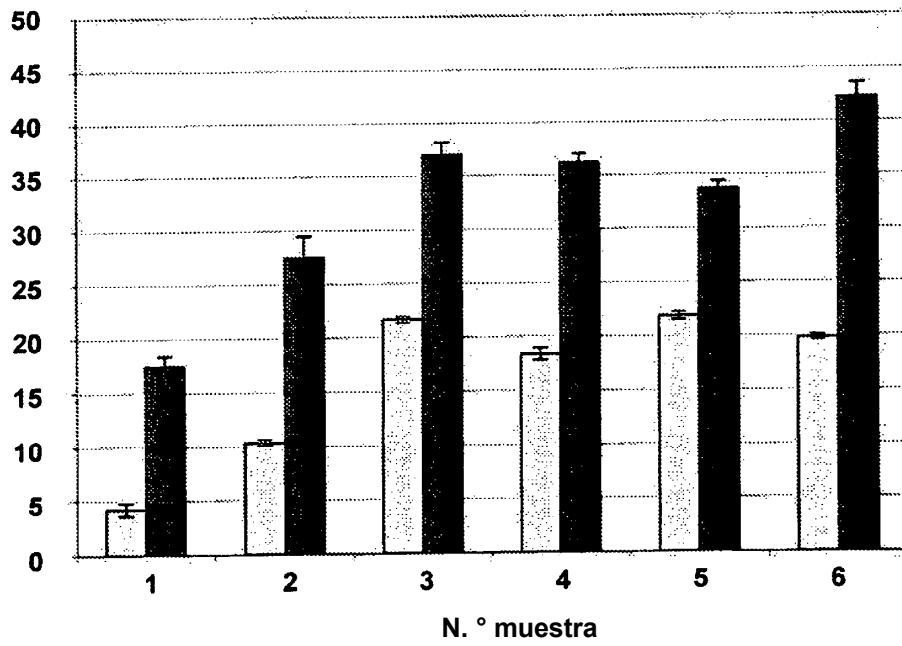


Figura 11 B



**Figura 12 A**



**Figura 12 B**

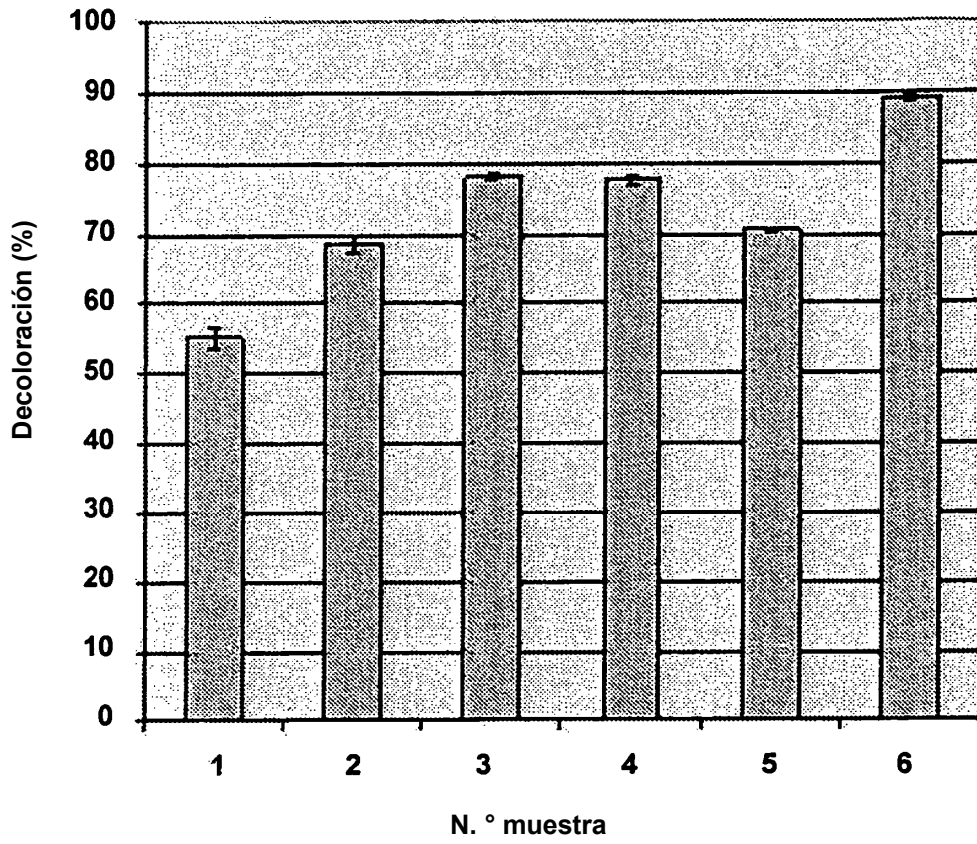


Figura 13