

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 684 577**

51 Int. Cl.:

**C12N 9/08** (2006.01)

**C11D 3/386** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.05.2014 PCT/EP2014/059916**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.11.2014 WO14187719**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.05.2014 E 14723824 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.07.2018 EP 2999782**

54 Título: **Peroxidasas con actividad para carotenoides**

30 Prioridad:

**23.05.2013 DE 102013209545**

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

**03.10.2018**

73 Titular/es:

**HENKEL AG & CO. KGAA (100.0%)**

**Henkelstrasse 67**

**40589 Düsseldorf, DE**

72 Inventor/es:

**WEBER, THOMAS;**

**MERKEL, MARION;**

**PRÜSER, INKEN;**

**MUSSMANN, NINA;**

**O'CONNELL, TIMOTHY;**

**HELLMUTH, HENDRIK;**

**LINKE, DIANA y**

**BERGER, RALF G.**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 684 577 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

Peroxidasas con actividad para carotenoides

5 La presente invención se refiere al campo de la tecnología enzimática. La invención se refiere a peroxidasas con actividad para carotenoides, a su preparación, a todas las peroxidasas suficientemente similares y a ácidos nucleicos que codifican las mismas así como a organismos hospedadores que contienen estos ácidos nucleicos. La invención se refiere además a procedimientos que usan estas peroxidasas, así como a agentes que contienen las mismas, en particular agentes de lavado y de limpieza.

10 El empleo de enzimas en agentes de lavado y de limpieza está establecido en el estado de la técnica. Sirven para ampliar el espectro de rendimiento de los respectivos agentes de forma correspondiente a sus actividades especiales. A esto pertenecen en particular enzimas hidrolíticas, tales como proteasas, amilasas, lipasas y celulasas.

15 Las tres primeras mencionadas hidrolizan proteínas, almidón y grasas y contribuyen así directamente a la eliminación de la suciedad. Las celulasas se emplean en particular debido a su efecto en tejidos. Para el aumento del efecto de blanqueo se usan en los agentes de lavado o de limpieza no obstante también oxidorreductasas, por ejemplo oxidasas, oxigenasas, catalasas (que reaccionan a bajas concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como peroxidasas), peroxidasas, tales como halo-, cloro-, bromo-, lignina-, glucosa- o manganesoperoxidasas, dioxigenasas o lacasas (fenoloxidasas, polifenoloxidasas).

20 Los sistemas de blanqueo enzimáticos adecuados se conocen en el estado de la técnica, por ejemplo por las publicaciones de patentes internacionales WO 98/45398 A1, WO 2004/058955 A2, WO 2005/124012 y WO 2005/056782 A2. Tales sistemas enzimáticos se pueden combinar ventajosamente con compuestos orgánicos, de forma particularmente preferente aromáticos, que interaccionan con las enzimas, para intensificar la actividad de las oxidorreductasas en cuestión (potenciadores) o para garantizar, en caso de potenciales redox fuertemente diferenciados, entre las enzimas oxidantes y las impurezas el flujo de electrones (mediadores).

30 No se pueden emplear sistemas de blanqueo convencionales a base de percarbonato, peróxido o cloro en formulaciones que contienen agua, es decir, en particular en muchas formulaciones líquidas. Además, el consumidor percibe el empleo de tales sistemas, en comparación con los sistemas enzimáticos, como agresivo y perjudicial para el medio ambiente. En este sentido es deseable el empleo de sistemas enzimáticos por motivos de sostenibilidad.

35 No obstante, los sistemas de blanqueo enzimáticos se basan habitualmente así mismo en la generación enzimática de peróxido de hidrógeno mediante la degradación de sustratos enzimáticos adecuados. Estos sustratos se tienen que añadir a los agentes de lavado o de limpieza y representan un factor de costes adicional y, en parte, también un factor de riesgo toxicológico o alergológico adicional. En sistemas de un componente líquidos se plantea además el problema de que el sustrato y la enzima ya antes del empleo se ponen en contacto en el baño de lavado o de limpieza y, por tanto, se tiene que evitar con complejidad una degradación prematura del sustrato.

40 No obstante, los sistemas de blanqueo son necesarios para la eliminación de determinadas suciedades de intensa coloración sobre materiales textiles y superficies duras, por ejemplo suciedades que contienen carotenoide, para conseguir un rendimiento de limpieza satisfactorio. Las suciedades que contienen carotenoide sobre materiales textiles son difíciles de eliminar con agentes de lavado líquidos disponibles en el mercado. Además, las suciedades que contienen carotenoide sobre la vajilla plantean el problema de que se distribuyen durante el lavado a máquina de la vajilla en el baño de limpieza y difunden al interior de los plásticos y colorean los mismos. Estas decoloraciones son conocidas por el usuario y es deseable reducir las mismas.

50 Por tanto, existe una necesidad de sistemas enzimáticos independientes de sustrato, que en particular en suciedades que contienen carotenoide causen un blanqueo o que decoloren estas suciedades, y que eviten la nueva adherencia de suciedades que colorean desde el baño de lavado o de limpieza sobre los objetos que se van a lavar.

55 Para ser adecuados para el empleo en agentes de lavado y de limpieza, además es deseable que tales sistemas enzimáticos presenten una actividad enzimática en el intervalo de valor de pH de neutro a ligeramente alcalino y en un intervalo de temperaturas amplio de hasta 95 °C, en particular en el intervalo de 30-65 °C.

60 Las peroxidasas de *Bjerkandera adusta* se conocen en el estado de la técnica (Moreira *et al.* J Biotechnol. (2005), 118(4): 339-352; Mohoric *et al.* Bioresource Techn. (2009), 100(2): 851-858). Ahora se ha encontrado una nueva peroxidasa de *Bjerkandera adusta*, que presenta las propiedades deseadas y, por tanto, es particularmente adecuada para el empleo en agentes de lavado y de limpieza. La peroxidasa hallada posee una clara actividad sobre carotenoides. Por ello se puede emplear la enzima también sin sustratos adicionales para el blanqueo de suciedades que contienen carotenoide.

65 En un primer aspecto, por tanto, la invención se refiere a una peroxidasa que comprende una secuencia de aminoácidos, que tiene una identidad con la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO: 1 a lo largo de toda su longitud. En distintas formas de realización, la peroxidasa posee una actividad enzimática para carotenoides.

Las enzimas descritas en el presente documento son preferentemente de origen fúngico, en particular homólogos de la peroxidasa de *Bjerkandera adusta* con la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO: 1.

Las peroxidases descritas en el presente documento presentan una actividad enzimática, es decir, son capaces de escindir oxidativamente los carotenoides. La escisión oxidativa es independiente de la presencia de peróxido de hidrógeno, pero se puede intensificar por la presencia de peróxido de hidrógeno. En el caso de la peroxidasa descrita en el presente documento se trata preferentemente de una peroxidasa madura (*mature*), es decir, de la molécula catalíticamente activa sin péptido o péptidos señal y/o propéptido o propéptidos. Siempre que no se indique otra cosa, también las secuencias indicadas se refieren en cada caso a enzimas maduras.

El término "carotenoides", como se usa en el presente documento, se refiere a compuestos de la clase de sustancias de los terpenos, que aparecen como colorantes naturales que causan una coloración de amarilla a rojiza. Se conocen aproximadamente 800 carotenoides distintos, que aparecen sobre todo en los cromoplastos y plastidios de las plantas, en bacterias, pero también en la piel, la cáscara y el caparazón de animales así como en las plumas y en la yema de huevo de las aves, cuando los correspondientes animales ingieren con su alimento material vegetal que contiene colorante. Solo las bacterias, las plantas y los hongos están en disposición de sintetizar *de novo* estos pigmentos. Los carotenoides están estructurados formalmente a partir de 8 unidades de isopreno y, con ello, pertenecen a los tetraterpenos. Se clasifican en carotenos, que están estructuradas solo a partir de carbono e hidrógeno, y xantofilas, derivados que contienen oxígeno de los carotenos. El espectro de absorción de los carotenoides se encuentra en longitudes de onda en el intervalo de 400 a 500 nanómetros. El carotenoide más conocido que aparece con mayor frecuencia es el  $\beta$ -caroteno (zanahoria), que se conocen también como provitamina A. Otros carotenoides que aparecen frecuentemente son  $\alpha$ -caroteno, licopeno (tomate),  $\beta$ -criptoxantina, capsantina (pimiento rojo), luteína y zeaxantina.

Además, formas de realización preferentes de las peroxidases disponen de una particular estabilidad en agentes de lavado o de limpieza, por ejemplo con respecto a tensioactivos y/o agentes de blanqueo y/o con respecto a influencias de temperatura, en particular frente a altas temperaturas, en particular durante el proceso de lavado o de limpieza, por ejemplo entre 50 y 65 °C, en particular 60 °C, y/o con respecto a condiciones ácidas o alcalinas y/o con respecto a cambios del valor de pH y/o con respecto a agentes desnaturalizantes u oxidantes y/o con respecto a degradación proteolítica y/o con respecto a un cambio de las condiciones redox.

De acuerdo con otra forma de realización particular, las peroxidases de acuerdo con la invención presentan una buena estabilidad en almacenamiento en formulaciones de agentes de lavado o agentes de limpieza, por ejemplo medido a 30 °C y temperaturas superiores, en particular a 35 °C o 40 °C.

En distintas formas de realización de la invención, la peroxidasa comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad con la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO: 1 a lo largo de toda su longitud de al menos el 98,5 %, el 98,8 o el 99,0 %. Los valores numéricos, que están indicados en el presente documento sin decimales, se refieren en cada caso al valor indicado completo con un punto decimal. Así por ejemplo "99 %" se refiere a "99,0 %". El término "aproximadamente", en relación con un valor numérico, se refiere a una varianza de  $\pm 10$  % con respecto al valor numérico indicado.

En otro aspecto, la invención se refiere a un agente, que está caracterizado por que contiene una peroxidasa que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO: 1 a lo largo de toda su longitud de al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 98,5 % o al menos el 99,0 %, preferentemente al menos el 99,2 %, al menos el 99,3 %, al menos el 99,4 %, al menos el 99,5 %, preferentemente al menos el 99,6 %, al menos el 99,7 % o al menos el 99,8 %. Una peroxidasa de este tipo posee una actividad enzimática para carotenoides, es decir, está en disposición de usar los carotenoides como sustrato y escindir los mismos oxidativamente. La actividad para carotenoides es detectable, ya que se puede medir y, preferentemente, también cuantificar por ejemplo con los ensayos descritos en los ejemplos.

Las enzimas usadas en el agente son preferentemente de origen fúngico, en particular de basidiomicetos, de forma particularmente preferente homólogos de la peroxidasa de *Bjerkandera adusta* con la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO: 1. Preferentemente, el agente es un agente de lavado o de limpieza inclusive un agente para el lavado (a máquina) de la vajilla. Ya que las peroxidases descritas en el presente documento presentan rendimientos de limpieza ventajosos en particular sobre suciedades que contienen carotenoide, los agentes son particularmente adecuados y ventajosos para la eliminación de tales suciedades que contienen carotenoide. Tales agentes contienen las peroxidases descritas en el presente documento en una cantidad del  $1 \times 10^{-8}$  al 1 % en peso, del  $1 \times 10^{-7}$  al 0,5 % en peso, del 0,00001-0,3 % en peso, del 0,0001-0,2 % en peso y de forma particularmente preferente del 0,001 a 0,1 % en peso, en cada caso con respecto a la proteína activa.

La concentración de proteína (activa) se puede determinar con ayuda de métodos conocidos, por ejemplo el procedimiento de BCA (ácido bicinconínico; ácido 2,2'-biquinolil-4,4'-dicarboxílico) o el procedimiento de Biuret.

La determinación de la identidad de las secuencias de ácido nucleico o de aminoácidos se realiza mediante una comparación de secuencias. Esta comparación de secuencias se basa en el algoritmo BLAST establecido en el estado de la técnica y empleado habitualmente (compárese por ejemplo con Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. (1990) "Basic local alignment search tool." J. Mol. Biol. 215: 403-410, y Altschul, Stephan F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Hheng Zhang, Webb Miller, y David J. Lipman (1997): "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs"; Nucleic Acids Res., 25, pág. 3389-3402) y tiene lugar en principio al asignarse sucesiones similares de nucleótidos o aminoácidos en las secuencias de ácido nucleico o de aminoácidos unas a otras. Una asignación tabulada de las respectivas posiciones se denomina alineamiento. Otro algoritmo disponible en el estado de la técnica es el algoritmo FASTA. Se crean comparaciones de secuencias (alineamientos), en particular comparaciones de secuencias múltiples, con programas informáticos. Con frecuencia se emplea por ejemplo la serie Clustal (compárese por ejemplo con Chenna *et al.* (2003): Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. Nucleic Acid Research 31, 3497-3500), T-Coffee (compárese por ejemplo con Notredame *et al.* (2000): T-Coffee: A novel method for multiple sequence alignments. J. Mol. Biol. 302, 205-217) o programas que se basan en estos programas o algoritmos. En la presente solicitud de patente se crearon todas las comparaciones de secuencias (alineamientos) con el programa informático Vector NTI® Suite 10.3 (Invitrogen Corporation, 1600 Faraday Avenue, Carlsbad, California, EE. UU.) con los parámetros convencionales predefinidos, cuyo módulo AlignX para las comparaciones de secuencia se basa en ClustalW.

Una comparación de este tipo permite también realizar una afirmación acerca de la similitud de las secuencias comparadas entre sí. Se indica habitualmente en porcentaje de identidad, es decir, la proporción de los nucleótidos o restos aminoacídicos idénticos en las mismas posiciones o en posiciones correspondientes entre sí en un alineamiento. El término más amplio de la homología incluye sustituciones de aminoácidos conservadoras en secuencias de aminoácidos, es decir, aminoácidos con actividad química similar, ya que las mismas dentro de la proteína ejercen la mayoría de las veces actividades químicas similares. Por tanto, la similitud de las secuencias comparadas también puede estar indicada como porcentaje de homología o porcentaje de similitud. Las indicaciones de identidad y/u homología se pueden realizar acerca de polipéptidos o genes completos o solo acerca de regiones individuales. Las regiones homólogas o idénticas de distintas secuencias de ácido nucleico o de aminoácidos, por tanto, están definidas por coincidencias en las secuencias. Tales regiones presentan con frecuencia funciones idénticas. Pueden ser pequeñas y comprender solo pocos nucleótidos o aminoácidos. Con frecuencia, regiones tan pequeñas ejercen funciones esenciales para la actividad global de la proteína. Por tanto, puede ser razonable que las coincidencias de secuencia hagan referencia solo a regiones individuales, dado el caso pequeñas. Siempre que no se indique otra cosa, las indicaciones de identidad u homología en la presente solicitud se refieren, no obstante, a la longitud total de la secuencia de ácido nucleico o de aminoácidos indicada en cada caso.

Las peroxidasas descritas en el presente documento pueden presentar en comparación con la secuencia indicada en la SEQ ID NO: 1 cambios de aminoácidos, en particular sustituciones, inserciones o deleciones de aminoácidos. Tales peroxidasas se han perfeccionado por ejemplo mediante un cambio genético dirigido, por ejemplo mediante procedimientos de mutagénesis, y se han optimizado para determinados fines de uso o con respecto a propiedades especiales (por ejemplo, con respecto a su actividad catalítica, estabilidad, etc.). En particular, aparte se puede mejorar también la producibilidad, el procesamiento, la secreción y otras etapas de la producción, inclusive el procesamiento cadena abajo mediante cambios genéticos dirigidos, en particular mediante procedimientos de mutagénesis.

Además se pueden introducir ácidos nucleicos descritos en el presente documento en preparaciones de recombinación y emplearse, por tanto, para la generación de peroxidasas completamente novedosas o de otros polipéptidos.

El fin es incorporar en las moléculas mutaciones dirigidas, tales como sustituciones, inserciones o deleciones, para mejorar por ejemplo el rendimiento de las enzimas descritas en el presente documento. Para esto se puede cambiar en particular las cargas superficiales y/o el punto isoeléctrico de las moléculas y, por ello, sus interacciones con el sustrato. Así se puede modificar por ejemplo la carga neta de las enzimas, para influir a través de esto en la unión a sustrato en particular para el empleo en agentes de lavado y de limpieza. Como alternativa o de forma complementaria, mediante una o varias mutaciones correspondientes se puede aumentar la estabilidad de la proteasa y mejorarse por ello su rendimiento.

Otro objeto desvelado en el presente documento es, por lo tanto, una peroxidasa, que está caracterizada por que se puede obtener a partir de una peroxidasa, tal como se ha descrito anteriormente, como molécula de partida mediante una sustitución de aminoácidos conservadora sencilla o múltiple. La expresión "sustitución de aminoácidos conservadora" significa el intercambio (sustitución) de un resto aminoacídico por otro resto aminoacídico, no conduciendo esta sustitución a un cambio de la polaridad o la carga en la posición del aminoácido sustituido, por ejemplo, la sustitución de un resto aminoacídico no polar por otro resto aminoacídico no polar. Las sustituciones de aminoácidos conservadoras en el marco de la invención comprenden por ejemplo: G=A=S, I=V=L=M, D=E, N=Q, K=R, Y=F, S=T, G=A=I=V=L=M=Y=F=W=P=S=T.

Como alternativa o de forma complementaria, la peroxidasa está caracterizada por que se puede obtener a partir de una peroxidasa descrita en el presente documento como molécula de partida mediante fragmentación, mutagénesis de fusión-delección, inserción o sustitución y comprende una secuencia de aminoácidos, que coincide a lo largo de una longitud de al menos 100, 150, 200, 250, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360 o 365 aminoácidos relacionados con la molécula de partida.

Por proteínas obtenidas por mutación de inserción se ha de entender aquellas variantes que se han obtenido a través de métodos en sí conocidos mediante incorporación de un fragmento de ácido nucleico o de proteína en las secuencias de partida. Se han de asignar a causa de la similitud principal a las proteínas quiméricas. Se diferencian de las mismas únicamente en la relación de tamaños de la parte de proteína sin modificar con respecto al tamaño de toda la proteína. En tales proteínas de mutación de inserción, la proporción de proteína extraña es menor que en las proteínas quiméricas.

Por fragmentos se entiende todas las proteínas o péptidos que son de menor tamaño que las proteínas naturales o aquellos que se corresponden a genes completamente traducidos, y que por ejemplo también se pueden obtener sintéticamente. A causa de sus secuencias de aminoácidos se pueden asignar a las proteínas completas respectivas. Pueden asumir por ejemplo estructuras iguales o ejercer actividades o actividades parciales proteolíticas, tales como por ejemplo la complejación de un sustrato. Los fragmentos y las variantes de delección de proteínas de partida en principio son del mismo tipo; mientras que los fragmentos representan más bien fracciones menores, a los mutantes de delección les faltan más bien solo regiones cortas (en ciertas circunstancias solo uno o varios aminoácidos). Así, es posible por ejemplo deleccionar en los extremos o en los bucles de la enzima otros aminoácidos individuales, en particular 1, hasta 2, hasta 3, hasta 4, hasta 5, en particular hasta 10, preferentemente hasta 20 aminoácidos, sin que por ello se pierda o disminuya la actividad enzimática. Son particularmente preferentes delecciones de en particular 1, hasta 2, hasta 3, hasta 4, hasta 5, en particular hasta 10, preferentemente hasta 20 aminoácidos en el lado N-terminal de la enzima y/o 1, hasta 2, hasta 3, hasta 4, hasta 5, preferentemente hasta 6 aminoácidos en el lado C-terminal de la enzima. A este respecto, preferentemente no se reduce, o solo en un grado reducido, la actividad enzimática de la peroxidasa, en particular solo hasta una reducción del 15 % de la actividad de la peroxidasa de acuerdo con la SEQ ID NO: 1.

Además, mediante tal fragmentación, mutagénesis de delección, fusión, inserción o sustitución se puede disminuir, por ejemplo, también la alergenicidad de las enzimas respectivas y mejorarse, por tanto, globalmente su capacidad de uso. Ventajosamente, las enzimas conservan incluso después de la mutagénesis su actividad enzimática, es decir, su actividad enzimática se corresponde al menos a aquella de la enzima de partida, es decir, en una forma de realización preferente, la actividad enzimática asciende al menos al 80, preferentemente al menos al 90 % de la actividad de la enzima de partida. También las sustituciones pueden mostrar efectos ventajosos. Se pueden sustituir aminoácidos, tanto individuales como varios relacionados, por otros aminoácidos.

Por proteínas quiméricas o híbridas se ha de entender en el sentido de la presente solicitud aquellas proteínas que están compuestas por elementos que proceden de forma natural de distintas cadenas polipeptídicas del mismo organismo o de distintos organismos. Esta forma de proceder se denomina también transposición (*shuffling*) o mutagénesis de fusión. El sentido de una fusión de este tipo puede consistir, por ejemplo, en causar o modificar con ayuda de la parte de proteína fusionada una determinada función enzimática. A este respecto, en el sentido de la presente invención no es importante si una proteína quimérica de este tipo está compuesta por una cadena polipeptídica individual o varias subunidades, en las que se pueden distribuir diferentes funciones. Para la realización de la alternativa mencionada en último lugar es posible por ejemplo descomponer una única cadena polipeptídica quimérica en varias después de la traducción o no hasta después de una etapa de purificación mediante una escisión proteolítica dirigida. En particular, también se puede emplear la mutagénesis de fusión de tal manera que a este respecto, de una forma conocida por el experto en la materia, se genera una proteína de fusión, que presenta una parte, que partiendo de una peroxidasa descrita en el presente documento como molécula de partida se puede obtener mediante fragmentación, mutagénesis de delección, inserción o sustitución y que comprende una secuencia de aminoácidos, que coincide a lo largo de una longitud de al menos 100, 150, 200, 250, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360 o 365 aminoácidos relacionados con la molécula de partida, y que contiene otra parte de otra proteína. Preferentemente se anexa una secuencia de una o varias proteínas diferentes en el extremo C y/o en el extremo N de la parte derivada de la peroxidasa.

Por ejemplo, es adecuada la incorporación de dominios adicionales, preferentemente de otras proteínas, que influyen positivamente en la expresión, el plegamiento, la adherencia a determinados sustratos o la secreción. En particular se puede incluir un punto de unión a hidratos de carbono (*carbohydrate binding domain*, CBD) de la forma conocida por el experto en la materia como dominio adicional en el extremo C y/o N de la parte derivada de la peroxidasa. Están descritos dominios adecuados en el artículo de revisión de Boraston, A. B., *et al.*, *Biochem. J.* (2004), 382, pág. 769-781, a cuyo contenido se hace referencia de este modo en su totalidad. Una modificación de este tipo conduce, a causa de un direccionamiento mejorado en materiales textiles con parte de algodón, a un rendimiento de limpieza mejorado en relación con manchas que contienen proteína.

Otro objeto desvelado en el presente documento es una peroxidasa que se ha descrito anteriormente, que está estabilizada adicionalmente, en particular mediante una o varias mutaciones, por ejemplo sustituciones, o mediante

5 acoplamiento a un polímero. De hecho, un aumento de la estabilidad durante el almacenamiento y/o durante el empleo, por ejemplo en un proceso de lavado, conduce a que la actividad enzimática dure más y, por lo tanto, se mejore el rendimiento de limpieza. Básicamente se consideran todas las posibilidades de estabilización descritas en el estado de la técnica y/o apropiadas. Se prefieren aquellas estabilizaciones que se consiguen a través de mutaciones de la propia enzima, ya que tales estabilizaciones después de la obtención de la enzima no requieren etapas de trabajo adicionales.

Otras posibilidades de la estabilización son por ejemplo:

- 10 - cambio de la unión de iones de metal o cofactores, por ejemplo mediante sustitución de uno o varios aminoácidos que intervienen en el enlace por uno o varios aminoácidos diferentes;
- protección frente a la influencia de agentes desnaturizantes tales como tensioactivos por mutaciones, que causan un cambio de la secuencia de aminoácidos sobre o en la superficie de la proteína;
- 15 - sustitución de aminoácidos, que se encuentran próximos al extremo N por aquellos que se ponen en contacto probablemente a través de interacciones no covalentes con el resto de la molécula y, de este modo, contribuyen a conservar la estructura globular.

20 Son formas de realización preferentes aquellas en las que se estabiliza la enzima de varias maneras, ya que varias mutaciones estabilizantes tienen un efecto aditivo o sinérgico. Las enzimas descritas en el presente documento pueden contener iones manganeso como cofactores y, por tanto, son variantes estabilizadas entre otras aquellas en las que está modificada la unión del manganeso.

25 Otro objeto descrito en el presente documento es una peroxidasa tal como se ha descrito anteriormente, que está caracterizada por que presenta al menos una modificación química. Una peroxidasa con un cambio de este tipo se denomina derivado, es decir, la peroxidasa está derivatizada.

30 Por derivados se entiende en el sentido de la presente solicitud por consiguiente aquellas proteínas cuya cadena de aminoácidos pura se ha modificado químicamente. Tales derivatizaciones se pueden realizar por ejemplo *in vivo* por la célula hospedadora que expresa la proteína. A este respecto cabe destacar en particular acoplamientos de compuestos de bajo peso molecular tales como de lípidos u oligosacáridos. No obstante, las derivatizaciones se pueden llevar a cabo también *in vitro*, por ejemplo mediante la transformación química de una cadena lateral de un aminoácido o por la unión covalente de otro compuesto a la proteína. Por ejemplo, es posible el acoplamiento de aminas a grupos carboxilo de una enzima para el cambio del punto isoelectrico. Un compuesto diferente de este tipo puede ser también otra proteína, que se une por ejemplo a través de compuestos químicos bifuncionales a una proteína descrita en el presente documento. Asimismo, por derivatización se ha de entender la unión covalente a un soporte macromolecular, o incluso una inclusión no covalente en estructuras jaula macromoleculares adecuadas.

40 Las derivatizaciones pueden influir por ejemplo en la especificidad de sustrato o la intensidad de la unión al sustrato o causar un bloqueo temporal de la actividad enzimática, cuando en el caso de la sustancia acoplada se trata de un inhibidor. Esto puede ser razonable por ejemplo para el periodo de tiempo del almacenamiento. Tales modificaciones pueden influir además en la estabilidad o la actividad enzimática. Además, también pueden servir para reducir la alergenicidad y/o inmunogenia de la proteína y aumentar por tanto, por ejemplo, su compatibilidad con la piel. Por ejemplo, los acoplamientos con compuestos macromoleculares, por ejemplo polietilenglicol, pueden mejorar la proteína con respecto a la estabilidad y/o la compatibilidad con la piel.

45 Por derivados de una proteína descrita en el presente documento se puede entender en el sentido más amplio también preparaciones de estas proteínas. En función de la obtención, el tratamiento o la preparación, una proteína puede estar relacionada con diversas sustancias diferentes, por ejemplo del cultivo de los microorganismos productores. Una proteína también se puede haber mezclado de forma dirigida con otras sustancias, por ejemplo para aumentar su estabilidad en almacenamiento. Por tanto, quedan abarcadas también todas las preparaciones de una proteína descrita en el presente documento. Esto también es independiente de si en el caso de una determinada preparación se despliega o no realmente esta actividad enzimática. De hecho, puede ser deseado que durante el almacenamiento no posea ninguna actividad o solo una reducida, y que solo en el momento del uso despliegue su función enzimática. Esto se puede controlar por ejemplo a través de sustancias acompañantes correspondientes.

50 La presente invención comprende las peroxidosas que se han descrito anteriormente y variantes y derivados de las mismas, como tales y como componente de un agente, en particular de un agente de lavado y de limpieza, tal como se ha definido anteriormente.

60 Otro objeto de la invención es un ácido nucleico que codifica una peroxidasa descrita en el presente documento, en particular un ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos indicada en la SEQ ID NO: 2, así como un vector que contiene un ácido nucleico de este tipo, en particular un vector de clonación o un vector de expresión.

65 En este caso se puede tratar de moléculas de ADN o ARN. Pueden estar presentes como cadena sencilla, como una cadena sencilla complementaria a esta cadena sencilla o como doble cadena. En particular en el caso de moléculas de ADN, las secuencias de ambas cadenas complementarias se tienen que tener en cuenta en cada caso en las tres

posibles fases de lectura. Además se tiene que tener en cuenta que distintos codones, es decir, tripletes de bases, pueden codificar los mismos aminoácidos, de tal manera que una determinada secuencia de aminoácidos se puede codificar por varios ácidos nucleicos diferentes. A causa de esta degeneración del código genético, en este objeto de la invención quedan incluidas todas las secuencias de ácido nucleico que pueden codificar una de las peroxidasas que se han descrito anteriormente. El experto está en disposición de determinar de forma inequívoca estas secuencias de ácido nucleico, ya que a pesar de la degeneración del código genético se pueden asignar a codones individuales aminoácidos definidos. Por tanto, el experto en la materia, partiendo de una secuencia de aminoácidos puede establecer sin problemas los ácidos nucleicos que codifican esta secuencia de aminoácidos. Además, en los ácidos nucleicos descritos en el presente documento, uno o varios codones pueden estar sustituidos por codones sinónimos. Este aspecto se refiere en particular a la expresión heteróloga de las enzimas descritas en el presente documento. Así, cada organismo, por ejemplo una célula hospedadora de una cepa de producción, posee un determinado uso de codón. Por uso de codón se entiende la traducción del código genético en aminoácidos por el respectivo organismo. Pueden darse cuellos de botella en la biosíntesis de proteínas, cuando los codones que se encuentran en el ácido nucleico en el organismo se encuentran frente a un número comparativamente reducido de moléculas de ARNt cargadas. A pesar de que codifican el mismo aminoácido, esto conduce a que en el organismo un codón se traduzca con menor eficiencia que un codón sinónimo que codifica el mismo aminoácido. A causa de la presencia de una mayor cantidad de moléculas de ARNt para el codón sinónimo, el mismo se puede traducir con mayor eficiencia en el organismo. Por consiguiente, la presente invención abarca asimismo aquellas secuencias de nucleótidos que están optimizadas para codón para la expresión en un determinado organismo hospedador. A este respecto, la identidad de secuencia en comparación con el original puede ser baja, pero permaneciendo idéntica la proteína codificada.

Actualmente, para un experto en la materia es posible a través de métodos en general conocidos, tales como por ejemplo la síntesis química o la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) junto con métodos convencionales de biología molecular y/o química de proteínas preparar, mediante secuencias conocidas de ADN y/o aminoácidos, los correspondientes ácidos nucleicos hasta genes completos.

Por vectores se entiende en el sentido de la presente invención elementos compuestos por ácidos nucleicos, que contienen como región de ácido nucleico caracterizadora un ácido nucleico descrito en el presente documento. Pueden establecer el mismo en una especie o en una línea celular a lo largo de varias generaciones o divisiones celulares como elemento genético estable. Los vectores son, en particular en el uso en bacterias, plásmidos especiales, es decir, elementos genéticos circulares. En el marco de la presente invención se clona un ácido nucleico descrito en el presente documento en un vector. A los vectores pertenecen por ejemplo aquellos cuyo origen son plásmidos bacterianos, virus o bacteriófagos, o vectores sobre todo sintéticos o plásmidos con elementos del más diverso origen. Con los elementos genéticos en cada caso presentes adicionales, los vectores se pueden establecer en las respectivas células hospedadoras a lo largo de varias generaciones como unidades estables. Pueden estar presentes de forma extracromosómica como unidades propias o integrarse en un cromosoma o en ADN cromosómico.

Los vectores de expresión comprenden secuencias de ácido nucleico, que les capacitan para replicarse en las células hospedadoras que los contienen, preferentemente microorganismos, de forma particularmente bacterias, y expresar allí un ácido nucleico contenido. La expresión se ve influida en particular por el o los promotores que regulan la transcripción. En principio, la expresión se puede realizar por el promotor natural localizado originalmente delante del ácido nucleico que se va a expresar, pero también por un promotor facilitado en el vector de expresión de la célula hospedadora o también por un promotor modificado o uno completamente diferente de otro organismo o de otra célula hospedadora. En el presente caso se pone a disposición al menos un promotor para la expresión de un ácido nucleico descrito en el presente documento y se emplea para su expresión. Los vectores de expresión además se pueden regular, por ejemplo mediante cambio de las condiciones de cultivo o al alcanzar una determinada densidad celular de las células hospedadoras que contienen los mismos o mediante adición de determinadas sustancias, en particular activadores de la expresión génica. Un ejemplo de una sustancia de este tipo es el derivado de galactosa isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido (IPTG), que se usa como activador del operón lactosa (operón lac) bacteriano. A diferencia de los vectores de expresión, el ácido nucleico contenido en vectores de clonación no se expresa.

Otro objeto de la invención es una célula hospedadora no humana, que incluye un ácido nucleico descrito en el presente documento o un vector descrito en el presente documento, en particular una que secreta la peroxidasa al medio que rodea a la célula hospedadora, siendo el ácido nucleico heterólogo con respecto a la célula hospedadora.

Preferentemente se introduce mediante transformación un ácido nucleico descrito en el presente documento o un vector descrito en el presente documento en un microorganismo, que entonces representa una célula hospedadora. El ácido nucleico descrito en el presente documento es heterólogo con respecto al organismo hospedador, es decir, no es una secuencia que se presente de forma natural en el organismo hospedador. Como alternativa se pueden introducir también componentes individuales, es decir, partes o fragmentos de ácido nucleico de un ácido nucleico descrito en el presente documento de tal modo en una célula hospedadora, que la célula hospedadora resultante entonces contiene un ácido nucleico descrito en el presente documento o un vector descrito en el presente documento. Esta forma de proceder es particularmente adecuada cuando la célula hospedadora ya contiene uno o

varios constituyentes de un ácido nucleico descrito en el presente documento o de un vector descrito en el presente documento y los otros constituyentes entonces se complementan entonces correspondientemente. Los procedimientos para la transformación de células están establecidos en el estado de la técnica y se conocen suficientemente por el experto en la materia. Como células hospedadoras en principio son adecuadas todas las células, es decir, células procariotas o eucariotas. Se prefieren las células hospedadoras que genéticamente se pueden manejar de forma ventajosa, en lo que respecta por ejemplo a la transformación con el ácido nucleico o el vector y su establecimiento estable, por ejemplo hongos unicelulares o bacterias. Además, las células hospedadoras preferentes se caracterizan por una buena capacidad de manejo microbiológico y biotecnológico. Esto se refiere por ejemplo a la fácil capacidad de cultivo, elevadas tasas de crecimiento, reducidas exigencias a medios de fermentación y buenos índices de producción y secreción para proteínas extrañas. Las células hospedadoras descritas en el presente documento preferentes secretan la proteína expresada (transgénica) al medio que rodea las células hospedadoras. Además, las peroxidasas se pueden modificar por las células que las producen después de su producción, por ejemplo mediante el enlazado de moléculas de azúcar, formilaciones, aminaciones, etc. Tales modificaciones postraduccionales pueden influir funcionalmente en la peroxidasa.

Representan otras formas de realización preferentes aquellas células hospedadoras que, a causa de elementos de regulación genéticos, que se ponen a disposición por ejemplo en el vector, pero que también pueden estar presentes de antemano en estas células, se pueden regular en su actividad. Por ejemplo, mediante la adición controlada de compuestos químicos, que sirven de activadores, mediante cambio de las condiciones de cultivo o al alcanzar una determinada densidad celular, las mismas se pueden estimular para la expresión. Esto posibilita una producción rentable de las proteínas descritas en el presente documento. Un ejemplo de un compuesto de este tipo es IPTG, tal como se ha descrito anteriormente.

Las células hospedadoras pueden ser células procariotas o bacterianas. Las bacterias se caracterizan por tiempos de generación cortos y reducidas exigencias a las condiciones de cultivo. Por ello se pueden establecer procedimientos de cultivo o procedimientos de producción económicos. Además, el experto en la materia en el caso de bacterias en la técnica de fermentación dispone de una amplia experiencia. Para una producción especial por los más diversos motivos, que en el caso particular se van a establecer experimentalmente, como fuentes de nutrientes, velocidad de formación de producto, necesidad de tiempo etc. pueden ser adecuadas bacterias Gram negativas o Gram positivas.

En el caso de bacterias Gram negativas, tales como por ejemplo *Escherichia coli*, se secreta una pluralidad de proteínas al espacio periplasmático, es decir al compartimento entre las dos membranas que encierran las células. Esto puede ser ventajoso para aplicaciones especiales. Además, también se pueden configurar bacterias Gram negativas de tal modo que secreten las proteínas expresadas no solo al espacio periplasmático, sino también al medio que rodea a la bacteria. Las bacterias Gram positivas, tales como por ejemplo *Bacilli* o actinomicetos u otros representantes de los *Actinomycetales*, no poseen frente a esto ninguna membrana externa, de tal manera que las proteínas secretadas se ceden de inmediato al medio que rodea a las bacterias, por norma general el medio de cultivo, del cual se pueden purificar las proteínas expresadas. Se pueden aislar directamente del medio o seguir procesándose. Además, las bacterias Gram positivas están relacionadas con la mayoría de los organismos de origen para enzimas técnicamente importantes o son idénticas a los mismos y forman la mayoría de las veces ellas mismas enzimas comparables, de tal manera que disponen de un uso de codón similar y su aparato de síntesis de proteínas de forma natural está dirigido de forma correspondiente.

Las células hospedadoras descritas en el presente documento pueden estar modificadas con respecto a sus exigencias a las condiciones de cultivo, presentar otros marcadores de selección o marcadores de selección adicionales o expresar también otras proteínas o proteínas adicionales. En particular, también se puede tratar de aquellas células hospedadoras que expresan transgénicamente varias proteínas o enzimas.

La presente invención se puede aplicar en principio a todos los microorganismos, en particular a todos los microorganismos fermentables, y conduce a que mediante el empleo de tales microorganismos se pueden preparar las proteínas descritas en el presente documento. Tales microorganismos representan entonces células hospedadoras en el sentido de la invención.

En otra forma de realización de la invención, la célula hospedadora está caracterizada por que es una bacteria, preferentemente una que está seleccionada del grupo de los géneros de *Escherichia*, *Klebsiella*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Arthrobacter*, *Streptomyces*, *Stenotrophomonas* y *Pseudomonas*, más preferentemente uno que está seleccionado del grupo de *Escherichia coli*, *Klebsiella planticola*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus lentus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus alcalophilus*, *Bacillus globigii*, *Bacillus gibsonii*, *Bacillus clausii*, *Bacillus halodurans*, *Bacillus pumilus*, *Staphylococcus carnosus*, *Corynebacterium glutamicum*, *Arthrobacter oxidans*, *Streptomyces lividans*, *Streptomyces coelicolor* y *Stenotrophomonas maltophilia*.

Pero la célula hospedadora también puede ser una célula eucariota que está caracterizada por que posee un núcleo celular. Por tanto, otro objeto de la invención lo representa una célula hospedadora, que está caracterizada por que posee un núcleo celular. A diferencia de las células procariotas, las células eucariotas están en disposición de modificar después de la traducción la proteína formada. Son ejemplos de esto hongos tales como basidiomicetos,

actinomicetos o levaduras tales como *Saccharomyces*, *Pichia*, *Hansenula* o *Kluyveromyces*. Esto puede ser particularmente ventajoso por ejemplo cuando las proteínas han de experimentar en relación con su síntesis modificaciones específicas, que posibilitan tales sistemas. A las modificaciones que llevan a cabo los sistemas eucariotas en particular en relación con la síntesis de proteínas pertenecen, por ejemplo, la unión de compuestos de bajo peso molecular, tales como anclajes de membrana y oligosacáridos. Tales modificaciones de oligosacáridos pueden ser deseables por ejemplo para reducir la alergenicidad de una proteína expresada. También puede ser ventajosa una coexpresión con las enzimas formadas de manera natural por tales células, tales como por ejemplo celulasas o lipasas. Además, por ejemplo los sistemas de expresión fúngicos termófilos pueden ser adecuados en particular para la expresión de proteínas o variantes resistentes a temperatura. Se prefieren sistemas de expresión fúngicos en el marco de la invención.

Las células hospedadoras se cultivan y fermentan de forma habitual, por ejemplo en sistemas discontinuos o continuos. En el primer caso se inocula un medio de cultivo adecuado con las células hospedadoras y el producto se recoge del medio después de un periodo de tiempo que se tiene que establecer experimentalmente. Las fermentaciones continuas se caracterizan por la consecución de un equilibrio de flujo, en el que a lo largo de un periodo de tiempo comparativamente largo las células en parte mueren, pero también se regeneran y al mismo tiempo del medio se puede retirar la proteína formada.

Las células hospedadoras descritas en el presente documento se usan preferentemente para producir las peroxidasas descritas en el presente documento. Por tanto, otro objeto de la invención es un procedimiento para la producción de una peroxidasa que comprende

- a) cultivo de una célula hospedadora descrita en el presente documento
- b) aislamiento de la peroxidasa del medio de cultivo o de la célula hospedadora.

Este objeto de la invención comprende preferentemente procedimientos de fermentación. Los procedimientos de fermentación en sí se conocen por el estado de la técnica y representan la etapa de producción a gran escala en sí, por norma general seguido por un método de purificación adecuado del producto producido, por ejemplo de la peroxidasa descrita en el presente documento. Todos los procedimientos de fermentación que se basan en un procedimiento correspondiente para la producción de una peroxidasa descrita en el presente documento representan formas de realización de este objeto de la invención.

Se consideran en especial procedimientos de fermentación que están caracterizados por que la fermentación se lleva a cabo a través de una estrategia de alimentación. En este caso se suministran los constituyentes de medio que son consumidos por el cultivo continuo. Por ello se pueden conseguir considerables aumentos tanto en la densidad celular como en la masa celular o la masa seca y/o en particular en la actividad de la peroxidasa de interés. Además, también se puede diseñar la fermentación de tal manera que se retiren mediante filtración los productos metabólicos indeseados o se neutralicen mediante adición de tampón o en cada caso contraiones adecuados.

La peroxidasa producida se puede recoger del medio de fermentación. Un procedimiento de fermentación de este tipo se prefiere con respecto a un aislamiento de la peroxidasa de la célula hospedadora, es decir, un tratamiento de producto de la masa celular (masa seca), sin embargo, requiere la facilitación de células hospedadoras adecuadas o de uno o varios marcadores o mecanismos de secreción y/o sistemas de transporte adecuados, para que las células hospedadoras secreten la peroxidasa al medio de fermentación. Sin secreción se puede realizar como alternativa el aislamiento de la peroxidasa de la célula hospedadora, es decir, una purificación de la misma de la masa celular, por ejemplo mediante precipitación con sulfato de amonio o etanol, o mediante purificación cromatográfica.

Todos los hechos que se han indicado anteriormente se pueden combinar hasta dar procedimientos para producir las peroxidasas descritas en el presente documento.

En los agentes descritos en el presente documento, en particular agentes de lavado y de limpieza, las enzimas que se van a emplear pueden estar confeccionadas junto con sustancias acompañantes, por ejemplo de la fermentación, o con estabilizantes. En formulaciones líquidas, las enzimas se emplean preferentemente como formulación o formulaciones líquidas de enzimas.

Las peroxidasas se pueden proteger particularmente durante el almacenamiento frente a daños, tales como por ejemplo inactivación, desnaturalización o descomposición por ejemplo debido a influencias físicas, oxidación o escisión proteolítica. Con la obtención microbiana se prefiere en particular una inhibición de la proteólisis. Los agentes descritos pueden contener para este fin estabilizantes.

Por norma general, las peroxidasas con actividad de limpieza no se facilitan en forma de la proteína pura, sino más bien en forma de preparaciones estabilizadas aptas para el almacenamiento y transporte. A estas preparaciones preconfeccionadas pertenecen por ejemplo las preparaciones sólidas obtenidas mediante granulación, extrusión o liofilización o en particular en caso de agentes líquidos o en forma de gel, soluciones de las enzimas,

ventajosamente lo más concentradas posibles, pobres en agua y/o mezcladas con estabilizantes u otros coadyuvantes.

5 Como alternativa, las enzimas pueden encapsularse tanto para la forma de presentación sólida como para la líquida, por ejemplo mediante secado por pulverización o extrusión de la solución enzimática junto con un polímero preferentemente natural o en forma de cápsulas, por ejemplo, aquellas en las que las enzimas están encerradas al igual que en un gel solidificado, o en las del tipo núcleo-envuelta, en el que un núcleo que contiene enzima está revestido con una capa de protección impermeable a agua, aire y/o agentes químicos. En capas superpuestas pueden aplicarse adicionalmente otras sustancias activas, por ejemplo estabilizantes, emulsionantes, pigmentos, 10 sustancias blanqueadoras o colorantes. Las cápsulas de este tipo se aplican según métodos en sí conocidos, por ejemplo mediante granulación por agitación o rodillos o en procesos de lecho fluidizado. De manera ventajosa, los granulados de este tipo, por ejemplo mediante la aplicación de formadores de película poliméricos, son pobres en polvo y, debido al revestimiento, estables en el almacenamiento.

15 Además, es posible confeccionar dos o varias enzimas juntas, de modo que un único granulado presenta varias actividades enzimáticas.

Como puede verse a partir de las realizaciones anteriores, la proteína enzimática forma solo una fracción del peso total de preparaciones enzimáticas habituales. Las preparaciones de peroxidasa empleadas preferentemente 20 contienen entre el 0,1 y el 40 % en peso, preferentemente entre el 0,2 y el 30 % en peso, de manera particularmente preferente entre el 0,4 y el 20 % en peso y en particular entre el 0,8 y el 10 % en peso de la proteína enzimática.

Los agentes descritos en el presente documento comprenden todos los tipos concebibles de agentes de lavado o de limpieza, tanto concentrados como agentes que se deben aplicar sin diluir, que se emplean a escala comercial, en la 25 lavadora o en el lavado o la limpieza a mano. A esto pertenecen por ejemplo agentes de lavado para materiales textiles, alfombras o fibras naturales, para los que se usa la denominación agentes de lavado. A esto pertenecen por ejemplo también agentes para el lavado de la vajilla para lavavajillas o agentes para lavado manual de la vajilla o detergentes para superficies duras, tales como metal, vidrio, porcelana, cerámica, baldosas, gres, superficies barnizadas, plásticos, madera o cuero, para los que se usa la denominación agentes de limpieza, es decir aparte de 30 agentes para el lavado manual y a máquina de la vajilla, por ejemplo también agentes para fregar, limpiacristales, pastillas para WC, etc. A los agentes de lavado y de limpieza en el marco de la invención pertenecen además coadyuvantes de lavado, que se añaden mediante dosificación durante el lavado manual o a máquina de material textil al agente de lavado en sí para conseguir un efecto adicional. Además pertenecen a los agentes de lavado y de limpieza en el marco de la invención también agentes para el pretratamiento y tratamiento posterior de los materiales 35 textiles, es decir, aquellos agentes con los que la prenda de ropa se pone en contacto antes del lavado en sí, por ejemplo para la disolución inicial de suciedades resistentes, y también aquellos agentes que en una etapa posterior al lavado en sí del material textil otorgan al material de lavado otras propiedades deseables, tales como tacto suave, ausencia de arrugas o una reducida carga estática. Entre los agentes mencionados en último lugar se incluyen entre otros los suavizantes.

40 Un agente descrito en el presente documento contiene la peroxidasa ventajosamente en una cantidad de 2 µg a 20 mg, preferentemente de 5 µg a 17,5 mg, de forma particularmente preferente de 20 µg a 15 mg y de forma muy particularmente preferente de 50 µg a 10 mg por g del agente. Además, la peroxidasa contenida en el agente, y/u otros ingredientes del agente, pueden estar envueltos con una sustancia impermeable para la enzima a temperatura ambiente o en ausencia de agua, que se hace permeable para la enzima en las condiciones de aplicación del 45 agente. Una forma de realización de este tipo de la invención está caracterizada por tanto por que la peroxidasa está envuelta por una sustancia impermeable para la peroxidasa a temperatura ambiente o en ausencia de agua. Además, también puede estar envasado el propio agente de lavado o de limpieza en un recipiente, preferentemente un recipiente permeable a aire, del que se libera justo antes del uso o durante el proceso de lavado.

50 Estas formas de realización de la presente invención comprenden todas las formas de presentación sólidas, en forma de polvo, líquidas, en forma de gel o pastosas de los agentes descritos en el presente documento, que se pueden componer dado el caso también de varias fases y pueden estar presentes en forma tanto comprimida como no comprimida. El agente puede estar presente como polvo fluido, en particular con una densidad aparente de 55 300 g/l a 1200 g/l, en particular de 500 g/l a 900 g/l o 600 g/l a 850 g/l. A las formas de presentación sólidas del agente pertenecen además extruídos, granulados, pastillas o bolsas. Como alternativa, el agente también puede ser líquido, estar en forma de gel o ser pastoso, por ejemplo en forma de un agente para el lavado o lavavajillas líquido no acuoso o una pasta no acuosa o en forma de un agente de lavado o lavavajillas acuoso o una pasta que contiene agua. También se puede ofertar un agente líquido, en forma de gel o pastoso en una envoltura soluble a agua, que 60 se disuelve con la aplicación del producto en agua, por ejemplo soldado en una lámina de poli(alcohol vinílico). Además, el agente puede estar presente como sistema de un componente. Tales agentes se componen de una fase.

Como alternativa, un agente se puede componer también de varias fases. Un agente de este tipo está dividido por consiguiente en varios componentes.

65

- Los agentes de lavado o de limpieza descritos en el presente documento pueden contener, adicionalmente a la peroxidasa descrita en el presente documento, también enzimas hidrolíticas u otras enzimas en una concentración apropiada para la eficacia del agente. Las enzimas pueden estar presentes en forma de las formulaciones de enzima que se han descrito anteriormente. Por tanto, otra forma de realización de la invención la representan agentes que comprenden además una o varias enzimas adicionales. Como otras enzimas se pueden emplear preferentemente todas las enzimas que pueden desplegar en el agente descrito en el presente documento una actividad catalítica, en particular una proteasa, amilasa, celulasa, hemicelulasa, mananasa, tanasa, xilanas, xantanasa, xantanliasa, xiloglucanasa,  $\beta$ -glucosidasa, pectinasa, pectatliasa, carragenasa, perhidrolasa, oxidasa, oxidorreductasa, cutinasa o una lipasa, así como sus mezclas. Otras enzimas están contenidas en el agente ventajosamente en cada caso una cantidad del  $1 \times 10^{-8}$  al 5 por ciento en peso con respecto a la proteína activa. Más preferentemente, cada enzima adicional está contenida en una cantidad del  $1 \times 10^{-7}$ -3 % en peso, del 0,00001-1 % en peso, del 0,00005-0,5 % en peso, del 0,0001 a 0,1 % en peso y de forma particularmente preferente del 0,0001 al 0,05 % en peso en los agentes descritos en el presente documento, con respecto a la proteína activa.
- Los agentes de lavado o de limpieza descritos en el presente documento, que pueden estar presentes como sólidos en forma de polvo, en forma de partículas compactadas posteriormente, como soluciones o suspensiones homogéneas, pueden contener, aparte de una peroxidasa descrita en el presente documento, todos los ingredientes conocidos y habituales en tales agentes, estando presente preferentemente al menos otro ingrediente en el agente.
- Los agentes descritos en el presente documento pueden contener en particular tensioactivos, adyuvantes (soportes), otros agentes de blanqueo o activadores de blanqueo. Además pueden contener disolventes orgánicos miscibles con agua, secuestrantes, electrolitos, reguladores de pH y/u otros coadyuvantes tales como blanqueadores ópticos, inhibidores del agrisado, reguladores de espuma así como colorantes y fragancias así como combinaciones de los mismos. En distintas formas de realización de la invención, los agentes descritos en el presente documento contienen una fuente de peróxido de hidrógeno, por ejemplo un percarbonato, peróxido o perborato. El peróxido de hidrógeno procedente de esta fuente puede aumentar adicionalmente la actividad catalítica de las peroxidases descritas en el presente documento. No obstante, se prefiere que las enzimas descritas en el presente documento puedan causar incluso en ausencia de peróxido de hidrógeno una escisión oxidativa de los carotenoides.
- Están desvelados ingredientes ventajosos de los agentes descritos en el presente documento en la solicitud de patente internacional WO2009/121725, comenzando allí en la página 5, penúltimo párrafo, y terminando en la página 13 después del segundo párrafo. Se hace referencia expresa a esta divulgación y se incorpora ese contenido de divulgación en la presente solicitud de patente.
- Otro objeto de la invención es un procedimiento para la limpieza de materiales textiles o superficies duras, que está caracterizado por que en al menos una etapa del procedimiento se aplica un agente descrito en el presente documento, o por que en al menos una etapa de procedimiento se hace catalíticamente activa una peroxidasa descrita en el presente documento, en particular de tal modo que se emplea la peroxidasa en una cantidad de 40  $\mu$ g a 4 g, preferentemente de 50  $\mu$ g a 3 g, de forma particularmente preferente de 100  $\mu$ g a 2 g y de forma muy particularmente preferente de 200  $\mu$ g a 1 g.
- Aquí se incluyen procedimientos tanto manuales como a máquina, prefiriéndose los procedimientos a máquina. Los procedimientos para la limpieza de materiales textiles en general se caracterizan por que en varias etapas del procedimiento se aplican distintas sustancias con actividad de limpieza sobre el material de limpieza y se eliminan mediante lavado después del tiempo de actuación, o por que el material de limpieza se trata de otro modo con un agente de lavado o una solución o dilución de este agente. Lo correspondiente se aplica a procedimientos para la limpieza de todos los demás materiales distintos de los materiales textiles, en particular de superficies duras. Se pueden complementar todos los procedimientos concebibles de lavado o de limpieza en al menos una de las etapas del procedimiento con la aplicación de un agente de lavado o de limpieza descrito en el presente documento o una peroxidasa descrita en el presente documento y representan entonces formas de realización de la presente invención. Todos los hechos, objetos y formas de realización que están descritos para peroxidases descritas en el presente documento y agentes que contienen las mismas también se pueden aplicar a este objeto de la invención. Por tanto, en este punto se hace referencia expresa a la divulgación en el punto correspondiente con el aviso de que esta divulgación se aplica también a los procedimientos que se han descrito anteriormente.
- También representan formas de realización de este objeto de la invención procedimientos para el tratamiento de materiales en bruto de materiales textiles o para el cuidado de materiales textiles en los que en al menos una etapa del procedimiento se hace activa una peroxidasa descrita en el presente documento. Entre esto se prefieren procedimientos para materiales en bruto de materiales textiles, fibras o materiales textiles con componentes naturales y, de forma particularmente preferente, para aquellos con lana o seda.
- Otro objeto de la invención es el uso de un agente descrito en el presente documento para la limpieza de materiales textiles o de superficies duras, o de una peroxidasa descrita en el presente documento para la limpieza de materiales textiles o de superficies duras, en particular de tal modo que se emplea la peroxidasa en una cantidad de 40  $\mu$ g a 4 g, preferentemente de 50  $\mu$ g a 3 g, de forma particularmente preferente de 100  $\mu$ g a 2 g y de forma muy particularmente preferente de 200  $\mu$ g a 1 g.

Una formulación marco típica para un agente para el lavado a máquina de la vajilla que se puede emplear preferentemente, por ejemplo en forma de pastilla, comprende las siguientes sustancias:

tripolifosfato de Na	20-50 % en peso
carbonato de sodio	10-30 % en peso
percarbonato de sodio	5-18 % en peso
activador de blanqueo	0,5-5 % en peso
catalizador de blanqueo	0,01-1 % en peso
sulfopolímero	2,5-15 % en peso
policarboxilato	0,1-10 % en peso
tensioactivo no iónico	0,5-10 % en peso
fosfonato	0,5-5 % en peso
proteasas	0,1-5 % en peso
amilasa	0,1-5 % en peso,

- 5 refiriéndose la indicación en % en peso en cada caso a la totalidad del agente. En lugar del o de una parte del tripolifosfato, en la formulación se puede emplear en particular también el 10-50 % en peso de citrato o MGDA o GLDA o EDDS o mezclas de dos o tres de estas sustancias.

10 Todos los hechos, objetos y formas de realización que están descritos para peroxidasa descritas en el presente documento y agentes que contienen las mismas también se pueden aplicar a este objeto de la invención. Por tanto, en este punto se hace referencia expresa a la divulgación en el punto correspondiente con el aviso de que esta divulgación se aplica también al uso que se ha descrito anteriormente.

### 15 Ejemplos

Todas las etapas de trabajo de biología molecular siguen métodos convencionales. Las enzimas y los elementos combinables (kits) se emplearon según las indicaciones de los respectivos fabricantes.

20 Ejemplo 1: producción, purificación y medición de actividad de una peroxidasa de *B. adusta*. Antes del uso se esterilizaron (trataron en autoclave) todos los medios y objetos de laboratorio. Los cultivos madre de *Bjerkandera adusta* se cultivaron en 2 l de medio SNL (30,0 g l<sup>-1</sup> de glucosa monohidrato; 4,5 g l<sup>-1</sup> de *L*-asparagina monohidrato; 1,5 g l<sup>-1</sup> de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,5 g l<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub>; 3,0 g l<sup>-1</sup> de extracto de levadura; 1,0 ml l<sup>-1</sup> de solución de oligoelementos que contiene 0,005 g l<sup>-1</sup> de CuSO<sub>4</sub> x 5 H<sub>2</sub>O, 0,08 g l<sup>-1</sup> de FeCl<sub>3</sub> x 6 H<sub>2</sub>O, 0,09 g l<sup>-1</sup> de ZnSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O, 0,03 g l<sup>-1</sup> de MnSO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O y 0,4 g l<sup>-1</sup> de EDTA) con el 0,01 % de antiespumante a 24 °C, 1 l/min de oxígeno y 200 rpm.

25 200 ml de un cultivo previo de 7 días de edad se homogeneizaron mediante un Ultra-Turrax y sirvieron para inocular un cultivo principal. Diariamente se tomaron muestras del sobrenadante y se examinaron mediante el ensayo descrito más adelante con respecto a su actividad de degradación de carotenoide. El sobrenadante se recogió en un momento en el que se pudo detectar suficiente actividad y se purificó mediante cromatografía de intercambio aniónico. Las fracciones activas se combinaron, se decoloraron parcialmente con carbón activado y se concentraron mediante ultrafiltración.

### 30 Ensayo de actividad fotométrico

35 Para la determinación fotométrica de la actividad de degradación de caroteno se usó un sobrenadante concentrado 10 veces. Dependiendo de la actividad y el carotenoide usado como sustrato se mezclaron 10-100 µl de la muestra y agua/tampón para dar 1,6 ml. La mezcla se calentó a 30 °C y la reacción se inició mediante la adición del sustrato. La reducción de la extinción en el máximo de absorción se midió a lo largo de 10 minutos y se calculó la actividad enzimática según la siguiente fórmula:

$$40 \quad A [\text{mU/ml}] = \Delta E \times 1,7 \times 1000000 \times F / (\epsilon \times 1,6)$$

$\Delta E$  = reducción de la extinción en el máximo de absorción por minuto

$\epsilon$  = coeficiente de extinción en l x mol<sup>-1</sup> x cm<sup>-1</sup>

45 F = factor de dilución de la muestra

Se ensayaron los siguientes carotenoides como sustrato:

Tabla 1:

carotenoide	máximo de absorción (nm)	coeficiente de extinción ( $l \times mol^{-1} \times cm^{-1}$ )
caroteno	460	87300
licopeno	483	114600
luteína	457	66900
capsantina	478	81900

## Purificación de la peroxidasa

- 5 Para la purificación de la peroxidasa se usó una columna de Q-Sepharose (GE Healthcare, 1 ml) y tampón acetato de sodio 20 mM pH 5 (sin y con cloruro sódico 1 M). Se mezclaron 10 ml de sobrenadante 1:1 con tampón de elución. La separación se llevó a cabo con un caudal de 2 ml/min con un gradiente lineal (tampón de elución + NaCl 1 M) para 15 ml. Se recogieron fracciones de 1 ml y se ensayaron mediante el ensayo que se ha descrito anteriormente en cuanto a su actividad enzimática.

10

## Ejemplo 2: Blanqueo de un baño de lavado a máquina de la vajilla

- 15 Como ejemplo de un baño de lavado de agente de lavado a máquina de la vajilla (MGSM) cargado con carotenoide se llevan 10 g de pulpa de tomate disponible en el mercado (concentrado 2 veces) con un lavavajillas disponible en el mercado que contiene enzima de acuerdo con la Tabla 2 y agua desionizada a 200 ml. Se ajusta el pH después de la disolución antes del relleno definitivo a 200 ml con solución de hidróxido de sodio a 9,18.

Tabla 2: composición del agente para lavado a máquina de la vajilla

	base
fosfato (% en peso)	35,9
carbonato de sodio (% en peso)	12,2
fosfonato (% en peso)	2,4
polímero que contiene grupos ácido sulfónico (% en peso)	7,9
poliacrilato (% en peso)	4,6
tensioactivos no iónicos (% en peso)	6,1
percarbonato (% en peso)	14,6
TAED (% en peso)	2,3
catalizador de blanqueo (% en peso)	1,0
policarboxilato (% en peso)	1,5
silicato de sodio/policarboxilato (% en peso)	3,9
composición de enzima (amilasa) (% en peso)	1,0
acetato de zinc (% en peso)	0,2
restos (perfume, colorantes, proteasa o mezcla de proteasas etc.) (% en peso)	hasta 100

- 20 Se ensayan dos preparaciones:

valor de enzima: 9 ml del baño de lavado que se ha mencionado anteriormente con 1 ml de preparación de enzima del Ejemplo 1

- 25 Valor vacío: 9 ml del baño de lavado que se ha mencionado anteriormente con 1 ml de agua desionizada.

- 30 Ambas preparaciones se giran cabeza abajo y de vuelta en tubos de polipropileno de 14 ml cerrados en una mezcladora rotatoria que se encuentra bajo una campana calefactora atemperada a 50 °C en un ciclo aproximado de cada segundo. Después de 0 h, 4 h, 21 h y 25 h se extrae en cada caso una muestra de 1 ml, se depura en una centrifuga de mesa de sustancias de enturbiamiento y se usa el sobrenadante para la medición de la extinción con respecto a aire a 500 nm.

La diferencia del valor de enzima (la "diferencia de muestra") con respecto al valor vacío se determina para cada punto de tiempo (los valores negativos reflejan una menor extinción del valor de enzima y, por lo tanto, una muestra más clara). El "blanqueo enzimático" dependiente del tiempo se calcula por formación de la diferencia de diferencia de muestra del punto de tiempo x con respecto a la diferencia de muestra del valor inicial (0 h) (los blanqueos enzimáticos negativos reflejan una disminución de la extinción y, por tanto, un mayor blanqueo por la muestra de enzima).

Tabla 3:

tiempo (h):	0	4	21	25
blanqueo enzimático	0	-0,114	-0,315	-0,387

Los resultados demuestran un blanqueo que aumenta con el tiempo del baño de lavado por la enzima.

Ejemplo 3: miniensayo de lavado (agente de lavado líquido, tomate y zanahoria)

Un preparado enzimático del sobrenadante de cultivo de *B. adusta* con una CDA (*carotenoid degrading activity* = actividad de degradación de carotenoide) de 25 U/l se preparó y se empleó en el siguiente ensayo de lavado: en una placa de microtitulación de 48 pocillos se dispusieron en solitario suciedades troqueladas redondas (diámetro 1 cm) (WfK 10O (algodón con suciedad de zumo de zanahoria) y WfK 10SG (algodón con suciedad de salsa de carne de vaca y tomate).

Sobre cada disco se pipetearon 1000 µl de baño de lavado pretemperado a 40 °C de un agente de lavado líquido con la composición indicada a continuación (concentración final en el ensayo 4,7 g/l, 16 °dH) y se añadieron 20 µl de la solución de enzima que se iba a ensayar. Los ensayos se realizaron por triplicado.

Como formación de base de agente de lavado sirvió un agente de lavado líquido con la siguiente composición (todas las indicaciones en porcentaje en peso): el 0,3-0,5 % de xantana, el 0,2-0,4 % de agente antiespumante, el 6-7 % de glicerina, el 0,3-0,5 % de etanol, el 4-7 % de FAEOS (etersulfato de alcohol graso), el 24-28 % de tensioactivos no iónicos, el 1 % de ácido bórico, el 1-2 % de citrato de sodio (dihidrato), el 2-4 % de soda, el 14-16% de ácidos grasos de coco, el 0,5 % de HEDP (ácido 1-hidroxietan-1,1-difosfónico), el 0-0,4 % de PVP (polivinilpirrolidona), el 0-0,05 % de blanqueador óptico, el 0-0,001 % de colorante, resto agua desmineralizada.

Las placas se cerraron de forma impermeable a aire con la correspondiente tapa y se lavaron durante 1, 4 o 16 horas en oscuridad en un agitador de incubación Titramax a 40 °C.

A continuación se vertió el baño de lavado a través de un tamiz, se enjuagó tres veces con agua corriente y tres veces con agua desionizada, se aspiró cuidadosamente el agua residual mediante suaves toques con papel de laboratorio y se secó a temperatura ambiente en oscuridad durante 24 o 48 horas. Después de la adhesión sobre papel blanco se midieron con un colorímetro Minolta la luminosidad y el color en comparación con un patrón blanco y negro del aparato.

Para la valoración del blanqueo se calculó la diferencia del valor de luminosidad L\* en el sistema L\*a\*b\* de la muestra tratada con enzima con respecto a la muestra tratada del mismo modo, sin enzima (x=0) (valores medios de los triplicados) para cada suciedad ("ΔL\*\*"). En la siguiente tabla está representado el blanqueo después de un tratamiento de cuatro horas (los valores mayores indican un mayor blanqueo de la muestra):

Tabla 4:

tejidos	ΔL*
WfK 10O	0,2
WfK 10SG	4,8
Total	5,0

El tratamiento enzimático causa un claro blanqueo con respecto al control sin enzima, que también es visible a simple vista.

De forma complementaria en cuanto a la valoración del cambio de la intensidad del color (decoloración) para un ensayo de lavado llevado a cabo de forma análoga adicional se calculó la adición vectorial de los tres componentes de color  $\sqrt{\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2}$  calculado a partir de las diferencias de los valores de color ΔL\* y de forma análoga Δa\* y Δb\*, entre la preparación de ensayo con y el control sin la enzima. Por esto se refleja el desplazamiento de

color muy visible a simple vista de naranja-amarillo hasta la neutralidad de color mejor que solo por el blanqueo  $\Delta L^*$  únicamente.

5 La siguiente tabla representa las aportaciones individuales por las dos suciedades examinadas a la suma de la decoloración calculada de este modo en este experimento (valores mayores significan una mejor decoloración):

decoloración	1 hora	4 horas
WfK 10O	0,8	1,9
WfK 10SG	4,2	11,3
Total	5,0	13,2

10 Los resultados demuestran una decoloración ventajosa de las manchas por la enzima. El efecto aumenta con el tiempo de lavado.

LISTADO DE SECUENCIAS

15 <110> Henkel AG & Co. KGaA

<120> Peroxidasa con actividad para carotenoides

<130> PT031371

20 <150> 102013209545.7

<151> 23-05-2013

<160> 2

25 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 366

<212> PRT

30 <213> *Bjerkandera adusta*

<400> 1

ES 2 684 577 T3

Met Ala Phe Lys Gln Leu Ala Ala Ala Leu Ser Ile Ala Leu Ala Leu  
 1 5 10 15  
 Pro Phe Ser Gln Ala Ala Ile Thr Arg Arg Val Ala Cys Pro Asp Gly  
 20 25 30  
 Val Asn Thr Ala Thr Asn Ala Ala Cys Cys Ala Leu Phe Ala Val Arg  
 35 40 45  
 Asp Asp Ile Gln Gln Asn Leu Phe Asp Gly Gly Glu Cys Gly Glu Glu  
 50 55 60  
 Val His Glu Ser Leu Arg Leu Thr Phe His Asp Ala Ile Gly Ile Ser  
 65 70 75 80  
 Pro Ser Leu Ala Ala Thr Gly Lys Phe Gly Gly Gly Gly Ala Asp Gly  
 85 90 95  
 Ser Ile Met Ile Phe Asp Asp Ile Glu Pro Asn Phe His Ala Asn Asn  
 100 105 110  
 Gly Val Asp Glu Ile Ile Asn Ala Gln Lys Pro Phe Val Ala Lys His  
 115 120 125  
 Asn Met Thr Ala Gly Asp Phe Ile Gln Phe Ala Gly Ala Val Gly Val  
 130 135 140  
 Ser Asn Cys Pro Gly Ala Pro Gln Leu Ser Phe Phe Leu Gly Arg Pro  
 145 150 155 160  
 Ala Ala Thr Gln Pro Ala Pro Asp Gly Leu Val Pro Glu Pro Phe Asp



ES 2 684 577 T3

atggccttca agcaactcgc tgctgctctt tccatcgccc ttgctctccc cttctcgcga	60
gctgcgatca ccagacgtgt ggcttgccca gatggcgtga acaccgcaac caacgcagcc	120
tgttgtgctt tgttcgccgt ccgtgatgac atccaacaga acttgttcga cggcggcgag	180
tgccggcgaag aagtgcacga gtcacttoga ctgaccttcc acgatgctat tggcatatct	240
ccaagccttg ccgccactgg caaatcggc ggcggagggtg ccgacgggtc tatcatgatc	300
ttcgacgaca tcgagcccaa cttccacgcc aacaacggcg tcgacgagat tatcaacgcg	360
cagaagccct tcgtggccaa gcacaacatg acggcaggcg actttattca attcgcaggc	420
gccgttggtg tgagcaactg ccctggtgct cctcaactga gcttcttct cgggogccct	480
gcagcgagcg agcccgcgcc tgaogggctt gttccggagc ccttcgactc ggtcacogac	540
atcctcaatc gctttgccga tgctggcggc ttcacaacc c aagaagttgt ttggctcctt	600
gcctctcatt ccattgetgc cgetgaccac gtccgaccga cgatccctgg atcacccttc	660
gattctactc ccgaaatctt cgacacacag ttctttggtg agacgttgtt gaagggcacg	720
ttgttcccag gtacgagcgg caaccagggc gaagtcgagt cccacttgc cggcgaaatt	780
cgtctccagt cagatgccga cttcgcacgt gactcgagga ctgcttgcca gtggcagtct	840
ttcgtcaata accagccccg gatgcaagtt ctgttcaagg cggctatgca gaagctgtct	900
atcttgggcc acgatctcac tcagatgatt gactgctccg acgtaatccc tgtacctccg	960
agcacagcgg tccgtggatc gcactctgect gcgggcaaca cactggacga cattgaacag	1020
gcttgcgect ccacgccatt cccctcgtc accgccgacc ctggtcgggc cacctctgtt	1080
gcccctgtcc cgccttcgta a	1101

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Peroxidasa que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad con la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO: 1 a lo largo de toda su longitud.
2. Ácido nucleico que codifica una peroxidasa de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende preferentemente la secuencia de nucleótidos indicada en la SEQ ID NO: 2.
- 10 3. Vector que contiene un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 2, en particular un vector de clonación o un vector de expresión.
- 15 4. Célula hospedadora no humana, en particular célula fúngica, que contiene un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 2 o un vector de acuerdo con la reivindicación 3, en particular una que secreta la peroxidasa al medio que rodea a la célula hospedadora, siendo el ácido nucleico heterólogo con respecto a la célula hospedadora.
- 20 5. Procedimiento para la producción de una peroxidasa que comprende  
 a) cultivo de una célula hospedadora de acuerdo con la reivindicación 4  
 b) aislamiento de la peroxidasa del medio de cultivo o de la célula hospedadora.
- 25 6. Agente de lavado o de limpieza, caracterizado por que contiene al menos una peroxidasa que comprende una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de secuencia de al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 98,5 % o al menos el 99 % con la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO: 1 a lo largo de toda su longitud, poseyendo la peroxidasa actividad enzimática para carotenoides.
- 30 7. Agente de acuerdo con la reivindicación 6, caracterizado por que  
 (i) la peroxidasa se puede obtener a partir de una peroxidasa con la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO: 1 como molécula de partida mediante sustitución de aminoácidos conservadora sencilla o múltiple; y/o  
 (ii) la peroxidasa se puede obtener a partir de una peroxidasa con la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO: 1 como molécula de partida mediante fragmentación, mutagénesis de fusión-delección, inserción o sustitución y comprende una secuencia de aminoácidos, que coincide a lo largo de una longitud de al menos 100, 150, 200, 250, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360 o 365 aminoácidos relacionados con la molécula de partida.
- 35 8. Agente de acuerdo con la reivindicación 6 o 7, caracterizado por que el agente  
 (i) es un agente de lavado o de limpieza líquido que contiene agua, en particular un detergente de lavado o lavavajillas; y/o  
 (ii) contiene adicionalmente una fuente de peróxido de hidrógeno, por ejemplo un percarbonato, peróxido o perborato; y/o  
 (iii) contiene adicionalmente tensioactivos, adyuvantes (soportes), enzimas distintas de la peroxidasa, agentes de blanqueo, activadores de blanqueo, disolventes orgánicos miscibles con agua, secuestrantes, electrolitos, reguladores de pH y/u otros coadyuvantes, tales como blanqueadores ópticos, inhibidores del agrisado, reguladores de espuma así como colorantes y fragancias así como combinaciones de los mismos.
- 40 9. Forma de realización de acuerdo con una de las reivindicaciones 1-8, caracterizada por que la peroxidasa en un ensayo de actividad fotométrico presenta actividad detectable para carotenoides como sustrato.
- 50 10. Procedimiento para la limpieza de materiales textiles o superficies duras, caracterizado por que en al menos una etapa del procedimiento se aplica un agente de acuerdo con una de las reivindicaciones 6-8.