



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 364 774**

51 Int. Cl.:  
**C12N 15/57** (2006.01)  
**C12N 9/52** (2006.01)  
**C12N 9/54** (2006.01)  
**C12N 9/56** (2006.01)  
**C11D 3/386** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07023832 .4**  
96 Fecha de presentación : **23.02.1995**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1921147**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.05.2008**

54 Título: **Enzimas mejoradas y detergentes que las contienen.**

30 Prioridad: **24.02.1994 US 201120**  
**17.01.1995 US 373818**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**14.09.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**14.09.2011**

73 Titular/es: **HENKEL AG. & Co. KGaA**  
**Henkelstrasse 67**  
**40589 Düsseldorf, DE**

72 Inventor/es: **Christianson, Teresa A.;**  
**Goddette, Dean W.;**  
**Kottwitz, Beatrix;**  
**Maurer, Karl-Heinz;**  
**Paech, Christian G.;**  
**Pochandke, Winfried;**  
**Poethkow, Jörg;**  
**Schmidt, Irmgard;**  
**Upadek, Horst;**  
**Weiss, Albrecht;**  
**Tang, Maria R. y**  
**Wilson, Charles R.**

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

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

Enzimas mejoradas y detergentes que las contienen.

Antecedentes de la invención

1. Ámbito de la invención

5 Esta invención se refiere a nuevas enzimas proteolíticas mutantes de *Bacillus lentus* DSM 5483 que tienen propiedades mejoradas con respecto a la enzima de tipo salvaje en formulaciones detergentes y de limpieza, a secuencias de nucleótidos que codifican a las proteasas mejoradas y a los organismos hospedantes que contienen las secuencias de nucleótidos que codifican a las nuevas proteasas. Esta invención incluye también dentro de su alcance a nuevas composiciones mejoradas detergentes y de limpieza que contienen una cantidad limpiadora eficaz de dichas enzimas.

2. Descripción de la técnica anterior

Las subtilisinas son un grupo de proteasas bacterianas extracelulares que tienen pesos moleculares de 20.000 a 45.000 daltones y se producen por los bacilos de la suciedad, p.ej. el *Bacillus amyloliquefaciens*. Las proteasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de enlaces peptídicos de las proteínas y sustratos peptídicos y de los enlaces éster de algunos grupos éster terminales. Las subtilisinas pertenecen al grupo de las proteasas de serina, que inician el ataque nucleófilo al enlace peptídico (éster) por un resto serina del sitio activo. Las subtilisinas son enzimas física y químicamente bien caracterizadas. Se ha elucidado con detalle la estructura tridimensional de diversas subtilisinas por estudios de difracción de rayos X (Betzel, C., Pal, G.P. y Saenger, W., Eur. J. Biochem. 178, 155-171, 1988; Bott, R., Ultsch, M., Kossiakoff, A., Graycar, T., Katz, B. y Power, S., J. Biol. Chem. 263, 7895-7906, 1988; Goddette, D.W., Paech, C., Yang, S.S., Mielenz, J.R., Bystroff, C., Wilke, M. y Fletterick, R.J., J. Mol. Biol. 228, 580-595, 1992; Heinz, D.W., Priestle, J.P., Rahuel, J., Wilson, K.S. y Grütter, M.G., J. Mol. Biol. 217, 353-371, 1991; Kraut, J., Annu. Rev. Biochem. 46, 331-358, 1977; Neidhart, D.J. y Petsko, G.A., Protein Eng. 2, 271-276, 1988; Teplyakov, AV., Kuranova, I.P., Harutyunyan, E.H., Vainshtein, B.K, Frömmel, C., Höhne, W.-E. y Wilson, K.S., J. Mol. Biol. 214, 261-279, 1990). A pesar de este cúmulo de información no se han explicado las diferencias de estructura/función entre estas subtilisinas muy afines.

Las subtilisinas se emplean ampliamente en productos comerciales (por ejemplo, en detergentes de lavandería y de lavavajillas, productos de limpieza de lentes de contacto) y con fines de investigación (catalizadores de química orgánica sintética). Un componente del grupo de las subtilisinas, una proteasa muy alcalina para el uso en formulaciones detergentes se ha descrito en la solicitud de patente WO 91/02792. Esta proteasa alcalina de *Bacillus lentus* (BLAP) se obtiene en cantidades industriales de la cepa del *Bacillus licheniformis* ATCC 53926 transformada por un plásmido de expresión que alberga el gen de la BLAP de tipo salvaje bajo el control del promotor del gen de la proteasa alcalina del *B. licheniformis* ATCC 53926. Se ha deducido la estructura cristalina de la BLAP (Goddette, D.W. y col., J. Mol. Biol. 228, 580-595, 1992; WO 92/21760) y se han depositado las coordenadas en el banco de datos llamado Brookhaven Protein Data Bank. A menos que se indique otra cosa, la numeración de las posiciones de los aminoácidos se realiza con arreglo a la secuencia de la BLAP (269 aminoácidos), que difiere de la subtilisina BPN' (275 aminoácidos). Si se alinean para obtener una homología óptima de secuencia surge el siguiente modelo. Las posiciones de 1 a 35, de 36 a 54, de 55 a 160 y de 161 a 269 de la BLAP corresponden a las posiciones de 1 a 35, de 37 a 55, de 57 a 162 y de 167 a 275, respectivamente, de la subtilisina BPN'.

Con el fin de describir las variantes de la proteasa del *Bacillus lentus* DSM 5483 según la invención, se empleará la nomenclatura siguiente: [aminoácido original; posición desde el extremo N de la enzima madura; aminoácido sustituido]. Por ejemplo, la sustitución de la valina con isoleucina en la posición 4 de la BLAP se denomina V4I. La lista de abreviaturas de aminoácidos se recoge en la tabla 1.

Tabla

Nomenclatura de aminoácidos

45 A = Ala = alanina  
C = Cys = cisteína  
D = Asp = ácido aspártico  
E = Glu = ácido glutámico  
F = Phe = fenilalanina  
50 G = Gly = glicina  
H = His = histidina  
I = Ile = isoleucina  
K = Lys = lisina

- L = Leu = leucina  
 M = Met = metionina  
 N = Asn = asparagina  
 P = Pro = prolina  
 5 Q = Gin = glutamina  
 R = Arg = arginina  
 S = Ser = serina  
 T = Thr = treonina  
 V = Val = valina  
 10 W = Trp = triptófano  
 Y = Tyr = tirosina

Las mutaciones múltiples dentro de una misma molécula de proteína se indican como suma de las mutaciones individuales, por ejemplo S3T + V4I + A188P + V193M + V199I.

15 La protección contra la inactivación térmica y química y la mejora de la potencia de lavado y limpieza son los objetivos primarios de la investigación y el desarrollo de proteasas para aplicaciones técnicas e industriales. Se ha generado un gran número de enzimas, incluidas las subtilisinas, por mutagénesis aleatoria y específica de sitio, que proporcionan algunas directrices de enfoque racional de la mejora de la estabilidad térmica y química (Estell, D.A., Graycar, T.P. y Wells, J.A., *J. Biol. Chem.* 260, 6518-6521, 1985; Matsumura, M., Becktel, W.J., Levitt, M. y Matthews, B.W., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 6562-6566, 1989; Pantoliano, M.W., Whitlow, M., Wood, J.F., Rollence, M.L., Finzel, B.C., Gillily, G.L., Poulos, T.L. y Bryan, P.N., *Bioquímica* 27, 8311-8317, 1988; Russell, A.J. y Fersht, A.R., *Nature* 328, 496-500, 1987; Siezen, R.J., De Vos, W.M., Leunissen, J.A.M. y Dijkstra, B.W., *Protein Eng.* 4, 719-737, 1991; van Ee, J.H., *Chimicaoggi (7/8)*, 31-35, 1991; Wells, J.A. y Estell, D.A., *Trends Biochem. Sci.* 13, 291-297, 1988). La modulación de actividad enzimática, en particular la intensificación u optimización de eficacia de un subgrupo de sustratos es un problema mucho más complejo. En la EP 0260105 se describe la construcción de mutantes de subtilisina BPN' con velocidades alteradas de transesterificación/hidrólisis y con especificidades nucleófilas alteradas cambiando los restos aminoácido específicos dentro de 15 Å de la tríada catalítica. Russell, A.J. y Fersht, A.R., *J. Mol. Biol.* 193, 803-813, 1987, describen el aislamiento de un mutante de subtilisina BPN' (D099S) que presenta un cambio de carga superficial de 14 a 15Å del sitio activo. Esta sustitución provoca un efecto en la dependencia del pH de la reacción catalítica de la subtilisina. Pero estas publicaciones no indican el modo de predecir las alteraciones de aminoácidos que mejorarán la eficacia de lavado de la proteasa. En los documentos EP 0130756, EP 0247647 y US 4,760,025 se describe un método de mutación de saturación, en el que se introducen una o múltiples mutaciones en la subtilisina BPN' en los restos aminoácidos (numeración de la BPN') Asp32, Asn155, Tyr104, Met222, Gly166, His64, Ser221, Gly169, Glu156, Ser33, Phe189, Tyr217 y/o Ala152. Aplicando esta estrategia se obtienen proteasas mutantes que poseen una mejor estabilidad a la oxidación, una especificidad alterada de sustrato y/o una actividad alterada de pH. En estas publicaciones se describe también que las mutaciones dentro de la región de sitio activo de la proteasa son las idóneas para influir en la actividad. Sin embargo, ni en la EP 0130756, EP 0247647 ni en la US 4,760,025 se describe un método para predecir las alteraciones de aminoácidos que mejorarán la eficacia de lavado de la proteasa.

40 La mayor parte de la información de la actividad catalítica de las subtilisinas se ha recogido examinando la hidrólisis de sustratos peptídicos pequeños y bien definidos. Pero se sabe muy poco de las interacciones con sustratos proteicos grandes. Lo dicho se cumple en especial respecto a la eficacia de lavado de proteasas cuando el sustrato está fijado sobre una superficie textil y la catálisis tiene lugar en presencia de compuestos interferentes, como son los agentes de blanqueo, tensioactivos y sustancias soporte (builders).

45 En la EP 0328229 se describe el aislamiento y la caracterización de las mutantes de subtilisina PB92 que tienen propiedades mejoradas para aplicaciones detergentes en lavandería, basadas en los resultados de los ensayos de lavado. En ella se describe que las propiedades bioquímicas no son parámetros fiables para predecir la eficacia de lavado que tiene la enzima. Los métodos para seleccionar mutaciones incluyen la sustitución de un aminoácido por otro aminoácido de la misma categoría (polar, no polar, aromático, cargado, alifático y neutro), la sustitución de un aminoácido polar asparagina y glutamina por un aminoácido cargado y el incremento del carácter aniónico de la proteasa en los sitios no incluidos en el sitio activo. No se describe ningún método para identificar el aminoácido específico que conviene alterar. En la solicitud de patente WO 91/00345 (Novo-Nordisk) se describe un método para mejorar la eficacia de lavado de una subtilisina por modificación del punto isoelectrónico de la subtilisina Carlsberg y de la subtilisina 309 para ajustar el pH de la solución de lavado, en el que se supone se va a utilizar la enzima. Sin embargo, dado que las subtilisinas muy alcalinas tienen valores de pI muy próximos al pH de los detergentes en las condiciones europeas de lavado, esta estrategia no presenta ninguna ventaja obvia. En WO 91/00346 se describen que los cambios en los aminoácidos de más de 15 Å de la tríada catalítica pueden traducirse en cambios en las propiedades cinéticas de la enzima. Se sugiere que un total de 116 aminoácidos diferentes de un total de 269 aminoácidos presentes en la subtilisina 309 son posibles sitios de sustitución, adición o delección para modificar la carga eléctrica neta de la enzima.

En la solicitud de patente WO 92/11357 (Novo-Nordisk) se describe la mayor estabilidad al pH y la mejor capacidad de lavado de las subtilisininas por reducción de las cargas de la molécula que dependen del pH. Esto significa la introducción de mutaciones que persiguen una constancia sustancia de la carga a lo largo del intervalo de pH. Con preferencia, un cambio neto de carga casi cero en el intervalo de pH de 7 a 11. En la solicitud de patente europea nº 0 57 049 A1 se describen ciertas enzimas proteolíticas mutantes. Se dice que estas enzimas tienen una homología de por lo menos el 70% con la secuencia de aminoácidos de la proteasa de serina PB92 y difieren por lo menos en un aminoácido correspondiente a 99, 102, 116, 126, 127, 128, 130, 160, 203, 211 y 212 de la proteasa de serina PB92. La proteasa mutante se obtiene cultivando una cepa de microorganismo hospedante transformada con un vector de expresión que contiene una secuencia de DNA y codifica una proteasa mutante para producir la proteasa mutante deseada.

Hasta la fecha, las proteasas propuestas para el uso en detergentes y auxiliares de lavado se han elegido por tener una gran actividad proteolítica. Teniendo en cuenta su baja especificidad, puede ocurrir por tanto que la proteasa provoque un deterioro de las fibras o la destrucción de las fibras, en especial en el caso de lavado repetitivo de textiles de fibras proteinogénicas, por ejemplo textiles de seda o de lana en forma de láminas. Por otro lado, cualquier reducción de la actividad de proteasa se traduce en una pérdida del poder de lavado, que el usuario del detergente observará. Por consiguiente, un problema abordado por la presente invención es el desarrollo de detergentes que contengan proteasas, que desplieguen una actividad reducida sobre fibras proteinogénicas, más en especial sobre la lana, pero conservando una actividad de lavado sustancialmente igual. Otro problema abordado por la presente invención consiste en desarrollar proteasas específicas de la suciedad, que son proteasas que eliminan las manchas específicas existentes en los tejidos, por ejemplo manchas de huevo y manchas de sangre y desarrollar formulaciones detergentes que contengan dichas proteasas específicas de la suciedad.

#### Resumen de la invención

La proteasa de tipo salvaje, de la que se derivan las proteasas mutantes según la invención, es una proteasa alcalina de *Bacillus lentus* (BLAP) obtenida a partir de la DSM 5483, que tiene 269 restos aminoácido, un peso molecular de 26.823 daltones y un punto isoeléctrico calculado de 9,7 basados en valores pK estándar. El gen SLAP se obtiene aislando el DNA cromosómico de la cepa *B. lentus* DSM 5483, construyendo sondas de DNA que tengan homología con las secuencias de DNA putativas que codifican a las regiones de la proteasa del *B. lentus*, preparando bibliotecas genómicas del DNA cromosómico aislado y explorando las bibliotecas en busca de los genes de interés por hibridación con las sondas.

Las mutantes de la proteasa del *B. lentus* DSM 5483 que tienen una estabilidad térmica y detergente mejorada se han descrito en la solicitud de patente que lleva el número de serie 07/706,691, depositada con fecha 29 de mayo de 1991. En general, las mutaciones descritas en esta invención se introducen en la BLAP de tipo salvaje con los siguientes reemplazos de aminoácidos: S3T, V4I, A188P, V193M y V199I (numeración con arreglo a la secuencia de la BLAP).

La investigación dirigida a la fijación de la proteasa sobre sustratos proteicos de alto peso molecular existentes sobre textiles ha puesto de manifiesto la importancia del aminoácido cargado situado en la proximidad del sitio de fijación del sustrato. Se ha podido demostrar que la eliminación de restos aminoácido cargados positivamente o la introducción de restos aminoácido cargados negativamente en la región de la bolsa de fijación de la proteasa al sustrato se traduce en una mejor eficacia de lavado, si se compara con el tipo salvaje.

La presente invención se refiere también a composiciones detergentes para el lavado de textiles formados por fibras proteinogénicas, por ejemplo la lana, sin causar daño a tales fibras. Los detergentes está formados por lo menos por un tensioactivo y una cantidad proteolíticamente activa de una proteasa mutante del *Bacillus lentus* DSM 5483 que tiene una proporción de actividad de queratinasa/caseinasa de menos de 0,80.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a composiciones detergentes, que son especialmente eficaces para eliminar manchas, por ejemplo manchas de sangre y de huevo, y en especial combinaciones de este tipo de manchas, sobre los tejidos. Los detergentes están formados por una combinación de proteasas que son variantes del *Bacillus lentus* DSM 5483 y por lo menos un tensioactivo.

#### Breve descripción de las figuras

En la figura 1 se representa la secuencia de DNA del fragmento Aval/ClaI de la región del extremo N del gen de la proteasa alcalina ATCC 53926 descrito en el ejemplo 2. Este fragmento incluye el promotor putativo, el sitio de fijación ribosómica, el codón de inicio y la mayor parte de la pre-secuencia. El fragmento de 292 pares de bases está flanqueado por sitios de restricción Aval y ClaI en sus extremos 5' y 3', respectivamente.

Depósito de microorganismos

El *Bacillus licheniformis* E312 con el plásmido pBC56M131 se ha depositado como ATCC 68614. La *Escherichia coli* WK6 con el plásmido pMC13C se ha depositado como ATCC 68615. La *E. coli* GM33 con el plásmido pCB13C se ha depositado como ATCC 68616. *E. coli* WK6 con el plásmido pMa5-8 se ha depositado como ATCC 68617. *E. coli* WK6 con el plásmido pMc5-8 se ha depositado como ATCC 68618.

5 Descripción de las formas de ejecución preferidas

Un aspecto de la presente invención se refiere a una proteasa mutante del *Bacillus lentus* DSM 5483 que tiene una eficacia de lavado mejorada. La eficacia mejorada de lavado se obtiene introduciendo alteraciones de aminoácidos dentro de una región de la bolsa de fijación de la enzima al sustrato, lo cual se traduce en una mayor carga negativa. Según la presente invención, esto puede lograrse aumentando el número de restos aminoácido cargados negativamente o disminuyendo el número de restos aminoácido cargados positivamente la región de la bolsa de fijación de la enzima al sustrato dentro de 7A de una molécula de sustrato fijado, por ejemplo AAPF. En particular se ha constatado que las alteraciones de los aminoácidos de las posiciones 99, 154 y 211 dentro de las variantes M130 y M131 de la proteasa alcalina del *Bacillus lentus* (BLAP) aumentan la eficacia de lavado de la enzima.

Un segundo aspecto de la presente invención se refiere a enzimas proteolíticas mutantes del *Bacillus lentus* DSM 5483 que tienen una mayor eficacia de lavado que la proteasa de tipo salvaje, según se ha determinado mediante ensayos de laboratorio. Las mutaciones descritas en esta invención se introducen en las variantes M130 o M131 de la BLAP, que se han descrito previamente en la solicitud de patente que lleva el número de serie 07/706,691, depositada con fecha 29 de mayo de 1991. Tanto la M130 como la M131 han demostrado tener una mejor estabilidad que la proteasa de tipo salvaje. La mutante M130 contiene cuatro alteraciones de aminoácido: S3T, A188P, V193M y V199I. La mutante M131 contiene cinco alteraciones de aminoácido: S37; V41; A188P; V193M y V199I. El sistema empleado para designar las proteasas preferidas menciona en primer lugar el resto aminoácido de la forma madura de la BLAP en la posición numerada y después el aminoácido reemplazante empleando los códigos aceptados de aminoácidos de una letra. Las secuencias de aminoácidos de las proteasas M130 y M131 se describen en la SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 1, respectivamente, ya contenidas en la solicitud de patente que lleva el número de serie 07/706,691, depositada con fecha 29 de mayo de 1991. No solo la M130 sino también la M131 sirven de base para alteraciones adicionales de aminoácidos para obtener proteasas con mayor eficacia de lavado. Las proteasas mutantes del *Bacillus lentus* DSM 5483 según la invención se caracterizan por lo menos por una alteración de aminoácido, que se traduce en una menor carga positiva o una mayor carga negativa en la región de la bolsa de fijación al sustrato, dicha alteración de aminoácido es R99E, R99G, R99A o R99S según el recuento de la SEQ ID NO 22. En la tabla 2 se facilita una descripción de las proteasas mutantes BLAP, que incluyen la F11, F43, F44, F45, F46, F47, F49, F54 y F55. Por ejemplo, la F11 recogida en la tabla 2, se deriva de la M130 y contiene una arginina de la posición 99 que se ha reemplazado por una serina (R99S) junto con otras mutaciones presentes en la M130, que incluyen: una serina en la posición 3 que se ha reemplazado por una treonina (S3T); una alanina de la posición 188 que se ha reemplazado por una prolina (A188P); una valina de la posición 193 que se ha reemplazado por una metionina (V193M) y una valina de la posición 199 que se ha reemplazado por una isoleucina (V199I); de las proteasas mutantes restantes, de la F43 a la F49 se derivan de la M131. Las mutantes F54 y F55 se derivan de la mutante F49. Las secuencias de aminoácidos de las enzimas proteolíticas F11, F43, F44, F45, F46, F47, F49, F54 y F55 se describen en las secuencias de la SEQ ID NO: 10 a la SEQ ID NO: 18, respectivamente, de esta solicitud.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a composiciones detergentes, que contienen por lo menos un tensioactivo y una cantidad proteolíticamente activa de una proteasa del *Bacillus lentus* DSM 5483 según la invención que tiene una proporción de actividad queratinasa/caseinasa actividad ratio (llamada a continuación: proporción KC) inferior a 0,80, con preferencia inferior a 0,70 y con mayor preferencia comprendida entre 0,2 y 0,65.

El detergente tiene con preferencia una actividad proteolíticamente comprendida entre 100 PU/g y 7500 PU/g.

La presente invención se refiere al uso de proteasas de *Bacillus lentus* DSM 5483 según la invención con una proporción KC inferior a 0,80, con preferencia inferior a 0,70 y con mayor preferencia comprendida entre 0,2 y 0,65, para el lavado de textiles de fibras proteinogénicas o textiles constituidos por lo menos parcialmente por fibras proteinogénicas.

La proporción KC incluye la actividad de la proteasa con respecto a dos sustratos diferentes, la caseína y la queratina.

La actividad proteolítica de una solución de proteasa, que, en el caso de tener la caseína como sustrato, produce una absorción de 0,500 OD en las condiciones de medición descritas, definida como 10 PU (unidades de proteasa) por ml. El resultado de la limpieza que observa el usuario de un detergente que contiene proteasa está en

consonancia con esta actividad expresada en PU. El daño observado en el tejido de fibras proteinogénicas guarda relación con la proporción KC, para un resultado constante de lavado.

Como era de esperar a la luz del problema recién descrito, en el caso de las proteasas comerciales se observa una diferencia muy pequeña entre las actividades con respecto a la caseína y a la queratina, situándose la proporción KC muy próxima a 1. Se ha constatado que las proteasas con una proporción KC inferior a 0,80 tienen que utilizarse para lograr un grado de deterioro del tejido proteinógeno que deje de ser significativo.

Se ha encontrado de modo sorprendente que las proteinasas del *Bacillus lentus* DSM 5483, que tienen las propiedades recién mencionadas, pueden tener un efecto sinérgico con otros ingredientes del detergente y que, a la inversa, la actividad proteolítica de la proteasa puede mejorarse en sentido sinérgico con ciertos ingredientes del detergente. Estos efectos tienen lugar en especial en el caso, en el que el componente tensioactivo de las composiciones según la invención contenga tensioactivos no iónicos, copoliésteres de liberación de suciedad (más en concreto, los que contienen unidades ácido tereftálico), sustancias soporte orgánicas insolubles en agua, sustancias soporte inorgánicas y orgánicas solubles en agua (más en especial, las basadas en carbohidratos oxidados) y los tensioactivos aniónicos sintéticos de tipo sulfato y sulfonato, pero no muy fuerte, si lo hubiera, en el caso de los alquilbencenosulfonatos. Los detergentes según la invención contienen con preferencia ingredientes, cuyas propiedades se mejoran o bien que mejoran las propiedades de la proteasa.

Las proteasas idóneas para el uso según con la invención son variantes de ingeniería genética del *Bacillus lentus* DSM 5483. Estas variantes pueden obtenerse con arreglo al método descrito en la solicitud de patente US que lleva el número de serie 08/201,120, depositada con fecha 24/02/94 y en la patente US número 5,340,735. Las variantes del *Bacillus lentus* DSM 5483 (BLAP) se incluyen en la lista de la tabla 2 del ejemplo 2.

En referencia a la tabla 2, el sistema empleado para identificar las variantes es el mismo que se emplea en la patente US número 5,340,735 y descrito en ella. Por ejemplo, la mutante F49 se identifica como S3T + V4I + A188P + V 193M + V199I + L211 D. Dicha proteasa es una variante mutante del *Bacillus lentus* DSM 5483, en la que el resto serina de la posición 3 se ha reemplazado por treonina, el resto valina de la posición 4 se ha reemplazado por isoleucina, el resto alanina de la posición 188 se ha reemplazado por prolina, el resto valina de la posición 193 se ha reemplazado por metionina, el resto valina de la posición 199 se ha reemplazado por isoleucina y el resto leucina de la posición 211 se ha reemplazado por ácido aspártico. La secuencia de aminoácidos de la proteasa BLAP de tipo salvaje se describe como SEQ ID NO 52 en la patente US número 5,340,735.

Se ha encontrado que algunas variantes del *Bacillus lentus* DSM 5483 despliegan una actividad preferente sobre las manchas de sangre, mientras otras despliegan una actividad preferente sobre las manchas de huevo. Las mutantes que son especialmente eficaces para eliminar las manchas de sangre y de huevo de los tejidos son las mutantes sintetizadas realizando los siguientes reemplazos en la proteína del *Bacillus lentus* DSM 5483 de tipo salvaje: R99G, R99A, R99S, S154D, S154E, L221D y L211E. Las mutantes, en las que se han reemplazados los restos aminoácido de las posiciones 99 y 154, son especialmente eficaces para eliminar las manchas de sangre. Las mutantes, en las que se ha reemplazado el resto aminoácido de la posición 211, son especialmente eficaces para eliminar las manchas de huevo. Se ha constatado que una combinación de enzimas mutantes, en las que se hayan reemplazados los restos aminoácido de las posiciones 99 y 154 y aquellas, en las que se han reemplazado el resto aminoácido de la posición 211, es especialmente eficaz para eliminar una combinación de manchas de sangre y huevo.

En una forma preferida de ejecución, un detergente según la invención contiene tensioactivos no iónicos seleccionados entre poliglucósidos alquil-grasos, polialcoxilatos alquil-grasos, más especialmente etoxilados y/o propoxilados, polihidroxiamidas de ácidos grasos y/o productos de etoxilación y/o propoxilación de alquilaminas grasas, dioles vecinales, ésteres de alquilo de ácidos grasos y/o amidas de ácidos grasos y mezclas de los mismos, más en especial en una cantidad del 2% en peso al 25% en peso.

En otra forma preferida de ejecución, un detergente según la invención contiene un tensioactivo aniónico sintético, de tipo sulfato y/o sulfonato, más en especial un sulfato de alquilo graso, un éter-sulfato de alquilo graso, un éster de ácido sulfograso y/o disales de ácido sulfograso, más en especial en una cantidad del 2% en peso al 25% en peso. El tensioactivo aniónico se elige con preferencia entre los sulfatos de alquilo o alquenilo y/o los éter-sulfatos de alquilo o alquenilo, cuyos grupos alquilo o alquenilo contienen de 8 a 22 átomos de carbono y, de modo más especial, de 12 a 18 átomos de carbono.

En otra forma preferida de ejecución, un detergente según la invención contiene sustancias soporte (builders) solubles en agua y/o insolubles en agua, elegidas de modo más especial entre los alumosilicatos de metales alcalinos, silicatos cristalinos de metales alcalinos con un módulo de > 1, los policarboxilatos monómeros, los policarboxilatos polímeros y mezclas de los mismos, de modo más especial en cantidades del 2,5% en peso al 60% en peso.

Otra forma de ejecución, aunque menos preferida, de un detergente según la invención destinado al lavado de tejidos de lana o seda contiene agentes blanqueantes de base peroxigenada, de modo más especial el peróxido de hidrógeno, perboratos de metales alcalinos tetrahidratados, perboratos de metales alcalinos monohidratados y/o percarbonatos de metales alcalinos, de modo más especial en cantidades de 5% en peso al 70% en peso, y  
 5 opcionalmente activadores de blanqueo, de modo más especial en cantidades del 2% en peso al 10% en peso.

Finalmente, otra forma de ejecución de un detergente según la invención contiene agentes de liberación de suciedad basados en copoliésteres de ácidos dicarboxílicos y glicoles, que pueden estar presentes en especial en cantidades del 0,01 % en peso al 5% en peso. Estos agentes de liberación de suciedad, que son especialmente eficaces en virtud de su semejanza química con las fibras de poliéster, pero que además son capaces de desplegar el efecto  
 10 requerido en tejidos de otros materiales, son los copoliésteres que contienen unidades ácido dicarboxílico, unidades alquilenglicol y unidades polialquilenglicol. Los copoliésteres de liberación de suciedad del tipo mencionado y su utilización en detergentes ya son conocidos desde hace algún tiempo.

Las composiciones detergentes según la invención contienen por lo menos un tensioactivo, que incluye jabones. Los tensioactivos pueden ser tensioactivos no iónicos o aniónicos o una combinación de tensioactivos no iónicos y  
 15 aniónicos o una combinación de tensioactivos no iónicos y aniónicos y uno o más jabones.

Los tensioactivos no iónicos idóneos incluyen a los alcoxilatos, de modo más especial los etoxilatos y/o propoxilatos, de alcoholes saturados o mono- o poliinsaturados, lineales o ramificados, que contienen de 10 a 22 átomos de carbono y con preferencia de 12 a 18 átomos de carbono. El grado de alcoxilación de los alcoholes se sitúa en general entre 1 y 20 y con preferencia entre 3 y 10. Pueden obtenerse en general por reacción de los alcoholes  
 20 correspondientes con los óxidos de alquileo correspondientes. Los derivados de alcoholes grasos son especialmente indicados, aunque sus isómeros de cadena ramificada, de modo más especial los llamados oxoalcoholes, pueden utilizarse también para la producción de alcoxilatos útiles. Por consiguiente pueden utilizarse los alcoxilatos, de modo más especial los etoxilatos, de alcoholes primarios que contienen grupos lineales, de modo más especial grupos dodecilo, tetradecilo, hexadecilo u octadecilo y mezclas de los mismos. Son también indicados los correspondientes productos de alcoxilación de alquilaminas, dioles vecinales y amidas de ácidos carboxílicos correspondientes a los alcoholes antes mencionados en los que respecta al resto alquilo. Los poliglucósidos de alquilo idóneos para la incorporación a los detergentes según la invención son compuestos que se ajustan a la fórmula general  $(G)_n-OR^1$ , en la que  $R^1$  es un resto alquilo o alquenoilo que contiene de 8 a 22 átomos de carbono, G es una unidad glucosa y n es un número de 1 a 10. El componente glucósido  $(G)_n$  es un oligómero o polímero de monómeros de aldosa o de cetosa de origen natural, incluidos en particular la glucosa, la manosa, la fructosa, la galactosa, la talosa, la gulosa, la altrosa, la alosa, la idosa, la ribosa, la arabinosa, la xilosa y la lixosa. Los oligómeros formados por tales monómeros unidos por glucósidos se caracterizan no solo por el tipo de azúcar que está presente en ellos, sino también por su número, también llamado grado de oligomerización. El grado de oligomerización n es una cantidad determinable analíticamente y en general es un número fraccionario, que puede  
 25 adoptar un valor comprendido entre 1 y 10 y, en el caso de los glucósidos que se emplean con preferencia, adopta un valor inferior a 1,5 y, de modo más especial, entre 1,2 y 1,4. La glucosa es el monómero preferido en virtud de su fácil disponibilidad. El sustituyente alquilo o alquenoilo  $R^1$  de los glucósidos emana también con preferencia de derivados fácilmente accesibles de materias primas renovables, de modo más especial de alcoholes grasos, aunque pueden utilizarse también sus isómeros de cadena ramificada, de modo más especial los llamados oxoalcoholes, para la producción de glucósidos útiles. Por consiguiente son especialmente indicados los alcoholes primarios que tienen grupos octilo, decilo, dodecilo, tetradecilo, hexadecilo u octadecilo lineales y las mezclas de los mismos. Los glucósidos de alquilo especialmente preferidos contienen un grupo alquilo graso de coco, es decir, mezclas en las que esencialmente  $R^1$  es dodecilo y  $R^1$  es tetradecilo.  
 30  
 35  
 40

El tensioactivo no iónico estará presente con preferencia en los detergentes según la invención en cantidades del 1 % en peso al 30% en peso y con mayor preferencia en cantidades del 1% en peso al 25% en peso.  
 45

Además de o en lugar del tensioactivo no iónico, los detergentes según la invención pueden contener otros tensioactivos, con preferencia tensioactivos aniónicos sintéticos de tipo sulfato o sulfonato, en cantidades con preferencia no superiores al 20% en peso y, con mayor preferencia, en cantidades del 0,1% en peso al 18% en peso, porcentajes referidos al peso total del detergente. Los tensioactivos aniónicos sintéticos idóneos para el uso  
 50 en los detergentes según la invención son los sulfatos de alquilo y/o alquenoilo que tienen de 8 a 22 átomos de carbono y contienen como contraión un ion de metal alcalino, de amonio o de amonio sustituido por alquilo o hidroxialquilo. Son preferidos los derivados de alcoholes grasos que contienen de 12 a 18 átomos de carbono y sus análogos de cadena ramificada, también llamados oxoalcoholes. Los sulfatos de alquilo y alquenoilo pueden obtenerse por métodos ya conocidos, por reacción del correspondiente componente alcohol con un agente sulfatante típico, de modo más especial con el trióxido de azufre o el ácido clorosulfónico y posterior neutralización con bases de metales alcalinos, amónicas o amónicas sustituidas por alquilo o hidroxialquilo. Los sulfatos de alquilo y/o alquenoilo de este tipo están presentes con preferencia en los detergentes según la invención en cantidades del 0,1 % en peso al 20% en peso y con mayor preferencia en cantidades del 0,5% en peso al 18% en peso.  
 55

Los tensioactivos idóneos de tipo sulfato incluyen también a los productos de alcoxilación sulfatados de los alcoholes mencionados, también llamados éter-sulfatos. Estos éter-sulfatos tienen con preferencia de 2 a 30 y, de modo más especial, de 4 a 10 grupos etilenglicol por molécula. Los tensioactivos aniónicos idóneos de tipo sulfonato incluyen los  $\alpha$ -sulfoésteres que pueden obtenerse por reacción de ésteres de ácidos grasos con trióxido de azufre y posterior neutralización, de modo más especial los productos de sulfonación derivados de ácidos grasos  $C_{8-22}$  y con preferencia  $C_{12-18}$  y alcoholes lineales  $C_{1-6}$  y con preferencia  $C_{1-4}$ , y los ácidos sulfograsos derivados de estos productos de sulfonación por saponificación formal.

Otros ingredientes tensioactivos opcionales incluyen a los jabones, los jabones idóneos son jabones de ácidos grasos saturados, por ejemplo las sales del ácido láurico, ácido mirístico, ácido palmítico o ácido esteárico y los jabones derivados de mezclas de ácidos grasos naturales, por ejemplo los ácidos grasos del aceite de coco, del aceite de palmiste o del sebo. Son especialmente preferidas las mezclas de jabón formadas del 50% en peso al 100% en peso por jabones de ácidos grasos saturados  $C_{12-18}$  y hasta un 50% en peso de jabón de ácido oleico. El jabón estará presente con preferencia en cantidades del 0,1% en peso al 5% en peso. Sin embargo pueden estar presentes cantidades mayores de jabón, hasta un 20% en peso, en especial en los detergentes líquidos.

Un detergente según la invención contiene con preferencia del 20% en peso al 55% en peso de sustancias soporte (builders) orgánicas y/o inorgánicas, solubles en agua y/o insolubles en agua. Las sustancias soporte orgánicas solubles en agua incluyen, en especial, las del grupo de los ácidos policarboxílicos, de modo más especial el ácido cítrico y los ácidos del azúcar, y el grupo de los ácidos (poli)carboxílicos poliméricos, de modo más especial los policarboxilatos que pueden obtenerse por oxidación de polisacáridos, los ácidos acrílicos poliméricos, los ácidos metacrílicos, los ácidos maleicos y sus copolímeros, que pueden seguir conteniendo pequeñas cantidades de sustancias polimerizables, sin grupos funcionales ácido carboxílico en su forma copolimerizada. El peso molecular relativo de los homopolímeros de ácidos carboxílicos insaturados se sitúa por lo general en el intervalo de 5.000 a 200.000, mientras que el peso molecular relativo de los copolímeros se sitúa entre 2.000 y 200.000, y con preferencia de 50.000 a 120.000, referidos al ácido libre. Un copolímero de ácido acrílico/ácido maleico especialmente preferido tiene un peso molecular relativo de 50.000 a 100.000. Los compuestos idóneos, pero menos preferidos, de este grupo son los copolímeros de ácido acrílico o de ácido metacrílico con éteres de vinilo, por ejemplo los éteres de vinilmetilo, los éteres de vinilo, etileno, propileno y estireno, en los que la cantidad de ácido se sitúa por lo menos en el 50% en peso. Otras sustancias soporte (builders) orgánicas idóneas, solubles en agua son los terpolímeros que como monómeros tienen dos ácidos carboxílicos o sus sales y como tercer monómero tienen el alcohol vinílico y/o un derivado de alcohol vinílico o un hidrato de carbono. El primer monómero ácido o su sal se deriva de un ácido carboxílico  $C_{3-6}$  monoetilénicamente insaturado y con preferencia de un ácido monocarboxílico  $C_{3-4}$ , de modo más especial del ácido (met)acrílico. El segundo monómero ácido o su sal puede ser un derivado de un ácido dicarboxílico  $C_{4-6}$ , con preferencia un ácido dicarboxílico  $C_{4-6}$ , siendo especialmente preferido el ácido maleico. En este caso, la tercera unidad de monómero está formada por el alcohol vinílico y/o con preferencia por un alcohol vinílico esterificado. Son especialmente preferidos los derivados de alcohol vinílico en forma de ésteres de ácidos carboxílicos de cadena corta, con preferencia ácidos carboxílicos  $C_{1-4}$ , con alcohol vinílico. Los terpolímeros preferidos contienen del 60% en peso al 95% en peso y, de modo más especial, del 70% en peso al 90% en peso de ácido (met)acrílico o (met)acrilato, con mayor preferencia de ácido acrílico o acrilato, y ácido maleico o maleato y del 5% en peso al 40% en peso y con preferencia del 10% en peso al 30% en peso de alcohol vinílico y/o acetato de vinilo. Son especialmente preferidos los terpolímeros, cuya proporción ponderal entre ácido (met)acrílico o (met)acrilato y ácido maleico o maleato se sitúa entre 1:1 y 4:1, con preferencia entre 2:1 y 3:1 y con mayor preferencia entre 2:1 y 2,5:1 (tanto las cantidades como las proporciones ponderales se refieren a los ácidos). El segundo monómero ácido o su sal puede ser incluso un derivado de un ácido alil-sulfónico sustituido en la posición 2 por un resto alquilo, con preferencia por un resto alquilo  $C_{1-4}$ , o por un resto aromático, derivado con preferencia del benceno o de derivados de benceno. Los terpolímeros preferidos contienen del 40% en peso al 60% en peso y de modo más especial del 45% en peso al 55% en peso de ácido (met)acrílico o de (met)acrilato, con mayor preferencia de ácido acrílico o acrilato, del 10% en peso al 30% en peso y con preferencia del 15% en peso al 25% en peso de ácido metalil-sulfónico o de metalil-sulfonato y, como tercer monómero, del 15% en peso al 40% en peso y con preferencia del 20% en peso al 40% en peso de un hidrato de carbono. Este hidrato de carbono puede ser, por ejemplo, un mono-, di-, óligo- o polisacárido, siendo preferidos los mono-, di- u oligosacáridos, es especialmente preferida la sucrosa. Los puntos débiles, que provocan la fácil biodegradabilidad del polímero, son incorporan presumiblemente al mismo a través del uso del tercer monómero. Estos terpolímeros tienen por lo general un peso molecular relativo comprendido entre 200 y 50.000 y con mayor preferencia entre 3.000 y 10.000. Pueden utilizarse en forma de soluciones acuosas, con preferencia del 30 % al 50 % en peso de soluciones acuosas, en especial para la producción de detergentes líquidos, Todos los ácidos policarboxílicos mencionados se emplean en general en forma de sus sales solubles en agua, de modo más especial en forma de sus sales de metales alcalinos.

Las sustancias soporte orgánicas del tipo en cuestión están presentes con preferencia en cantidades de hasta el 40% en peso, con mayor preferencia en cantidades de hasta el 25% en peso y con preferencia especial en cantidades del 1% en peso al 5% en peso. En los detergentes según la invención en forma de pasta o líquidos, de modo más especial en los detergentes que contienen agua, se emplean con preferencia cantidades próximas al límite superior mencionado.



- Los aluminosilicatos de metales alcalinos, cristalinos o amorfos, se emplean en especial como sustancias soporte inorgánicas insolubles en agua, dispersables en agua, en cantidades de hasta el 50% en peso y con preferencia en cantidades no superiores al 40% en peso y, en los detergentes líquidos en cantidades del 1% en peso al 5% en peso. Entre estos aluminosilicatos son preferidos los aluminosilicatos sódicos cristalinos de calidad para detergentes, de modo más especial las zeolitas A, P y opcionalmente la X. Se emplean con preferencia cantidades próximas al límite superior mencionado en el caso de detergentes sólidos divididos en partículas. Los aluminosilicatos idóneos contienen partículas de tamaño no superior a 30  $\mu\text{m}$ , por lo menos el 80% en peso está formado por partículas que tienen un tamaño inferior a 10  $\mu\text{m}$ . Su capacidad de fijación del calcio se sitúa por lo general entre 100 y 200 mg de CaO por gramo.
- Los sustitutos idóneos o los sustitutos parciales de aluminosilicatos mencionados son los silicatos cristalinos de metales alcalinos, que pueden estar presentes tal cual o bien mezclados con silicatos amorfos. Los silicatos de metales alcalinos idóneos para el uso como sustancias soporte (builders) en los detergentes según la invención con preferencia tienen una proporción molar entre óxido de metal alcalino y  $\text{SiO}_2$  inferior a 0,95 y, de modo más especial, estará comprendida entre 1:1,1 y 1:12 y pueden estar presentes en forma amorfa o cristalina. Los silicatos de metales alcalinos preferidos son los silicatos sódicos, de modo más especial los silicatos sódicos amorfos, que tienen una proporción molar entre el  $\text{Na}_2\text{O}$  y el  $\text{SiO}_2$  de 1:2 a 1:2,8. Los silicatos de metales alcalinos amorfos son productos comerciales, por ejemplo, con el nombre de PORTIL<sup>®</sup>. Los que tienen una proporción molar entre el  $\text{Na}_2\text{O}$  y el  $\text{SiO}_2$  de 1:1,9 a 1:2,8 se emplean con preferencia en forma sólida y no en forma de solución para la producción de los detergentes según la invención. Los silicatos cristalinos preferidos, que pueden estar presentes tal cual o bien mezclados con silicatos amorfos, son los silicatos laminares cristalinos de la fórmula general  $\text{Na}_2\text{SixO}_{2x+1}\cdot\text{yH}_2\text{O}$ , en la que x - también llamado módulo - es un número de 1,9 a 4 e "y" es un número de 0 a 20, los valores preferidos de x son 2, 3 ó 4. Los silicatos laminares cristalinos preferidos son aquellos, en los que x de la fórmula general adoptar el valor 2 ó 3. Tanto los  $\beta$ - como los  $\delta$ -disilicatos sódicos ( $\text{Na}_2\text{Si}_2\text{O}_6\cdot\text{yH}_2\text{O}$ ) son especialmente preferidos. Son preferidos los  $\delta$ -silicatos sódicos, que tienen un módulo de 1,9 a 3,2. Los silicatos de metales alcalinos cristalinos, sustancialmente exentos de agua, que se ajustan a la anterior fórmula general, en la que x es un número de 1,9 a 2,1, pueden utilizarse también en los detergentes según la invención. Otra forma preferida de ejecución de los detergentes según la invención son los silicatos sódicos laminares cristalinos, que tienen un módulo de 2 a 3. Los silicatos sódicos cristalinos que tienen un módulo de 1,9 a 3,5 se emplean en otra forma preferida de ejecución de los detergentes según la invención. El contenido en silicato de metal alcalino de los detergentes según la invención se sitúa con preferencia entre el 1% en peso y el 50% en peso y con mayor preferencia entre el 5% en peso y el 35% en peso, porcentaje referido a la sustancia activa anhidra. Si también está presente un aluminosilicato de metal alcalino, de modo más especial una zeolita, como sustancia soporte adicional, entonces el contenido en silicato de metal alcalino se sitúa con preferencia entre el 1% en peso y el 15% en peso y con mayor preferencia entre el 2% en peso y el 8% en peso, porcentaje referido a la sustancia activa anhidra. En tal caso, la proporción ponderal entre el aluminosilicato y el silicato, referida a las sustancias activas anhidras, se sitúa con preferencia entre 4:1 y 10:1. En los detergentes que contienen silicatos de metales alcalinos no solo amorfos sino también cristalinos, la proporción ponderal entre el silicato de metal alcalino amorfo y el silicato de metal alcalino cristalino se sitúa con preferencia entre 1:2 y 2:1 y con mayor preferencia entre 1:1 y 2:1.
- Además de la sustancia soporte inorgánica mencionada pueden utilizarse en los detergentes según la invención otras sustancias inorgánicas solubles en agua o insolubles en agua. Los carbonatos de metales alcalinos, los hidrogenocarbonatos de metales alcalinos y los sulfatos de metales alcalinos y las mezclas de los mismos son útiles al respecto. Los materiales inorgánicos adicionales pueden estar presentes en cantidades de hasta el 70% en peso, pero con preferencia estarán ausentes.
- Para ajustar el pH a un valor opcionalmente ácido o ligeramente alcalino, en especial entre 8,0 y 9,5 en una solución acuosa del 1% en peso, los detergentes según la invención pueden contener ácidos inorgánicos y/u orgánicos sólidos o sales ácidas, por ejemplo hidrogenosulfatos de metales alcalinos, ácido succínico, ácido adípico o ácido glutárico y mezclas de los mismos. Las sustancias ácidas de este tipo estarán presentes con preferencia en los detergentes según la invención en cantidades no superiores al 5% en peso y, de modo más especial, en cantidades del 0,1% en peso al 3% en peso.
- Los detergentes según la invención pueden contener adicionalmente otros ingredientes detergentes típicos. Estos ingredientes opcionales incluyen, en particular, agentes complejantes de metales pesados, por ejemplo ácidos aminopolicarboxílicos, ácidos aminohidroxipolicarboxílicos, ácidos polifosfónicos y/o ácidos aminopolifosfónicos, inhibidores de redeposición, por ejemplo éter de celulosa, inhibidores de la transferencia de colorantes, por ejemplo polivinilpirrolidonas, inhibidores de espumación, por ejemplo organopolisiloxanos o parafinas, disolventes y blanqueantes ópticos, por ejemplo derivados del ácido estilbenodisulfónico. Los detergentes según la invención contienen con preferencia hasta un 1% en peso y, de modo más especial, del 0,01% en peso al 0,5% en peso de blanqueantes ópticos, de modo más especial compuestos del grupo de los ácidos 4,4'-bis-(2,4,6-triamino-s-triazinil)-estilbeno-2,2'-disulfónicos sustituidos, hasta el 5% en peso y, de modo más especial, del 0,1% en peso al 2% en peso de agentes complejantes de metales pesados, de modo más especial ácidos aminoalquileno-fosfónicos y sales de los mismos, hasta el 3% en peso y, de modo más especial del 0,5% en peso al 2% en peso de inhibidores de

deposición y hasta el 2% en peso y, de modo más especial, del 0,1% en peso al 1% en peso de inhibidores de espumación, los porcentajes en peso mencionados son porcentajes referidos al peso total del detergente.

Además del agua, los disolventes empleados en particular en detergentes líquidos según la invención son con preferencia disolventes miscibles en agua, incluidos los alcoholes inferiores, por ejemplo etanol, propanol, isopropanol e isómeros del butanol, glicerina, glicoles inferiores, por ejemplo etilen- y propilenglicol, y los éteres derivados de los grupos de compuestos mencionados.

Los estabilizadores enzimáticos típicos, opcionalmente presentes, de modo muy especial en los detergentes líquidos de la invención, incluyen a los aminoalcoholes, por ejemplo mono-, di-, trietanolamina y -propanolamina y mezclas de las mismas, los ácidos carboxílicos inferiores, el ácido bórico o los boratos de metales alcalinos y las combinaciones de ácido bórico/ácido carboxílico.

Los inhibidores idóneos de espumación incluyen a los jabones de cadena larga, de modo más especial el jabón behénico, las amidas de ácidos grasos, las parafinas, ceras, ceras microcristalinas, organopolisiloxanos y mezclas de los mismos que, además pueden contener sílice microfina, opcionalmente silanizada o bien hidrofobizada de otro modo. Para el uso en detergentes divididos en partículas según la invención, los inhibidores de espumación de este tipo estarán depositados con preferencia sobre soportes granulados solubles en agua.

Además, el detergente según la invención puede contener inhibidores de redeposición. La función de los inhibidores de redeposición es mantener la suciedad separada de las fibras y suspendida en el líquido de lavado, impidiendo de este modo la decoloración de las fibras. Los inhibidores de redeposición idóneos son los coloides solubles en agua, por lo general orgánicos, por ejemplo las sales de ácidos carboxílicos poliméricos solubles en agua, la cola, la gelatina, las sales de ácidos éter-carboxílicos o ácidos éter-sulfónicos o el almidón o la celulosa o las sales de ésteres ácidos de ácido sulfúrico con celulosa o almidón. Las poliamidas solubles en agua que contienen grupos ácidos son también idóneas para este fin. Pueden utilizarse también las preparaciones de almidón solubles y otros productos de almidón, diferentes de los ya mencionados previamente, por ejemplo el almidón parcialmente hidrolizado.

Los agentes blanqueantes que pueden utilizarse como ingredientes adicionales de los detergentes según la invención son los compuestos "per" que se emplean generalmente en los detergentes, por ejemplo el perborato que puede estar presente en forma de tetrahidrato o monohidrato, percarbonato, perpirofosfato y persulfatos que por lo general pueden estar presentes en forma de sales de metales alcalinos, de modo más especial las sales sódicas. Agentes blanqueantes de este tipo están presentes con preferencia en detergentes según la invención en cantidades de hasta el 25% en peso, con mayor preferencia en cantidades de hasta el 15% en peso y con preferencia especial en cantidades del 5% en peso al 15% en peso, porcentajes referidos al peso total del detergente.

Los activadores de blanqueo presentes como componente opcional incluyen los compuestos N-acilo u O-acilo empleados habitualmente, por ejemplo las alquilenodiaminas poliacyladas, de modo más especial las tetraacetil-etilenodiamina, los glucolurilos acilados, de modo más especial el tetraacetil-glucolurilo, las hidantoínas N-aciladas, las hidrazidas, los triazoles, los urazoles, las dicetopiperazinas, las sulfurilamidas y los cianuratos, también los anhídridos de ácidos carboxílicos, de modo más especial el anhídrido ftálico, los ésteres de ácidos carboxílicos, de modo más especial isononanoil-fenol-sulfonato sódico, y los derivados acilados de azúcar, de modo más especial la pentaacetil-glucosa. Para evitar la interacción con los compuestos "per" durante el almacenaje, los activadores de blanqueo pueden recubrirse con sustancias formadoras de escudo o granuladas de modo ya conocido, son especialmente preferidas la tetraacetil-etilenodiamina granulada con carboximetilcelulosa con un tamaño medio de partícula de 0,01 mm a 0,8 mm, y/o la 1,5-diacetil-2,4-dioxohexahidro-1,3,5-triazina granulada. Los activadores de blanqueo están presentes con preferencia en los detergentes según la invención en cantidades de hasta el 8% en peso y de modo más especial en cantidades del 2% en peso al 6% en peso, porcentajes referidos al peso total del detergente.

Las enzimas opcionalmente presentes, además de la proteasa, incluyen, en particular, enzimas del grupo de las lipasas, cutinasas, amilasas, celulasas, pululanases, oxidasas y peroxidasas. Se emplean con preferencia enzimas obtenidas a partir de hongo o cepas bacterianas.

Las amilasas idóneas para el uso en los detergentes según la invención incluyen a las enzimas que pueden obtenerse a partir de bacterias u hongos que tengan un pH óptimo, con preferencia en el intervalo alcalino hasta pH 10. Los productos comerciales útiles son, por ejemplo, el TERMAMYL<sup>®</sup> y el MAXAMYL<sup>®</sup>. La amilasa se emplea con preferencia en el detergente según la invención en cantidades tales que el detergente final contenga de 0,01 KNU/g a 2 KNU/g ("Kilo Novo Units" por gramo, con arreglo al método estándar de la Novo Company, 1 KNU es la cantidad de enzima que degrada 5,26 kg de almidón a pH 5,6 / 37°C, tal como se determina por el método descrito en Methods in Enzymology, vol. 1, página 149, 1955), con preferencia de 0,015 KNU/g a 1,8 KNU/g y con mayor preferencia de 0,03 KNU/g a 1,6 KNU/g.

La celulasa idónea para el uso con arreglo la invención pertenece también al grupo de las enzimas que pueden obtenerse a partir de bacterias u hongos que tienen un pH óptimo con preferencia en el intervalo de pH casi neutro o ligeramente alcalino, comprendido entre 6 y 9,5. Se utilizan con preferencia en el detergente según la invención en cantidades tales que el detergente final tenga una actividad celulolítica de 0,05 IU/g a 1,5 IU/g ("International Units" por gramo, basada en la hidrólisis enzimática de la carboximetilcelulosa sódica a pH 9,0/40°C, con preferencia de 0,07 IU/g a 1,4 IU/g y con mayor preferencia de 0,1 IU/g a 1,3 IU/g. Los productos comerciales idóneos son, por ejemplo, la CELLUZYME<sup>®</sup>, un producto de Novo Nordisk, o el KAC<sup>®</sup>, un producto de Kao.

Las enzimas pueden absorberse de modo ya conocido sobre soportes, encapsularse en sustancias que forman escudo y/o granularse en combinación con las sustancias soporte para facilitar su manipulación y protegerlas contra la inactivación prematura, si tienen que incorporarse a detergentes divididos en partículas. Las enzimas opcionalmente presentes además de la proteasa estarán presentes con preferencia en los detergentes según la invención en cantidades de hasta el 2% en peso y con mayor preferencia en cantidades del 0,01 % en peso al 1,5% en peso, porcentajes referidos al peso total del detergente.

En una forma preferida de ejecución, un detergente según la invención está dividido en partículas y contiene del 20% en peso al 55% en peso de sustancias soportes (builders) inorgánicas, hasta el 15% en peso y de modo más especial del 2% en peso al 12% en peso de sustancias soportes orgánicas solubles en agua, del 2,5% en peso al 20% en peso de tensioactivos aniónicos sintéticos, del 1% en peso al 20% en peso de tensioactivos no iónicos, hasta el 25% en peso y, de modo más especial, del 1 % en peso al 15% en peso de un agente blanqueante, hasta el 8% en peso y, de modo más especial, del 0,5% en peso al 6% en peso de activador de blanqueo y hasta el 20% en peso y, de modo más especial, del 0,1% en peso al 15% en peso de sales inorgánicas, de modo más especial carbonatos y/o sulfatos de metales alcalinos, y hasta el 2% en peso y, de modo más especial, del 0,4% en peso al 1,2% en peso de enzimas divididas en partículas, aparte de la proteasa, de modo más especial la lipasa, cutinasa, amilasa, celulasa, pululanasa, oxidasa y/o peroxidasa.

En otra forma preferida de ejecución, un detergente de forma pulverulenta según la invención destinado en particular al uso de detergente suave (light-duty) contiene del 20% en peso al 55% en peso de sustancias soporte (builders) inorgánicas, hasta el 15% en peso y, de modo más especial, del 2% en peso al 12% en peso de sustancias soporte orgánicas solubles en agua, del 4% en peso al 24% en peso de tensioactivo no iónico, hasta un 15% en peso y, de modo más especial, del 1% en peso al 10% en peso de tensioactivos aniónicos sintéticos, hasta el 65% en peso y, de modo más especial, del 1% en peso al 30% en peso de sales inorgánicas, de modo más especial carbonato y/o sulfato de metales alcalinos, y no contiene agentes blanqueantes ni activadores de blanqueo.

Otra forma preferida de ejecución del detergente según la invención es un detergente líquido que contiene del 5% en peso al 35% en peso de sustancias soporte orgánicas solubles en agua, hasta un 15% en peso y, de modo más especial, del 0,1% en peso al 5% en peso de sustancias soporte inorgánicas solubles en agua, hasta el 15% en peso y, de modo más especial, del 0,5% en peso al 10% en peso de tensioactivo aniónico sintético, del 1 % en peso al 25% en peso de tensioactivo no iónico, hasta el 15% en peso y, de modo más especial, del 4% en peso al 12% en peso de jabón y hasta el 30% en peso y, de modo más especial, del 1% en peso al 25% en peso de agua y/o disolvente miscible en agua y también hasta el 10% en peso y, de modo más especial, del 0,01% en peso al 7,5% en peso de un sistema estabilizador de la enzima. La proteasa de cada una de las formas de ejecución preferidas anteriores es la variante F49 que tiene las sustituciones de aminoácidos S3T + V4I + A188P + V193M + V199I+ L211D.

Los detergentes divididos en partículas según la invención pueden producirse muy fácilmente mezclando las partículas individuales en un mezclador convencional, de modo más especial un mezclador de bombo (tambor), mezclador de rodillos, mezclador de cinta o mezclador de caída libre, incorporándose opcionalmente por atomización otros componentes opcionales en forma pulverulenta, en especial los tensioactivos no iónicos, pero también los colorantes y las fragancias. Los componentes capaces de soportar temperaturas elevadas se convierten con preferencia en un producto en forma pulverulenta de modo ya conocida mediante secado por atomización de la suspensión acuosa y el polvo obtenido se mezcla con la proteasa y, opcionalmente, otras sustancias enzimáticas y otros componentes sensibles al calor, incluidos en especial los agentes blanqueantes. También es posible la incorporación de los componentes individuales por mezclado en gránulos o en forma extruida que los contiene y es especialmente preferida la producción de detergentes según la invención con densidades aparentes elevadas, con preferencia de 650 g/l a 900 g/l. Los detergentes líquidos o de buena fluidez según la invención pueden producirse simplemente mezclando los ingredientes o los compuestos de los mismos, que pueden estar presentes en forma líquida o en forma de solución en agua o un disolvente determinado.

**Ejemplo 1**Identificación de los sitios de la BLAP para la mutagénesis

Se ensaya la eficacia de lavado de una gran variedad de subtilisinas naturales y otras proteasas de serina. Los resultados indican que la eficacia de lavado guarda relación con el número y distribución de los restos aminoácido cargados de la región de fijación al sustrato. Se ha observado una mejora de la eficacia de lavado cuando existe un número mayor de restos aminoácido cargados negativamente o cuando existe una disminución del número de restos aminoácido cargados positivamente en la región de fijación al sustrato. Por consiguiente, las mutantes de la BLAP aquí reivindicados tienen una carga neta positiva reducida en la región de fijación al sustrato y presentan una eficacia mejorada de lavado.

Se obtiene una mayor eficacia de lavado introduciendo alteraciones de aminoácido dentro de la bolsa de fijación al sustrato que se traducen en una variación de la carga. Se efectúan las alteraciones de aminoácidos que residen dentro de la bolsa de fijación al sustrato de la variante M130 de la BLAP o de la variante M131 de la BLAP. La bolsa de fijación al sustrato de estas enzimas se define como la región dentro de 7 Å de una molécula unida al sustrato, la AAPF. La AAPF unida a la enzima se modela sobre los datos cristalográficos de complejos de inhibidores de subtilisina que se han descrito en la bibliografía técnica y están disponibles en el banco de datos llamado Brookhaven Protein Data Bank. La estructura de las variantes M130 y M131 de la BLAP dentro de la bolsa de fijación al sustrato es esencialmente idéntica a la de la BLAP de tipo salvaje, según los datos de cristalografía de rayos X. La estructura de la BLAP de tipo salvaje con una resolución de 1,4 Å se ha publicado en la solicitud de patente que lleva el número de serie 07/706,691, depositada el 29 de mayo de 1991 y se constata que las coordenadas atómicas correspondientes, depositadas en el Brookhaven Protein Data Bank y en particular las alteraciones de aminoácidos de las posiciones 99, 154 y 211 dentro de las variantes M130 y M131 de la BLAP mejoran la eficacia de lavado de la enzima. Los aminoácidos originales que ocupan estos sitios, la arginina 99, la serina 154, y la leucina 211, se representan en la figura 1. Los tres aminoácidos están situados dentro del radio de 7Å especificado de la AAPF.

**Ejemplo 2**Construcción de genes mutantes del gen de la BLAPA. Construcción de las mutantes M130 y M131

Los genes, que expresan las proteasas mutantes de *B. lentus* DSM 5483 se obtienen alterando uno o dos codones del gen de la proteasa alcalina del *B. lentus* DSM 5483 de tipo salvaje. La proteasa M130 se deriva de la BLAP introduciendo las mutaciones S3T, A188P, V193M y V199I; la proteasa M131 se deriva de la BLAP introduciendo las mutaciones S3T, V4I, A188P, V193M, y V199I. Los genes que codifican a las proteasas M130 y M131 se construyen aplicando el procedimiento pMac (Stanssens, P., Opsomer, C., McKeown, Y.M., Kramer, W., Zabeau, M. y Fritz, H.-J., *Nucleic Acids Res.* **17**, 4441-4445, 1989). Las proteasas M130 y M131 se han descrito previamente en la solicitud de patente que lleva el número de serie 07/706,691, depositada el 29 de mayo de 1991. Las proteasas M130 y M131 poseen una mejor estabilidad térmica y a los tensioactivo que la BLAP de tipo salvaje y sirven como base de desarrollo de proteasas de mayor eficacia de lavado. Las técnicas genéticas aplicadas para modificar el gen de la BLAP para obtener las proteasas M130 y M131 se han descrito en la solicitud de patente WO 91/02792.

Las proteasas M130 y M131 se derivan de la proteasa alcalina del *B. lentus* DSM 5483 (BLAP) por mutagénesis específica de sitio del DNA que codifica a la forma madura de la BLAP de tipo salvaje. El fragmento de DNA que codifica a la forma madura de la BLAP de tipo salvaje se obtiene empleando el plásmido pCB13C. El plásmido pCB13C contiene un híbrido de fusión entre el gen de la proteasa del *B. licheniformis* ATCC 53926 el gen de la BLAP del *B. lentus* DSM 5483. Específicamente, este híbrido de fusión contiene el DNA que codifica al promotor, el sitio de fijación ribosómico y 21 restos de la pre-secuencia del gen de la proteasa del ATCC 53926 fusionados con una secuencia de DNA que codifica a los últimos cinco restos de la pre-secuencia de la BLAP y todos los restos de la BLAP "pro" y maduros. Esta fusión se denomina fusión del ClaI porque este sitio de restricción está situado en la unión entre los DNA del ATCC 53926 y del DSM 5483. Se tiene que introducir un nuevo sitio de restricción ClaI en el gen de la proteasa alcalina del ATCC 53926 junto a la unión de las secuencias "pre" y "pro". Se introduce el sitio ClaI en el gen de la proteasa alcalina del ATCC 53926 realizando una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar el fragmento del DNA que contiene la información de secuencia de la parte N-terminal del gen de la proteasa alcalina ATCC 53926. El fragmento amplificado incluye el promotor de la proteasa alcalina del ATCC 53926, el sitio de fijación ribosómico, el codón de inicio y la mayor parte de la pre-secuencia. La secuencia de DNA de este fragmento se representa en la figura 1. Este fragmento de DNA de 292 bp está flanqueado por los sitios de restricción Aval y ClaI en sus extremos 5' y 3', respectivamente. El gen BLAP ya contiene un sitio ClaI, de origen natural, en la posición correspondiente. El análisis de la secuencia de DNA a través de la fusión de los genes del ATCC 53926 y de la BLAP confirma el DNA y las secuencias de aminoácidos esperados.

Para efectuar la mutagénesis se subclona el gen de la BLAP en el vector de mutagénesis pMa5-8. Esto se realiza sintetizando un fragmento de DNA que contenga el gen de fusión del ClaI y el terminador de la transcripción del ATCC 53926 en forma de casete Sall, realizando una PCR. La PCR se efectúa aplicando las condiciones descritas por el fabricante (Perkin Elmer Cetus, Norwalk, CT). En la PCR se emplean como cebadores dos oligonucleótidos sintéticos que llevan sitios Sall y, como molde, el DNA del vector pCB13C de la *Escherichia coli*. Después de cortar el producto de la PCR con el Sall, el fragmento resultante se clona en el plásmido mutagénico pMc5-8, que se ha cortado previamente con el Sall y se ha desfosforilado con la fosfatasa alcalina bacteriana. Se obtienen los plásmidos pMc5-8 y pMa5-8 de H.-J. Fritz y se han descrito en Stanssens, P. y col., Nucleic Acids Res. 17, 4441-4454, 1989. Se eligen los sitios Sall para permitir la clonación del fragmento de la PCR en el pMc5-8 en ambas orientaciones. Se transforma la mezcla de ligación en la *E. coli* WK6. Se exploran los transformantes resistentes al cloranfenicol (Cm<sup>R</sup>) para determinar la presencia de un inserto y se identifica un constructo plásmido correcto pMc13C. Una vez se ha clonado el gen en el vector pMc5-8 y se han identificado los sitios deseados de mutación, se introducen la mutación o mutaciones empleando oligonucleótidos de DNA sintéticos con arreglo a una modificación de un método ya publicado (Stanssens, P. y col., Nucleic Acids Res. 17, 4441-4454, 1989). Se fusiona el oligonucleótido que se pretende introducir y que contiene la o las mutaciones con una estructura dúplex con brecha (gd, gapped duplex), que lleva el gen de la BLAP en un segmento de DNA de hebra simple (ss, single stranded). El dúplex con brecha puede formar por fusión del DNA ss lineal del pMc13C con el DNA desnaturalizado y restringido del pMa5-8. El plásmido pMa5-8 contiene un gen activo de resistencia a la ampicilina, pero tiene una mutación puntual inactivadora en el gen de resistencia al cloranfenicol, mientras que el plásmido pMc13C, además de un gen de BLAP intacto, contiene un gen activo de resistencia al cloranfenicol, pero tiene una mutación puntual inactivadora en el gen de resistencia a la ampicilina. El producto fusionado es un DNA gd, que es un heterodúplex de doble hebra con una brecha de DNA ss, que se extiende a lo largo del gen entero de la BLAP clonada. El oligonucleótido mutante es capaz de fusionarse con el DNA de la BLAP ss homólogo dentro de la brecha y el resto de la brecha se llena con la polimerasa I del DNA (fragmento de Klenow) y se liga empleando la DNA-ligasa T4 (New England Biolabs Inc., Beverly, MA [NEB]). La eficacia mutagénica de tal sistema puede mejorarse empleando la exonucleasa III (Exo III, NEB). La Exo III es una exodesoxirribonucleasa que digiere el DNA de doble hebra del extremo 3'. Dado que se requiere el extremo 3' libre, esta enzima no afecta al DNA ss circular cerrado ni al DNA ds. El posterior tratamiento del producto en una reacción de llenado (fill-in) con la Exo III elimina cualquier especie que tenga brechas rellenadas solo parcialmente. Esto mejora de modo significativo la eficacia mutagénica y es el método preferido de mutagénesis. El producto de la reacción de llenado (fill-in) se transforma después en una cepa de *E. coli* (WK6mutS) deficiente de reparación y se eligen los transformantes resistentes a la ampicilina (Ap<sup>R</sup>). La replicación del plásmido heterodúplex transformado da lugar a dos progenies diferentes. Una progenie contiene el gen de la BLAP de tipo salvaje y el gen intacto de resistencia al cloranfenicol, pero un gen inactivo de resistencia a la ampicilina. La segunda progenie contiene un gen de la BLAP que lleva la mutación de interés y es resistente a la ampicilina, pero no al cloranfenicol.

La selección de los transformantes mutantes Ap<sup>R</sup>, Cm<sup>S</sup> con ampicilina no es suficiente para parar un cierto crecimiento de fondo de la progenie de Ap<sup>R</sup>, Cm<sup>S</sup> que lleva el gen de la BLAP de tipo salvaje. Por consiguiente es necesario realizar una segunda transformación de la *E. coli* empleando un DNA plásmido preparado a partir de transformantes de Ap<sup>R</sup> de la cepa WK6mutS. Esta segunda transformación se realiza con una concentración baja de plásmido y un número elevado de células receptoras de una cepa de *E. coli* deficiente en supresor, por ejemplo la WK6. Esta estrategia disminuye la probabilidad de que una célula receptora reciba un DNA plásmido de las dos progenies. Se eligen los transformantes de Ap<sup>R</sup> y se aísla el DNA plásmido de varios transformantes, que se explora para detectar la presencia de la mutación. El mutante pMa derivado de la primera ronda de mutagénesis puede utilizarse para una segunda ronda de mutagénesis para preparar un DNA ss de esta especie y fusionarlo con el DNA de pMc5-8 restringido con XbaI/HindIII y desnaturalizado. El pMc5-8 plásmido es idéntico al pMa5-8 excepto en que contiene un gen activo de resistencia al cloranfenicol y un gen inactivo de resistencia a la ampicilina. El procedimiento general es el mismo que el descrito previamente. La construcción de los genes que codifican a las proteasas M130 y M131 requiere dos rondas de mutagénesis. En la primera ronda de la mutagénesis se diseña un oligonucleótido para introducir las mutaciones A188P, V193M y V199I. En una segunda ronda de mutagénesis se diseña un oligonucleótido para introducir la mutación S3T en el caso de la M130 y las mutaciones S3T y V4I en el caso de la M131. La presencia de estas mutaciones se verifica por secuenciación del DNA.

#### B. Construcción de genes que codifican a las nuevas proteasas con mayor eficacia de lavado.

Se introducen las mutaciones R99G, R99A, R99S, S154D, S154E y L211D en el gen que codifica a la proteasa M131 realizando una mutagénesis PCR por extensión de solapamiento. Se introduce la mutación R99S en el gen que codifica a la proteasa M130 realizando una mutagénesis PCR por extensión de solapamiento. Se emplea el constructo pCB76M131 para obtener las mutantes F43, F44, F45, F46, F47, y F49 (tabla 2). Se emplea el constructo pCB76M130 para sintetizar la mutante F11 y se emplea el constructo pCB76F49 (una mutante de nueva construcción) para obtener las mutantes F54 y F55.

Tabla 2

Descripción de las mutantes de la BLAP

	BLAP	enzima de tipo salvaje
	M130	S3T + A188P + V193M + V199I
	M131	S3T + V41 + A188P + V193M + V199I
5	F11	S3T + R99S + A188P + V193M + V199I
	F43	S3T + V41 + R99G + A188P + V193M + V199I
	F44	S3T + V41 + R99A + A188P + V193M + V199I
	F45	S3T + V41 + R99S + A188P + V193M + V199I
	F46	S3T + V41 + S154E + A188P + V193M + V199I
10	F47	S3T + V41 + S154D + A188P + V193M + V199I
	F49	S3T + V41 + A188P + V193M + V199I + L211D
	F54	S3T + V41 + R99G + A188P + V193M + V199I + L211D
	F55	S3T + V41 + S154E + A188P + V193M + V199I + L211D

15 Los materiales requeridos para llevar a cabo este procedimiento incluyen: un ciclador térmico de DNA (Perkin Elmer Cetus); un kit GeneAmp (Perkin Elmer Cetus); AmpliWax (Perkin Elmer Cetus); y tubos estériles de polipropileno de 0,5 ml (Perkin Elmer Cetus); concentradores Microcon-100 (Amicon, Beverly, MA); tampón TE (10 mM tris-(hidroximetil)aminometano [Tris], 1 mM sal disódica del ácido etilendiaminatetraacético (EDTA), ajustada a pH 8 con HCl 2 N); aparato de electroforesis Minigel (Hoefer Scientific, San Francisco, CA); gel de agarosa SeaKem al 1% (w/v) (FMC, Rockly, ME) en tampón TBE (0,089 M Tris, 0,089 M ácido bórico, 2 mM EDTA); 0,5 µg·ml<sup>-1</sup> de bromuro de etidio en agua; enzimas de restricción NheI (NEB), XbaI (NEB); y SstI (BRL, Gaithersburg, MD).

20 Las PCR se llevan a cabo empleando el kit GeneAmp y la AmpliWax siguiendo las instrucciones del fabricante. Se someten a un ciclo de desnaturalización (3 minutos, 95°C), fusión (2 minutos, 50°C) y extensión (2 minutos, 72°C) y 30 ciclos de desnaturalización (1 minuto, 94°C), fusión (1 minutos, 50°C) y extensión (1 minuto, 72°C) empleando un ciclador térmico de DNA. Cada ciclo se prolonga durante 10 s a 72°C.

25 La mutagénesis dirigida a sitio con extensión de solapamiento se ha descrito en Ho, S.N., Hunt, H.D., Horton, R.M., Pullen, J.K., y Pease, L.R., *Gene* **77**, 51-59, 1989). En el caso de las mutantes F43, F44, F45, F46, F47 y F49 de la BLAP se emplean 10 ng del DNA plásmido pCB76M131 como molde de la ronda inicial de la mutagénesis. Para la mutante F11 de la BLAP se emplean 10 ng del DNA plásmido pCB76M130 como molde y para las mutantes F54 y F55 de la BLAP se emplean ng del DNA pCB76F49 como molde. Las formas pUB110 de estos plásmidos se eligen porque proporcionan mayores rendimientos de proteasa en el hospedante *B. subtilis* DB104 que las formas pBC16 de los plásmidos. Los fragmentos de la PCR se analizan por electroforesis a través de gel de agarosa y se limpian en un concentrador Microcon-100 (Amicon) después de cada ronda de PCR. Después de la segunda ronda de PCR se digieren los fragmentos con NheI/XbaI o con NheI/SstI (en función de la ubicación de la mutación perseguida) y se vuelven a clonar en el DNA pCB76M131 en el caso de las mutantes F43, F44, F45, F46, F47 y F49, el DNA de pCB76M130 en el caso de la mutante F11 y pCB76F49 en el caso de las mutantes F54 y F55 empleando células competentes de *B. subtilis* DB104 tal como se ha descrito previamente. El aislamiento del DNA plásmido se realiza empleando microcolumnas de intercambio iónico (QIAGEN, Inc., Chatsworth, CA) y se analizan las mutaciones por secuenciación Sanger del DNA ds del modo descrito previamente.

**Ejemplo 3**40 Clonación de genes de proteasa mutanteA. Clonación de proteasas mutantes producidas mediante el sistema pMac.

45 Las proteasas M130 y M131 pueden producirse transfiriendo el gen correspondiente que codifica a la M130 o a la M131 del vector concreto, derivado de la *E. coli* pMc13C, a un vector plásmido que pueda replicarlo en el bacilo. Para conseguirlo, se separa el gen mutante deseado del plásmido pMc13C apropiado por digestión con las endonucleasas de restricción Aval y SstI y posterior ligación al fragmento mayor de Aval/SstI del plásmido pH70 o del plásmido pC51. Estos fragmentos Aval/SstI de los pH70 y pC51 incluyen las secuencias de DNA necesarias para la replicación en el bacilo y codifican la resistencia a la canamicina (KmR) y la resistencia a la tetraciclina (TcR), respectivamente. Se construye el pH70 plásmido clonando el gen de la proteasa alcalina ATCC 53926 situado sobre el fragmento de DNA de EcoRI/BamHI en el pUB110 plásmido KmR entre los sitios EcoRI y BamHI. Se construye el pC51 plásmido clonando el gen de la proteasa ATCC 53926 situado sobre un fragmento de EcoRI/BamHI en el pBC16 plásmido TcR entre los sitios EcoRI y BamHI. En primer lugar se purifica el fragmento mayor de Aval/SstI del pH70 o del pC51 empleado para clonar el fragmento de DNA que codifica la M130 o la M131 de otros fragmentos de DNA plásmido por cromatografía de líquidos de alta presión (alta eficacia, HPLC), en una columna de intercambio aniónico (Gen-Pak FAX, diámetro: 4,6 mm, longitud: 100 mm; Waters, Milford, MA). Las condiciones de elución del

DNA son: un caudal de  $0,75 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$  y un gradiente del 50% de tampón A (25 mM Tris, que contiene 1 mM EDTA y se ajusta a pH 8,0 con HCl 2 N) y 50% de tampón B (25 mM Tris, que contiene 1 mM EDTA, 1 M NaCl y se ajusta a pH 8,0 con HCl 2 N) al 30% de tampón A y 70% de tampón B en 30 min.

Se transforman los dos DNA ligados en el *B. subtilis* DB104. Se han inactivado los genes que codifican a las principales proteasas alcalinas y neutras de esta cepa (Kawamura, F. y Doi, R.A., J. Bacteriol. 160, 442-444, 1984). Se cultivan las células del *B. subtilis* DB104 transformadas con estos plásmidos en un nutriente de agar y leche desnatada, en presencia de canamicina o de tetraciclina. Se identifican los transformantes del DB104 que fabrican la proteasa mutante por formación de zonas transparentes de hidrólisis en la leche desnatada. La confirmación de que los transformantes, que producen proteasa llevan un gen M130 o M131 intrínseco del plásmido con la o las mutaciones deseadas, se realiza purificando el DNA plásmido en un cultivo de cada transformante. El DNA plásmido se purifica y se separa del DNA de la proteína celular y del DNA cromosómico por precipitación SDS-sal y posterior cromatografía en una columna QIAGEN de intercambio iónico (QIAGEN, Inc., Chatsworth, CA). Los DNA plásmidos de diferentes transformantes, digeridos con Aval/SstI, se comparan con los derivados de los plásmidos conocidos pH70 o pC51, digeridos con Aval/SstI, de los que se sabe que llevan el gen de la BLAP intacto. Los productos de digestión por restricción de estos plásmidos se comparan por electroforesis a través de gel de agarosa para identificar los plásmidos que tienen los fragmentos de DNA Aval/SstI de tamaño apropiado. Después se secuencian los DNA plásmidos seleccionados a lo largo de la región que tiene las mutaciones esperadas de M130 y M131 para confirmar que está o están presentes las mutaciones deseadas. Los genes M130 y M131 clonados en el derivado del pC51 plásmido (TcR) se denominan plásmidos pCB56M130 y pCB56M131, respectivamente, mientras que los mismos genes clonados en un derivado de pH70 plásmido se denominan plásmidos pCB76M130 y pCB76M131, respectivamente. Uno o más clones de cada mutación de la BLAP se congelan y se almacenan al 15% en glicerina a  $-70^{\circ}\text{C}$  o bien se cultivan en matraces agitables para producir la proteasa mutante con vistas a la caracterización.

#### B. Clonación de proteasas mutantes producidas por el método de la PCR de solapamiento

Tal como se ha descrito antes, se clonan de nuevo los fragmentos amplificados por PCR en los plásmidos pCB76M130, pCB76M131 o pCB76F49. Para la expresión en la cepa de producción del *B. licheniformis* se clona de nuevo el fragmento Aval/SstI que lleva los genes modificados de la M130, M131 o F49 en el vector de tipo pC51 del modo descrito previamente.

#### Ejemplo 4

##### 30 Producción de proteasas mutantes

La proteína BLAP de tipo salvaje y las proteínas mutantes se producen en el *Bacillus subtilis* DB104 transformado en matraces agitables. Se emplea una recirculación de calentamiento (hot loop) para descongelar cada cepa mutante de un cultivo en criovial congelado y aplicarla sobre un medio LB-agar de leche desnatada, ya sea con  $20 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de canamicina, ya sea con  $15 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de tetraciclina. Se incuban las placas a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 20 - 24 horas. Se trasvasa una sola colonia aislada, que produce una buena zona de hidrólisis en la leche desnatada, a un matraz erlenmeyer de 250 ml que contiene 50 ml de caldo Luria (LB), que contiene  $20 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de canamicina o  $15 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de tetraciclina. Se incuban el caldo en un agitador-incubador de tipo New Brunswick serie 25 a  $37^{\circ}\text{C}$  con agitación, a 280 rpm, durante 7 - 8 horas. Se trasvasan 2,5 ml del precultivo turbio a 50 ml de MLBSP que contienen  $20 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de canamicina o  $15 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de tetraciclina en cada uno de los cuatro matraces de 500 ml provistos de desviador; o bien se emplean 5 ml de precultivo como inóculo para 100 ml del caldo MLBSP con antibiótico dispuesto en cada uno de los dos matraces de 500 ml provistos de desviador (al 5%, v/v, transferencia). Se incuban todos los matraces a 240 rpm y  $37^{\circ}\text{C}$  durante 64 horas. Pasadas las 64 horas de incubación se consolida el contenido de un grupo de matraces para cada cultivo, se transfiere a tubos de centrifuga de 50 ml y se centrifuga a  $20.000 \times g_{av}$  durante 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Se filtra el caldo a través de un Miracloth (Calbiochem Corp., nº 475855) y se recoge en vasos de precipitados de 400 ml situados sobre hielo. Se ajusta el pH de la solución a 5,8 por adición de ácido acético glacial. Después de agitar durante 30 minutos se separan los residuos finos por centrifugación a  $20.000 \times g_{av}$  durante 15 minutos. Se anota el volumen que tiene el líquido sobrenadante. Se apartan partes alícuotas de 1 ml con vista al análisis y la desnaturalización por electroforesis a través de gel de poliacrilamida (PhastSystem, Pharmacia), para la determinación de la actividad proteolítica total por el método HPE y para la valoración de sitios activos. Se almacena el caldo sobre hielo hasta que el momento de purificar la proteasa. Para un almacenaje a largo plazo o para el envío se mezcla el caldo con un volumen igual de propano-1,2-diol. La composición del medio MLBSP empleado para la producción de la BLAP en cultivos en matraz agitable se describe en la tabla 3.

Tabla 3

Composición del medio MLBSP<sup>1</sup>

55	Componente	Cantidad (para 1 litro de medio)
----	------------	----------------------------------

	agua desionizada	750 ml
	Casitone Difco	10 g
	Tryptone Difco	20 g
	extracto de levadura Difco	10 g
5	NaCl	5 g
	succinato sódico	27 g

<sup>1</sup> Se ajusta el pH del medio a 7,2 con NaOH 2 N, el volumen se ajusta a 815 ml añadiendo agua y se mantiene la solución en un autoclave a 121°C durante 15 minutos con una presión de 15 libras por pulgada cuadrada. Después de enfriar se añaden con agitación las soluciones patrón estériles, descritas en el apéndice 1. Se añaden al medio las soluciones patrón de la canamicina o de la tetraciclina inmediatamente antes del uso, con una concentración final de 20 µg·ml<sup>-1</sup> y 15 µg·ml<sup>-1</sup>, respectivamente.

#### Apéndice 1

(Ingredientes que se añaden al caldo MLBSP)

Componente	Cantidad (por 1 litro de medio)	
15	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (100 mg·ml <sup>-1</sup> patrón)	10 ml
	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O (30 mg·ml <sup>-1</sup> patrón)	2,5 ml
	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (1 mM patrón)	0,5 ml
	MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O (1 mM patrón)	0,5 ml
	glucosa (25% (p/v) patrón)	80,0 ml
20	tampón PIPES <sup>1</sup> (pH 7,2, 1 M patrón)	50,0 ml
	tampón fosfato <sup>2</sup> (pH 7,0, 1,5 M patrón)	50,0 ml

<sup>1</sup> ácido piperazina-N,N'-bis(2-etenosulfónico).

<sup>2</sup> Se añade una cantidad suficiente de fosfato dibásico 1,5 M (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) a 200 ml de fosfato monobásico 1,5 M (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) para ajustar el pH a 6,0 empleando un pH-metro (Beckman, modelo pH144) equipado con un electrodo de combinación (Beckman, modelo n° 3952C). El pH final se ajusta a 7,0 con KOH 4 M. Todas las soluciones patrón se mantienen en el autoclave a 121°C, con una presión de 15 psi durante 15 min, excepto el FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O que se filtra en condiciones estériles empleando un sistema de filtro de 0,22 µm (Coster 8301).

#### Ejemplo 5

##### Purificación de la BLAP y sus proteínas mutantes

30 Si no se indica otra cosa, todos los pasos posteriores se realiza sobre hielo o a 4°C. Las dos muestras obtenidas en el ejemplo 3 se filtran a través de un filtro de 0,2 µm y se concentra el líquido filtrado por ultrafiltración. La membrana de retención tiene un valor de corte nominal de peso molecular de 10.000 y está montada en un casete Minitan (Millipore) o en una celdilla de ultrafiltración (Amicon). Para el envío ulterior o para un almacenaje prolongado se mezclan las soluciones del caldo con un volumen igual de propano-1,2-diol para estabilizar la proteasa. En los

35 demás casos se dializa el concentrado durante 16 horas frente a un tampón fosfato sódico 20 mM de pH 7,0 ("tampón fosfato") o frente al ácido N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-(2-etanosulfónico) 20 mM (HEPES), que contiene CaCl<sub>2</sub> 1 mM y se ajusta a pH 7,8 con NaOH ("tampón HEPES"). Se clarifica el líquido dializado por centrifugación (20.000 x g<sub>av</sub> durante 10 minutos) y si fuera necesario se ajusta de nuevo el pH de la solución. Se dializan las

40 muestras frente a un tampón fosfato y se equilibran durante 15 minutos con DEAE-celulosa del 5% (p/v), equilibrada previamente con el mismo tampón para capturar las proteínas cargadas negativamente. Después de separar la DEAE-celulosa por centrifugación o filtración se introduce el líquido sobrenadante en una columna de intercambio catiónico (S-Sepharose Fast Flow, Pharmacia; diámetro: 16 mm, longitud: 90 mm, volumen de lecho: 18 ml, caudal: 50 ml·h<sup>-1</sup>), equilibrada previamente con tampón fosfato. Se dializan las muestras frente al tampón HEPES y se aplican directamente a una columna de intercambio catiónico (S-Sepharose Fast Flow, Pharmacia; diámetro: 15 mm,

45 longitud: 75 mm, volumen de lecho: 13 ml, caudal: 50 ml·h<sup>-1</sup>), equilibrada previamente con tampón HEPES. Una vez eluidos todos los productos secundarios coloreados, se lava la columna con 3-5 volúmenes de columna de tampón de aplicación. Se eluye la proteasa del intercambiador catiónico incluyendo NaCl 1,0 M en el tampón fosfato o NaCl 0,25 M en el tampón HEPES. Se reúnen las fracciones que contienen la enzima activa.

50 Se concentra la enzima purificada en tampón fosfato y se desaliniza por ultrafiltración empleando tubos Centricon (corte de peso molecular: 10.000; Amicon). Se determina la concentración de proteína por el método del ácido bicinoníico (método BCA, Pierce Chemical Co., Rockford, IL). Para estabilizar la proteasa se añade propano-1,2-diol del 50% (v/v) a la solución patrón.



Se reúnen las fracciones que tienen la enzima purificada en tampón HEPES y se mezclan con un volumen 5 - 8 veces mayor de acetona a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Se deja que la proteína precipite durante 4 minutos y se centrifuga la mezcla a  $6.600 \times g_{av}$  durante 4 minutos. Se descarta el líquido sobrenadante, se somete el culote brevemente al vacío (aspirador de agua) para eliminar la mayor parte de la acetona y se disuelve el culote en ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico 20 mM (MES), que contiene 1 mM  $\text{CaCl}_2$  y se ajusta el pH a 5,8 con NaOH 2 N, obteniéndose una concentración aproximada de proteína de  $30 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Se clarifica la solución por centrifugación en una centrífuga Eppendorf durante 3 minutos a la velocidad máxima ( $13.000 \times g_{max}$ ), se congela y se almacena hasta el momento del uso. Se determina la concentración de proteína por el método del biuret (Gornall, A.G., Bardawill, C.S. y David, M.M., J. Biol. Chem. 177, 751-766, 1948).

## 10 Ejemplo 6

### Determinación de la proteasa activa

Se determina la concentración de enzima activa por valoración del sitio activo con el inhibidor fluoruro de fenilmetil-sulfonilo. Se prepara una solución de proteasa en fosfato sódico 10 mM, pH 6,5, en una concentración aproximada de  $100 \mu\text{M}$ , referida a la determinación de la proteína. Las concentraciones de inhibidor son equivalentes a la proporción molar estimada de 0,25, 0,5, 0,75, 1,0 y 1,25. Se hacen reaccionar las mezclas a temperatura ambiente durante una hora. Se determina la actividad enzimática residual por espectrofotometría, por el método AAPF-PNA (ver más abajo).

## Ejemplo 7

### Determinación de la actividad proteolítica

20 Se llevan a cabo dos ensayos diferentes de la proteasa. Con el método HPE se establece una actividad de proteasa para una sola concentración de caseína como sustrato. En el método AAPF-pNA se emplean las proporciones iniciales de la catálisis soportada en succinil-L-alanil-L-alanil-L-alanil-L-fenilalanil-p-nitroanilida (AAPF-pNA; Bachem Bioscience, Philadelphia, PA) para determinar los parámetros cinéticos  $K_m$ ,  $k_{cat}$  y  $k_{cat}/K_m$ .

#### A. Ensayo de la proteasa por el método HPE

25 Se determina la actividad proteolítica por un ensayo discontinuo que emplea como sustrato la caseína. Las concentraciones finales de la solución de sustrato se sitúan en  $12 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  de caseína (preparada con arreglo a Hammarsten; Merck, Darmstadt, n° 2242) y 30 mM Tris en agua de grifo sintética. El agua de grifo sintética es una solución del 0,029% (p/v) de  $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,014% (p/v) de  $\text{MgCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , y 0,021% (p/v) de  $\text{NaHCO}_3$  que tiene una dureza de  $15^{\circ}\text{dH}$  (grados de dureza alemana). Se calienta la solución de sustrato a  $70^{\circ}\text{C}$  y se ajusta el pH a 8,5 a  $50^{\circ}\text{C}$  añadiendo NaOH 0,1 N. Se prepara la solución de proteasa con un 2% (p/v) de tripolifosfato pentasódico anhidro en agua de grifo sintética y se ajusta a pH 8,5 con ácido clorhídrico. A  $600 \mu\text{l}$  de la solución de sustrato de caseína se le añaden  $200 \mu\text{l}$  de la solución de enzima. Se incuba la mezcla a  $50^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos. Se termina la reacción por adición de  $600 \mu\text{l}$  de ácido tricloroacético 0,44 M (TCA), acetato sódico 0,22 M al 3% (v/v) en ácido acético glacial. Se enfría con hielo durante 15 minutos, se separa por centrifugación la proteína insoluble en el TCA, se mezcla una parte alícuota de  $900 \mu\text{l}$  con  $300 \mu\text{l}$  de NaOH 2N y se registra la absorbancia a 290 nm de esta mezcla que contiene los péptidos solubles en TCA. Los valores de control se obtienen añadiendo  $600 \mu\text{l}$  de solución de TCA a  $600 \mu\text{l}$  de solución de caseína y después  $200 \mu\text{l}$  de la solución de la enzima.

Se conviene que una solución de proteasa que las condiciones de este ensayo produzca un cambio de absorbancia de 0,500 OD a 290 nm tiene una actividad de 10 HPE por ml. Los datos de la BLAP y de las proteínas mutantes de la BLAP se recogen a continuación (tabla 4).

#### B. Ensayo de la proteasa con el sustrato cromogénico de AAPF-pNA

Se diluyen las muestras de proteasa con 1,2-propanodiol al 50% (v/v) en Tris 100 mM, ajustado con HCl 2 N a pH 8,6 a  $25^{\circ}\text{C}$  ("tampón Tris-propanodiol"), en el que son estables por lo menos durante 6 h a temperatura ambiente. Se prepara una solución patrón de AAPF-pNA 160 mM en sulfóxido de dimetilo, que se seca con esferillas de tamices moleculares (Aldrich; 4 A, malla: 4-8) por lo menos durante 24 h antes del uso. Se realizan los ensayos de punto fijo a  $25^{\circ}\text{C}$  con AAPF-pNA 1,6 mM en Tris 100 mM, se ajustan con HCl 2 N a pH 8,6 a  $25^{\circ}\text{C}$ , en un volumen total de 1,020 ml. Se añade el sustrato al tampón de ensayo 1 minuto antes de iniciar el ensayo y se inicia la reacción por adición de la enzima en una concentración final de 20 ng a  $1,3 \mu\text{g}$  de proteína por ml (enzima de 0,75 a 48,5 nM) en función de la actividad específica. Se hace el seguimiento de la liberación de la p-nitroanilida a 410 nm y se emplea el coeficiente de extinción de  $8,480 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  para calcular la cantidad y la concentración del producto formado (DelMar, P.E.J., Largman, C., Brodrick, J.W. y Geokas, M.C., Anal. Biochem. 99, 316-320, 1979).

- Se calculan los parámetros cinéticos a partir de la gráfica de la velocidad frente a la concentración de sustrato que se construye a partir de los valores iniciales de velocidad, una vez para cada una de las 12 concentraciones diferentes de la AAPF-pNA que se sitúan entre 0,16 y 3,2 mM. Se ajustan los datos a una curva hiperbólica y se ponderan de modo proporcional empleando el programa informático ENZFITTER (Leatherbarrow, R.J. (1987); ENZFITTER Biosoft, Cambridge, UK). Se emplea un peso molecular nominal de 26,8 kDa para todos los cálculos que requieren la interconversión de la concentración de proteína y la molaridad de la enzima proteasa (tabla 4).

Tabla 4

Datos cinéticos de la BLAP y de las proteasas mutantes de la BLAP

10	nombre de proteasa	actividad específica (HPE·mg <sup>-1</sup> )	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	$K_m$ (mM)	$k_{cat} \cdot K_m^{-1}$ (s <sup>-1</sup> ·mM <sup>-1</sup> )
	BLAP	4000	312	1,05	297
	M131	3670	153	0,98	156
	F11	3760	174	1,88	92
	F43	3780	171	1,73	99
15	F44	3750	257	2,49	103
	F45	3710	208	3,05	68
	F46	3180	358	2,0	179
	F47	3610	249	2,0	124
	F49	4610	38	3,5	11
20	F54	2510	7	5,5	1,3
	F55	3200	11	4,3	2,6

### Ejemplo 8

#### Verificación de la estructura de las proteínas

- Las mutaciones introducidas en la BLAP se verifican por análisis de la secuencia de DNA a lo largo de las posiciones inmediatamente contiguas al punto de la mutación. Sin embargo, ya se sabe que ocurren mutaciones espontáneas fuera de la región de la mutagénesis dirigida a sitio y es imprescindible establecer que la propiedad determinante de una proteasa mutante reside obviamente en la secuencia de aminoácidos deducida de la secuencia de nucleótidos. Por lo tanto se produce un mapa triptico de la BLAP que se verifica por el análisis de la secuencia de aminoácidos de los picos individuales y todas las proteínas mutantes de la BLAP se comparan con este mapa. No solo en los péptidos que tienen  $\leq 17$  restos aminoácido, sino también en los péptidos 5T, 7T y 10T que tienen 48, 44, y 49 restos aminoácido, una sola sustitución (incluso conservadora) provoca un cambio significativo en el tiempo de retención en las condiciones aplicadas para la separación. Los casos más parecidos se resuelven por co-digestión de cantidades iguales de la proteína de referencia (BLAP) y la mutante.

- En un tubo Eppendorf de 2,2 ml se coloca sobre hielo una parte alícuota de hasta 5 mg de proteasa de una solución patrón, se mezcla con 1,0 ml de HCl 0,15 N y agua (los dos fríos), resultando una concentración final 3,33 mg·ml<sup>-1</sup> de proteína y HCl 0,1 N en un volumen total de 1,5 ml. Se incuba la mezcla durante 30 minutos, se precipita la proteína por adición de 165  $\mu$ l de ácido tricloroacético del 50% (p/v) (TCA) enfriado. Se deja el precipitado en reposo sobre hielo durante 5 minutos y se centrifuga durante 4 minutos a 13,000 x g<sub>max</sub> (centrífuga Eppendorf) formando un culote. Se lava el culote una vez con 1 ml de acetona del 80% (v/v) y se seca brevemente con vacío.

- Todas las soluciones de reactivos y de agua que se requieren para digestión triptica se pasan por un filtro de 0,45  $\mu$ m (Ultrafree-MC, Millipore Products) antes de utilizarse. Se disuelve el culote de la proteína desnaturalizada (5 mg; 185 nmoles) en 90  $\mu$ l de bicarbonato amónico 0,8 M, que contiene urea 8 M. Se diluye lentamente esta solución con 360  $\mu$ l de agua y se pasa por centrifugación a través de un filtro de 0,45  $\mu$ m. Se realizan los pasos posteriores en microtubos siliconados de 0,5 ml (Phenix Res. Products). Se mezcla una parte alícuota de 300  $\mu$ l con 13  $\mu$ l de 2,5 mg·ml<sup>-1</sup> de tripsina en HCl 1 mM (proporción ponderal entre la BLAP y la tripsina = 100:1). Para el control se mezclan 100  $\mu$ l de la solución de proteína con 4,5  $\mu$ l de HCl 1 mM. Se mezcla la parte alícuota restante de 50  $\mu$ l de la solución de proteína con 5  $\mu$ l de ácido trifluoroacético del 10% (v/v) (TFA) y se emplea como control del material de partida. Se incuban las dos soluciones restantes a 37°C durante 10 minutos. Se terminan las reacciones añadiendo 30  $\mu$ l y 10  $\mu$ l de TFA del 10% (v/v) al producto digerido y al control, respectivamente. Se separa la mezcla de péptidos por HPLC en fase inversa. El equipo de la HPLC es de Waters y está formado por una máquina de introducción automática de muestras (autosampler) (modelo 715 Ultra Wisp), un sistema de bomba dual (modelo 600E) y un detector de matriz de diodos (modelo 990). La introducción de muestras y la formación del gradiente se controlan con el programa informático de Waters llamado "990+ Powerline". Se separan los péptidos tripticos en una columna C<sub>18</sub> (Vydac, modelo 218TP54; 4,6 x 250 mm; tamaño de partícula: 5  $\mu$ m; tamaño de poro: 300 Å). En línea con la columna de separación se dispone de la columna de guarda C<sub>18</sub> (Vydac, modelo 21BFSK104, tamaño de

partícula: 10  $\mu\text{m}$ ). La columna de separación y la columna de guarda están alojadas en el horno que calienta las columnas, cuya temperatura es de  $30\pm 1^\circ\text{C}$ . El sistema de disolvente que se emplea es: disolvente A = TFA al 0,1% (v/v) en agua; disolvente B = TFA al 0,08% (v/v) en acetonitrilo. Una vez introducidas las muestras se eluye la columna  $C_{18}$  durante 3 minutos con el disolvente A y después con un gradiente del 0 al 35% (v/v) del disolvente B en el disolvente A durante 70 minutos. Pasados 70 minutos se aumenta el gradiente al 100% de disolvente B en 15 minutos y después se vuelve al 100% de disolvente A en 15 minutos. Antes de proceder a la siguiente inyección, se equilibra la columna por lo menos durante 20 minutos con el disolvente A.

Se registran los cambios de absorbancia a 215 nm y a 280 nm. Las cantidades de las mezclas de péptidos separadas para fines analíticos y preparativos se sitúan entre 11  $\mu\text{g}$  (0,4 nmoles) y 500  $\mu\text{g}$  (18 nmoles) en un volumen de 5 a 50  $\mu\text{l}$  en concentraciones de 2,2 a 10  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ .

Para secuenciar los péptidos se fracciona manualmente el material eluido con arreglo a los cambios de absorbancia observados en el aparato de registro conectado. Los estudios previos con el  $\beta$ -mercaptoetanol indican que el tiempo transcurrido entre el tiempo de grabación y el tiempo de elución del sistema es inferior a 2 segundos. Se concentran las fracciones con vacío en un aparato concentrador de tipo Speed Vac Concentrator (Savant, Hicksville, NY) hasta un volumen inferior a 100  $\mu\text{l}$  y se ajustan a 100  $\mu\text{l}$  por adición de TFA acuoso hasta lograr una concentración final de TFA del 1 %. Hay que prestar atención a que las muestras no alcancen la sequedad completa cuando se están concentrando.

### **Ejemplo 9**

#### Caracterización de proteasas por su estabilidad a los tensioactivos

La estabilidad de las mutantes de proteasa a los tensioactivos se ensaya empleando el SDS como detergente aniónico típico. Se ensaya la estabilidad con carbonato sódico 50 mM, pH 10,5 a  $50^\circ\text{C}$ , que contiene un 1 % (p/v) de SDS. Se incuban las proteínas de proteasa en una concentración final de 0,25  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Periódicamente se saca una muestra, una parte alícuota de la mezcla de incubación, y se diluye en tampón Tris-propanodiol enfriado con hielo. La actividad residual de proteasa se determina mediante un ensayo AAPF-pNA con una concentración de sustrato de 1,1 mM. La estabilidad se expresa como vida media ( $t_{1/2}$ ) de la actividad determinada a partir de gráficas semilogarítmicas de la actividad residual en función del tiempo.

### **Ejemplo 10**

#### Eficacia de lavado de las mutantes de proteasa

Se ensaya la eficacia de lavado en un ensayo diseñado especialmente para lavar retales de algodón manchados con huevo y hollín (ER) o con sangre, leche y hollín (BMR). Los ensayos de lavado se realizan en un aparato llamado Atlas launderometer (tipo LP 2), equipado con recipientes de acero inoxidable que contienen una composición definida de detergente más la proteasa a ensayar.

El algodón, lavado previamente, se ensucia con una cantidad definida de suciedad y se seca en el aire durante 6 días. Los vasos de precipitados del aparato de lavado (launderometer) se llenan con 1 retal de algodón sucio y 3 retales de algodón limpio. Se añaden diez bolas metálicas (de 10 mm de diámetro) para realizar el tratamiento mecánico. El tiempo de lavado es de 30 minutos y la temperatura final de  $30^\circ\text{C}$  se alcanza después de 4 minutos de calentamiento.

Los detergentes de lavado para estos ensayos tienen la composición típica de uso en Europa (Jakobi, G. y Löhr, A., Detergents and Textile Washing, VCH, Weinheim, Alemania, 1987). Las concentraciones del detergente para materiales textiles delicados, destinado a tejidos de fácil mantenimiento y de color (5-15% (p/p) de tensioactivos aniónicos, 1-5% (p/p) de tensioactivos no iónicos), un detergente compacto de acción intensa (8% (p/p) de tensioactivos aniónicos, 6% (p/p) de tensioactivos no iónicos, con tetraacetiltilenodiamina (TAED) y blanqueo de perborato) y un detergente concentrado supercompacto (18% (p/p) de tensioactivos aniónicos, 2,5% (p/p) de tensioactivos no iónicos, con TAED y blanqueo de perborato) son de: 0,5 g, 0,5 g y 0,4 g, respectivamente, en 100 ml de agua de  $16^\circ\text{dH}$  (grados de dureza alemana). El detergente supercompacto es un granulado detergente extruido, descrito en un gran número de solicitudes de patentes (WO 91/02047, WO 91/13678, WO 93/02176, WO 93/15180, WO 94/01526). El pH es de 10,4 en todos los casos. Se añade una proteasa a las soluciones de lavado en función de su actividad enzimática medida en HPE, en una proporción de 0, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 700 y 1000 HPE por gramo de detergente.

Después del lavado se enjuaga el tejido con agua del grifo, se seca con aire y se plancha. Se determina el efecto enzimático sobre el lavado por el cambio ( $\Delta\text{Rem}$ ) de la remisión (%Rem) a 440 nm (400-500 nm) medida con un instrumento de medición de diferencias de color del Dr. Lange (Micro Color). La  $\Delta\text{Rem}$  es la diferencia de la remisión

después del lavado con la adición de la proteasa y la remisión después del lavado sin añadir proteasa. Los resultados de los ensayos de eficacia de lavado se recogen en las tablas 5 y 6.

- 5 La mejora de la eficacia de lavado se determina por la proporción entre la enzima de tipo salvaje que se necesita para lograr una  $\Delta$ Rem estándar frente a la cantidad de la enzima mutante que se requiere para obtener un efecto idéntico. Por tanto, una mejora de 2 indica que la mitad de la enzima mutante consigue el mismo efecto que la enzima de tipo salvaje.

**Tabla 5**

Efecto de lavado de las proteínas BLAP y mutante de BLAP en manchas de sangre-leche-hollín

Enzima	Detergente		
	A <sup>1</sup> relación de mejora <sup>2</sup>	B relación de mejora	C relación de mejora
BLAP	1	1	1
M131	1	1	1
F43	2,8	1,8	0,7
15 F44	2,0	1,8	<0,7
F45	2,6	1,1	<0,7
F46	2,9	1,9	1
F47	1,5	1,8	0,8
F49	1,8	1	2,5

- 20 <sup>1</sup> El detergente A es un detergente compacto intenso, el detergente B es un detergente supercompacto intenso y el detergente C es un detergente para tejidos delicados.  
<sup>2</sup> Sobre la definición véase el texto.

**Tabla 6**

Efecto de lavado de las proteínas BLAP y mutantes de BLAP en las manchas de huevo-hollín

Enzima	Detergente	
	Detergente compacto intenso relación de mejora <sup>1</sup>	Detergente supercompacto intenso relación de mejora
BLAP	1	1
M131	1	1
30 F46	1,5	1
F47	1	1
F49	4,0	1,7

- <sup>1</sup> Véase la definición en el texto.

### **Ejemplo 11**

- 35 Se prepara una composición detergente enzimática mezclando aprox. un 30 % en peso de una preparación concentrada de una mutante de proteasa definida en las reivindicaciones, con aprox. un 5 % en peso de celulosa, un 5 % en peso de sacarosa, un 20 % en peso de harina de trigo, un 30 % en peso de almidón, un 5 % en peso de carboximetilcelulosa y un 5% de polietilenglicol (PM = 20.000). Se granula la mezcla resultante por granulación de extrusión. Después de secado, el granulado tiene una actividad de 70.000 a 250.000 HPE/g. Se recubre el  
 40 granulado con polietilenglicol (PM = 6000) que contiene TiO<sub>2</sub>. La enzima proteasa granulada se mezcla después con 100 g de detergente compacto intenso (Porsil supra) que contiene perborato sódico\TAED, lo cual se traduce en una actividad de proteasa estándar de 1200 HPE/g.

### **Ejemplo 12**

- 45 Se prepara una composición detergente enzimática con arreglo al ejemplo 11, excepto que la proteasa se reemplaza por la proteasa definida en las reivindicaciones.

**Ejemplo 13**

Se prepara una composición detergente enzimática líquida mezclando a temperatura ambiente un 13 % en peso de ácido (alquilo C10-C13 lineal)-benceno-sulfónico, un 5 % en peso de (alquil C12-C14)-poliglucósidos, un 10 % en peso de un poli(etoxilato de alcohol C13) que tiene 7 unidades de EO, un 6 % en peso de ácido láurico, un 7 % en peso de ácido oleico, un 5 % en peso de trietanolamina, un 5 % en peso de propanodiol-1,2, un 2 % en peso de hidróxido sódico, un 1 % en peso de ácido cítrico, un 7 % en peso de etanol, un % en peso de ácido 1-hidroxietano-1,1-difosfónico y el resto es agua.

El pH de la solución resultante es 8,1 (medida en una solución acuosa al 10%). Se añade una cantidad suficiente de la proteasa definida en las reivindicaciones para conseguir una composición que tenga un 0,5 % en peso de concentrado líquido de proteasa (1250 HPE/g).

**Ejemplo 14**

La proporción KC de la proteasa F49 y, para la comparación, las proporciones KC de tres proteasas comerciales se determinan por el método descrito previamente. Se obtienen los resultados siguientes:

Proteasa	proporción KC
15 MAXACAL <sup>®a</sup>	0,92
SAVINASE <sup>®b</sup>	0,80
BLAP <sup>®</sup>	0,83
F49	0,63

a) fabricante: Gist Brocades, Holanda  
 20 b) fabricante: Novo Nordisk, Dinamarca

**Ejemplo 15**

Se añade 1 g de hebras de lana a 50 ml de una solución tampón de carbonato sódico que contiene la F 49 (pH 10,5) que tiene una actividad proteolítica de 5,6 PU/ml y se deja que reaccionen a temperatura ambiente durante 1 hora. Después se determinan la cantidad de aminoácido liberado y los péptidos con TNBS (determinación de control en solución tampón sin proteasa). Al valor del daño causado a la lana obtenido en estas condiciones para la proteasa BLAP se le atribuye el valor 100%. En estas condiciones, la proteasa F 49 tiene un valor del 31 %.

**Ejemplo 16**

Se repite el ensayo descrito en el ejemplo 2 empleando 1 g de hebras de seda. Se obtienen los siguientes valores para el daño causado a la seda:

Proteasa	daño en la seda
BLAP	100%
ESPERASE <sup>®a</sup>	165 %
SAVINASE <sup>®a</sup>	89%
35 F49	28%

a) fabricante: Novo Nordisk, Dinamarca

**Ejemplo 17**

En una lavadora de ropa de tipo MIELE<sup>®</sup> Electronic W 793 se lavan prendas de lana 9 veces a 40°C (dureza del agua 16°dH (grados de dureza alemana), relación de baño = 1:15) en presencia de algodón para estabilidad de lavado (carga total = 1,2 kg). En el baño de lavado se emplean 98 g de un detergente coloreado sin enzimas (ensayo de control), al que se han añadido 49 ml de una solución de la BLAP 140 (ensayo comparativo) o una cantidad de la misma actividad, expresada en PU, de la F49 (de esta invención). Se secan los tejidos de lana lavados, de ellos se cortan retales de dimensiones específicas y se pesan. La reducción de peso, expresada en % del valor antes del lavado, se recoge en la tabla siguiente:

a) mezcla de un 80% de lana merino y un 20% de poliamida

**Ejemplo 18**

Se repite el ejemplo 4 empleando pantalones gris de pura lana, de nuevo se emplean las proteasas en cantidades de igual actividad (1080 PU/g del detergente); a diferencia del ejemplo 4, se efectúan 5 lavados a 60°C. La reducción del peso es solamente del 10,7% cuando se emplea la proteasa F49 y del 40,5% cuando se emplea la BLAP®.

5 **Ejemplo 19**

Se calienta a 70°C una solución que contiene 12 g/l de un sustrato (caseína o queratina) y de tripolifosfato sódico 30 mM en agua de una dureza de 15°dH (que contiene un 0,058% en peso de  $\text{CeCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , un 0,028% en peso de  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  y un 0,042% en peso de  $\text{NaHCO}_3$ ) y se ajusta el pH a un valor de 8,5 por adición de NaOH 0,1 N a 50°C. Se añaden 200 µl de una solución de la enzima a be ensayar en una solución tampón de tripolifosfato sódico al 2% en peso (pH 8,5) sobre 600 µl de la solución de sustrato. Se incuba la mezcla reaccionante a 50°C durante 15 minutos. Se termina la reacción por adición de 500 µl de una solución de TCA (ácido tricloroacético 0,44 M y acetato sódico 0,22 M en ácido acético del 3 % en volumen) y se enfría (baño de hielo a 0°C, 15 minutos). Se separa la proteína insoluble en TCA por centrifugación y se diluyen 900 µl de la fase sobrenadante con 300 µl de NaOH 2 N. Se determina la absorción de esta solución a 290 nm en un espectrómetro de absorción, el valor de absorción cero se determina midiendo una solución centrifugada preparada mezclando 600 µl de la solución de TCA ya mencionada con 600 µl de la solución de sustrato ya mencionada y añadiendo después la solución de enzima.

**Ejemplo 20**

Se ensucian tejidos de algodón prelavados con cantidades iguales de suciedad y se secan al aire durante 3 días. Se llenan los vasos de precipitados del aparato llamado launderometer con 6 retales de algodón sucio y limpio y 10 bolas metálicas (de 1 cm de diámetro) y se lavan en una aparato llamado launderometer del tipo Atlas LP-2 durante 30 minutos, con una temperatura final de 30°C, que se alcanza después de 4 minutos de calentamiento. Se emplea una formulación de detergente de especialidad fina, destinada a tejidos de fácil mantenimiento y coloreados (0,75 g/100 ml). Se emplea también un detergente compacto intenso (0,5 g/100 ml) y un concentrado de detergente supercompacto (0,4 g/100 ml). La composición de los detergentes se ha descrito en "Detergents and Textile Washing", G. Jakobi & A. Löhr, VCH, Weinheim, ISBN 0-89573-687-X, 1987. Se emplea agua que tiene una dureza de 16° dH (grados de dureza alemana) y el pH es de 4. Las actividades enzimáticas de los detergentes son de: 0, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 700, y 1000 HPE/g de detergente. Después del lavado se enjuagan los retales del ensayo con agua del grifo, se secan con aire y se planchan. El efecto de lavado enzimático se determina por el cambio ( $\Delta\text{Rem}$ ) de la remisión (%Rem) a 440 nm, medida con un instrumento de medición de diferencias de color del Dr. Lange (Micro Color). La  $\Delta\text{Rem}$  es la diferencia de la remisión después del lavado con la adición de la proteasa y la remisión después del lavado sin añadir proteasa. Los resultados de los ensayos de eficacia de lavado de varios detergentes y composiciones detergentes que contienen enzimas o una combinación de enzimas se recogen en las siguientes tablas 2 y 3. Cada valor es una relación entre la cantidad de enzima mutante que produce una  $\Delta\text{Rem}$  estándar con respecto a la cantidad de la enzima de tipo salvaje que se requiere para lograr el mismo efecto de lavado. Un valor de 2 indica que se necesita una cantidad doble de enzima de tipo salvaje que de enzima mutante concreta para conseguir el mismo efecto de lavado. Los datos indican además que una composición detergente que contenga una de mutantes F46 y F49 produce un efecto más intenso de lavado que el promedio de sus enzimas individuales.

Tabla 2

40 Efecto de lavado de enzimas en manchas de sangre-leche-hollín

Enzima	Detergente	
	intenso	compacto intenso
BLAP/M131	1	1
F46	2,9	1,9
45 F49	1,8	1,0
F46+F49	2,6	2,2

Tabla 3

Efecto de lavado de enzimas en manchas de huevo-hollín

Enzima	Detergente	
	intenso	compacto intenso
BLAP/M131	1	1
F46	1,5	1,3
F49	4,0	1,7

F46+F49

3,3

2,2

**Ejemplo 21**

5 Se prepara una composición similar a la descrita en el ejemplo 13, excepto que la proteasa se ha reemplazado por la proteasa definida en la reivindicación 7.

Listado de secuencias

<110> Henkel Kommanditgesellschaft auf Aktien  
 <120> Enzimas mejoradas y detergentes que las contienen  
 <130> H 587/876/939 PCT/EP  
 10 <140> 95912559,2  
 <141> 1995-02-23  
 <150> US 08/201120  
 <151> 1994-02-24  
 <150> US 08/373818  
 15 <151> 1995-01-17  
 <160> 26  
 <170> PatentIn Ver. 2,1  
 <210> 1  
 <211> 807  
 20 <212> DNA  
 <213> *Bacillus lentus* DSM 5483 clon F11  
 <400> 1

```

gcgcaaacag tgccatgggg aattagccgt gtgcaagccc cggctgccc taaccgtgga 60
ttgacagggt ctggtgtaaa agttgctgtc ctcgatacag gtatttccac tcatccagac 120
ttaaataatc gtggtggcgc tagctttgta ccaggggaac catccactca agatgggaat 180
gggcatggca cgcattgtgc cgggacgatt gctgctttaa acaattcgat tggcgttctt 240
ggcgtagcgc ctagtgcgga actatacgcg gttaaagttt taggagccga cggtagcggg 300
gcaatcagct cgattgcccc agggttggaa tgggcaggga acaatggcat gcacgttgct 360
aatttgagtt taggaagccc ttcgccaagt gccacacttg agcaagctgt taatagcgcg 420
acttctagag gcgttcttgt tgtagcggca tctgggaatt cagggtgcaag ctcaatcagc 480
tatccggccc gttatgcgaa cgcaatggca gtcggagcta ctgacaaaa caacaaccgc 540
gccagctttt cacagtatgg cccaggcctt gacattatgg caccaggggt aaacattcag 600
agcacatacc caggttcaac gtatgccagc ttaaaccgga catcgatggc taactctcat 660
gttgacagtg cagcagccct tgttaaacia aagaacccat cttggtccaa tgtacaaate 720
cgcaaccatc taaagaatac ggcaacgagc ttaggaagca cgaacttgta tgggaagcga 780
cttgtcaatg cagaagcggc aacacgc

```

25 <210> 2  
 <211> 807  
 <212> DNA  
 <213> *Bacillus lentus* DSM 5483 clon F43  
 <400> 2

```

gcgcaaacaa tcccatgggg aattagccgt gtgcaagccc cggctgccc taaccgtgga 60
ttgacagggt ctggtgtaaa agttgctgtc ctcgatacag gtatttccac tcatccagac 120
ttaaataatc gtggtggcgc tagctttgta ccaggggaac catccactca agatgggaat 180
gggcatggca cgcattgtgc cgggacgatt gctgctttaa acaattcgat tggcgttctt 240
ggcgtagcgc ctagtgcgga actatacgcg gttaaagttt taggagccga cggtagcggg 300
gcaatcagct cgattgcccc agggttggaa tgggcaggga acaatggcat gcacgttgct 360
aatttgagtt taggaagccc ttcgccaagt gccacacttg agcaagctgt taatagcgcg 420
acttctagag gcgttcttgt tgtagcggca tctgggaatt cagggtgcaag ctcaatcagc 480
tatccggccc gttatgcgaa cgcaatggca gtcggagcta ctgacaaaa caacaaccgc 540
gccagctttt cacagtatgg cccaggcctt gacattatgg caccaggggt aaacattcag 600

```

```

agcacatacc caggttcaac gtatgccagc ttaaaccgga catcgatggc tactcctcat 660
gttgcagggtg cagcagccct tgttaaacia aagaaccat cttggtccaa tgtacaaatc 720
cgcaaccatc taaagaatac ggcaacgagc ttaggaagca cgaacttgta tggaaagcga 780
cttgtcaatg cagaagcggc aacacgc 807

```

<210> 3  
 <211> 807  
 <212> DNA

5 <213> *Bacillus lentus* DSM 5483 clon F44  
 <400> 3

```

gcgcaaaacia tcccatgggg aattagccgt gtgcaagccc cggctgccca taaccgtgga 60
ttgacagggtt ctggtgtaaa agttgctgtc ctcgatacag gtatttccac tcatccagac 120
ttaaataatc gtggtggcgc tagctttgta ccaggggaac catccactca agatgggaat 180
gggcatggca cgcattgtgc cgggacgatt gctgctttaa acaattcgat tggcgttctt 240
ggcgtagcgc ctagtgcgga actatacgct gttaaagttt taggagcga cgggtgcagg 300
gcaatcagct cgattgcccc agggttggaa tgggcaggga acaatggcat gcacgttctt 360
aatttgagtt taggaagccc ttcgccaagt gccacacttg agcaagctgt taatagcgcg 420
acttctagag gcgttcttgt tgtagcggca tctgggaatt cagggtgcaag ctcaatcagc 480
tatccggccc gttatgcgaa cgcaatggca gtcggagcta ctgacaaaa caacaaccgc 540
gccagctttt cacagtatgg cccagggcct gacattatgg caccaggggt aacattcag 600
agcacatacc caggttcaac gtatgccagc ttaaaccgga catcgatggc tactcctcat 660
gttgcagggtg cagcagccct tgttaaacia aagaaccat cttggtccaa tgtacaaatc 720
cgcaaccatc taaagaatac ggcaacgagc ttaggaagca cgaacttgta tggaaagcga 780
cttgtcaatg cagaagcggc aacacgc 807

```

<210> 4  
 <211> 807  
 <212> DNA

10 <213> *Bacillus lentus* DSM 5483 clon F45  
 <400> 4

```

gcgcaaaacia tcccatgggg aattagccgt gtgcaagccc cggctgccca taaccgtgga 60
ttgacagggtt ctggtgtaaa agttgctgtc ctcgatacag gtatttccac tcatccagac 120
ttaaataatc gtggtggcgc tagctttgta ccaggggaac catccactca agatgggaat 180
gggcatggca cgcattgtgc cgggacgatt gctgctttaa acaattcgat tggcgttctt 240
ggcgtagcgc ctagtgcgga actatacgct gttaaagttt taggagcga cgggtgcagg 300
gcaatcagct cgattgcccc agggttggaa tgggcaggga acaatggcat gcacgttctt 360
aatttgagtt taggaagccc ttcgccaagt gccacacttg agcaagctgt taatagcgcg 420
acttctagag gcgttcttgt tgtagcggca tctgggaatt cagggtgcaag ctcaatcagc 480
tatccggccc gttatgcgaa cgcaatggca gtcggagcta ctgacaaaa caacaaccgc 540
gccagctttt cacagtatgg cccagggcct gacattatgg caccaggggt aacattcag 600
agcacatacc caggttcaac gtatgccagc ttaaaccgga catcgatggc tactcctcat 660
gttgcagggtg cagcagccct tgttaaacia aagaaccat cttggtccaa tgtacaaatc 720
cgcaaccatc taaagaatac ggcaacgagc ttaggaagca cgaacttgta tggaaagcga 780
cttgtcaatg cagaagcggc aacacgc 807

```

<210> 5  
 <211> 807  
 <212> DNA

15 <213> *Bacillus lentus* DSM 5483 clon F46  
 <400> 5

```

gcgcaaaacia tcccatgggg aattagccgt gtgcaagccc cggctgccca taaccgtgga 60
ttgacagggtt ctggtgtaaa agttgctgtc ctcgatacag gtatttccac tcatccagac 120
ttaaataatc gtggtggcgc tagctttgta ccaggggaac catccactca agatgggaat 180

```



```

gggcatggca cgcattgtgc cgggacgatt gctgctttaa acaattogat tggcgttctt 240
ggcgtagcgc ctagtgcgga actatacgcg gttaaagttt taggagccga cggtagaggt 300
gcaatcagct cgattgccc aagggttgaa tgggcaggg acaatggcat gcacgttgct 360
aatttgagtt taggaagccc ttcgccaagt gccacacttg agcaagctgt taatagcgcg 420
acttctagag gcgttcttgt tgtagcggca tctgggaatg aagggtgcaag ctcaatcagc 480
tatccggccc gttatgcgaa cgcaatggca gtcggagcta ctgacaaaa caacaaccgc 540
gccagctttt cacagtatgg cccagggctt gacattatgg caccaggggt aacattcag 600
agcacatacc caggttcaac gtatgccagc ttaaaccgga catcgatggc tactcctcat 660
gttgacaggtg cagcagccct tgttaaacia aagaacccat cttgggtcaa tgtacaaatc 720
cgcaaccatc taaagaatac ggcaacgagc ttaggaagca cgaacttgta tggaaagcga 780
cttgtcaatg cagaagcggc aacacgc 807

```

<210> 6

<211> 807

<212> DNA

5 <213> *Bacillus lentus* DSM 5483 clon F47

<900> 6

```

gcgcaaaacia tcccatgggg aattagccgt gtgcaagccc cggctgccc taaccgtgga 60
ttgacaggtt ctggtgtaaa agttgctgtc ctcgatacag gtatttccac tcaccagac 120
ttaaataatc gtggtggcgc tagctttgta ccaggggaac catccactca agatgggaat 180
gggcatggca cgcattgtgc cgggacgatt gctgctttaa acaattcgat tggcgttctt 240
ggcgtagcgc ctagtgcgga actatacgcg gttaaagttt taggagccga cggtagaggt 300
gcaatcagct cgattgccc aagggttgaa tgggcaggg acaatggcat gcacgttgct 360
aatttgagtt taggaagccc ttcgccaagt gccacacttg agcaagctgt taatagcgcg 420
acttctagag gcgttcttgt tgtagcggca tctgggaatg acgggtgcaag ctcaatcagc 480
tatccggccc gttatgcgaa cgcaatggca gtcggagcta ctgacaaaa caacaaccgc 540
gccagctttt cacagtatgg cccagggctt gacattatgg caccaggggt aacattcag 600
agcacatacc caggttcaac gtatgccagc ttaaaccgga catcgatggc tactcctcat 660
gttgacaggtg cagcagccct tgttaaacia aagaacccat cttgggtcaa tgtacaaatc 720
cgcaaccatc taaagaatac ggcaacgagc ttaggaagca cgaacttgta tggaaagcga 780
cttgtcaatg cagaagcggc aacacgc 807

```

<210> 7

<211> 807

<212> DNA

10 <213> *Bacillus lentus* DSM 5483 clon F49

<400> 7

```

gcgcaaaacia tcccatgggg aattagccgt gtgcaagccc cggctgccc taaccgtgga 60
ttgacaggtt ctggtgtaaa agttgctgtc ctcgatacag gtatttccac tcaccagac 120
ttaaataatc gtggtggcgc tagctttgta ccaggggaac catccactca agatgggaat 180
gggcatggca cgcattgtgc cgggacgatt gctgctttaa acaattcgat tggcgttctt 240
ggcgtagcgc ctagtgcgga actatacgcg gttaaagttt taggagccga cggtagaggt 300
gcaatcagct cgattgccc aagggttgaa tgggcaggg acaatggcat gcacgttgct 360
aatttgagtt taggaagccc ttcgccaagt gccacacttg agcaagctgt taatagcgcg 420
acttctagag gcgttcttgt tgtagcggca tctgggaatg cagggtgcaag ctcaatcagc 480
tatccggccc gttatgcgaa cgcaatggca gtcggagcta ctgacaaaa caacaaccgc 540
gccagctttt cacagtatgg cccagggctt gacattatgg caccaggggt aacattcag 600
agcacatacc caggttcaac gtatgccagc gacaaccgga catcgatggc tactcctcat 660
gttgacaggtg cagcagccct tgttaaacia aagaacccat cttgggtcaa tgtacaaatc 720
cgcaaccatc taaagaatac ggcaacgagc ttaggaagca cgaacttgta tggaaagcga 780
cttgtcaatg cagaagcggc aacacgc 807

```

<210> 8

15 <211> 807

<212> DNA

<213> *Bacillus lentus* DSM 5463 clon F54  
 <400> 8

```

gcgcaaacaa tcccatgggg aattagccgt gtgcaagccc cggctgccc taaccgtgga 60
ttgacagggt ctggtgtaaa agttgctgtc ctcgatacag gtatttccac tcatccagac 120
ttaaataattc gtggtggcgc tagctttgta ccaggggaac catccactca agatgggaat 180
gggcatggca cgcattgtggc cgggacgatt gctgctttaa acaattcgat tggcgttctt 240
ggcgtagcgc ctagtgcgga actatacgcg gttaaagttt taggagccga cggtagaggt 300
gcaatcagct cgattgccc aagggttgaa tgggcaggga acaatggcat gcacgttgc 360
aatttgagtt taggaagccc ttcgccaagt gccacacttg agcaagctgt taatagcgcg 420
acttctagag gcgttcttgt tgtagcggca tctgggaatt caggtgcaag ctcaatcagc 480
tatccggccc gttatgcaa cgcaatggca gtccgagcta ctgacaaaa caacaaccgc 540
gccagctttt cacagtatgg cccagggctt gacattatgg caccaggggt aacattcag 600
agcacatacc caggttcaac gtatgccagc gacaacggta catcgatggc tactcctcat 660
gttgacagtg cagcagccct tgttaaacia aagaacccat cttggtccaa tgtacaaatc 720
cgcaaccatc taaagaatac ggcaacgagc ttaggaagca cgaacttgta tggagcggga 780
cttgtcaatg cagaagcggc aacacgc
    
```

5 <210> 9  
 <211> B07  
 <212> DNA  
 <213> *Bacillus lentus* DSM 5483 clon F55  
 <400> 9

```

gcgcaaacaa tcccatgggg aattagccgt gtgcaagccc cggctgccc taaccgtgga 60
ttgacagggt ctggtgtaaa agttgctgtc ctcgatacag gtatttccac tcatccagac 120
ttaaataattc gtggtggcgc tagctttgta ccaggggaac catccactca agatgggaat 180
gggcatggca cgcattgtggc cgggacgatt gctgctttaa acaattcgat tggcgttctt 240
ggcgtagcgc ctagtgcgga actatacgcg gttaaagttt taggagccga cggtagaggt 300
gcaatcagct cgattgccc aagggttgaa tgggcaggga acaatggcat gcacgttgc 360
aatttgagtt taggaagccc ttcgccaagt gccacacttg agcaagctgt taatagcgcg 420
acttctagag gcgttcttgt tgtagcggca tctgggaatg aaggtgcaag ctcaatcagc 480
tatccggccc gttatgcaa cgcaatggca gtccgagcta ctgacaaaa caacaaccgc 540
gccagctttt cacagtatgg cccagggctt gacattatgg caccaggggt aacattcag 600
agcacatacc caggttcaac gtatgccagc gacaacggta catcgatggc tactcctcat 660
gttgacagtg cagcagccct tgttaaacia aagaacccat cttggtccaa tgtacaaatc 720
cgcaaccatc taaagaatac ggcaacgagc ttaggaagca cgaacttgta tggagcggga 780
cttgtcaatg cagaagcggc aacacgc
    
```

10 <210> 10  
 <211> 269  
 <212> PRT  
 <213> *Bacillus lentus* DSM 5483 clon F11  
 <400> 10

```

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

His Asn Arg Gly Leu Thr Gly Ser Gly Val Lys Val Ala Val Leu Asp
  20                25                30

Thr Gly Ile Ser Thr His Pro Asp Leu Asn Ile Arg Gly Gly Ala Ser
  35                40                45

Phe Val Pro Gly Glu Pro Ser Thr Gln Asp Gly Asn Gly His Gly Thr
  50                55                60
    
```

15

His Val Ala Gly Thr Ile Ala Ala Leu Asn Asn Ser Ile Gly Val Leu  
 65 70 75 80  
 Gly Val Ala Pro Ser Ala Glu Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu Gly Ala  
 85 90 95  
 Asp Gly Ser Gly Ala Ile Ser Ser Ile Ala Gln Gly Leu Glu Trp Ala  
 100 105 110  
 Gly Asn Asn Gly Met His Val Ala Asn Leu Ser Leu Gly Ser Pro Ser  
 115 120 125  
 Pro Ser Ala Thr Leu Glu Gln Ala Val Asn Ser Ala Thr Ser Arg Gly  
 130 135 140  
 Val Leu Val Val Ala Ala Ser Gly Asn Ser Gly Ala Ser Ser Ile Ser  
 145 150 155 160  
 Tyr Pro Ala Arg Tyr Ala Asn Ala Met Ala Val Gly Ala Thr Asp Gln  
 165 170 175  
 Asn Asn Asn Arg Ala Ser Phe Ser Gln Tyr Gly Pro Gly Leu Asp Ile  
 180 185 190  
 Met Ala Pro Gly Val Asn Ile Gln Ser Thr Tyr Pro Gly Ser Thr Tyr  
 195 200 205  
 Ala Ser Leu Asn Gly Thr Ser Met Ala Thr Pro His Val Ala Gly Ala  
 210 215 220  
 Ala Ala Leu Val Lys Gln Lys Asn Pro Ser Trp Ser Asn Val Gln Ile  
 225 230 235 240  
 Arg Asn His Leu Lys Asn Thr Ala Thr Ser Leu Gly Ser Thr Asn Leu  
 245 250 255  
 Tyr Gly Ser Gly Leu Val Asn Ala Glu Ala Ala Thr Arg  
 260 265

<210> 11

<211> 269

<212> PRT

5 <213> *Bacillus lentus* DSM 5483 clon F43

<400> 11

Ala Gln Thr Ile Pro Trp Gly Ile Ser Arg Val Gln Ala Pro Ala Ala  
 1 5 10 15  
 His Asn Arg Gly Leu Thr Gly Ser Gly Val Lys Val Ala Val Leu Asp  
 20 25 30  
 Thr Gly Ile Ser Thr His Pro Asp Leu Asn Ile Arg Gly Gly Ala Ser  
 35 40 45  
 Phe Val Pro Gly Glu Pro Ser Thr Gln Asp Gly Asn Gly His Gly Thr  
 50 55 60

His Val Ala Gly Thr Ile Ala Ala Leu Asn Asn Ser Ile Gly Val Leu  
 65 70 75 80  
 Gly Val Ala Pro Ser Ala Glu Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu Gly Ala  
 85 90 95  
 Asp Gly Gly Gly Ala Ile Ser Ser Ile Ala Gln Gly Leu Glu Trp Ala  
 100 105 110  
 Gly Asn Asn Gly Met His Val Ala Asn Leu Ser Leu Gly Ser Pro Ser  
 115 120 125  
 Pro Ser Ala Thr Leu Glu Gln Ala Val Asn Ser Ala Thr Ser Arg Gly  
 130 135 140  
 Val Leu Val Val Ala Ala Ser Gly Asn Ser Gly Ala Ser Ser Ile Ser  
 145 150 155 160  
 Tyr Pro Ala Arg Tyr Ala Asn Ala Met Ala Val Gly Ala Thr Asp Gln  
 165 170 175  
 Asn Asn Asn Arg Ala Ser Phe Ser Gln Tyr Gly Pro Gly Leu Asp Ile  
 180 185 190  
 Met Ala Pro Gly Val Asn Ile Gln Ser Thr Tyr Pro Gly Ser Thr Tyr  
 195 200 205  
 Ala Ser Leu Asn Gly Thr Ser Met Ala Thr Pro His Val Ala Gly Ala  
 210 215 220  
 Ala Ala Leu Val Lys Gln Lys Asn Pro Ser Trp Ser Asn Val Gln Ile  
 225 230 235 240  
 Arg Asn His Leu Lys Asn Thr Ala Thr Ser Leu Gly Ser Thr Asn Leu  
 245 250 255  
 Tyr Gly Ser Gly Leu Val Asn Ala Glu Ala Ala Thr Arg  
 260 265

<210> 12

<211> 269

<212> PRT

5 <213> *Bacillus lentus* DSM 5483 clon F44

<400> 12

Ala Gln Thr Ile Pro Trp Gly Ile Ser Arg Val Gln Ala Pro Ala Ala  
 1 5 10 15  
 His Asn Arg Gly Leu Thr Gly Ser Gly Val Lys Val Ala Val Leu Asp  
 20 25 30  
 Thr Gly Ile Ser Thr His Pro Asp Leu Asn Ile Arg Gly Gly Ala Ser  
 35 40 45  
 Phe Val Pro Gly Glu Pro Ser Thr Gln Asp Gly Asn Gly His Gly Thr  
 50 55 60  
 His Val Ala Gly Thr Ile Ala Ala Leu Asn Asn Ser Ile Gly Val Leu  
  
 65 70 75 80  
 Gly Val Ala Pro Ser Ala Glu Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu Gly Ala  
 85 90 95  
 Asp Gly Ala Gly Ala Ile Ser Ser Ile Ala Gln Gly Leu Glu Trp Ala  
 100 105 110  
 Gly Asn Asn Gly Met His Val Ala Asn Leu Ser Leu Gly Ser Pro Ser  
 115 120 125  
 Pro Ser Ala Thr Leu Glu Gln Ala Val Asn Ser Ala Thr Ser Arg Gly  
 130 135 140  
 Val Leu Val Val Ala Ala Ser Gly Asn Ser Gly Ala Ser Ser Ile Ser  
 145 150 155 160  
 Tyr Pro Ala Arg Tyr Ala Asn Ala Met Ala Val Gly Ala Thr Asp Gln  
 165 170 175  
 Asn Asn Asn Arg Ala Ser Phe Ser Gln Tyr Gly Pro Gly Leu Asp Ile  
 180 185 190  
 Met Ala Pro Gly Val Asn Ile Gln Ser Thr Tyr Pro Gly Ser Thr Tyr  
 195 200 205  
 Ala Ser Leu Asn Gly Thr Ser Met Ala Thr Pro His Val Ala Gly Ala  
 210 215 220  
 Ala Ala Leu Val Lys Gln Lys Asn Pro Ser Trp Ser Asn Val Gln Ile  
 225 230 235 240  
 Arg Asn His Leu Lys Asn Thr Ala Thr Ser Leu Gly Ser Thr Asn Leu  
 245 250 255  
 Tyr Gly Ser Gly Leu Val Asn Ala Glu Ala Ala Thr Arg  
 260 265

<210> 13  
<211> 269

<212> PRT

<213> *Bacillus lentus* DSM 5483 clon F45

<400> 13

```

Ala Gln Thr Ile Pro Trp Gly Ile Ser Arg Val Gln Ala Pro Ala Ala
 1           5           10           15
His Asn Arg Gly Leu Thr Gly Ser Gly Val Lys Val Ala Val Leu Asp
           20           25           30
Thr Gly Ile Ser Thr His Pro Asp Leu Asn Ile Arg Gly Gly Ala Ser
           35           40           45
Phe Val Pro Gly Glu Pro Ser Thr Gln Asp Gly Asn Gly His Gly Thr
           50           55           60
His Val Ala Gly Thr Ile Ala Ala Leu Asn Asn Ser Ile Gly Val Leu
 65           70           75           80
    
```

Gly Val Ala Pro Ser Ala Glu Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu Gly Ala  
 85 90 95

Asp Gly Ser Gly Ala Ile Ser Ser Ile Ala Gln Gly Leu Glu Trp Ala  
 100 105 110

Gly Asn Asn Gly Met His Val Ala Asn Leu Ser Leu Gly Ser Pro Ser  
 115 120 125

Pro Ser Ala Thr Leu Glu Gln Ala Val Asn Ser Ala Thr Ser Arg Gly  
 130 135 140

Val Leu Val Val Ala Ala Ser Gly Asn Ser Gly Ala Ser Ser Ile Ser  
 145 150 155 160

Tyr Pro Ala Arg Tyr Ala Asn Ala Met Ala Val Gly Ala Thr Asp Gln  
 165 170 175

Asn Asn Asn Arg Ala Ser Phe Ser Gln Tyr Gly Pro Gly Leu Asp Ile  
 180 185 190

Met Ala Pro Gly Val Asn Ile Gln Ser Thr Tyr Pro Gly Ser Thr Tyr  
 195 200 205

Ala Ser Leu Asn Gly Thr Ser Met Ala Thr Pro His Val Ala Gly Ala  
 210 215 220

Ala Ala Leu Val Lys Gln Lys Asn Pro Ser Trp Ser Asn Val Gln Ile  
 225 230 235 240

Arg Asn His Leu Lys Asn Thr Ala Thr Ser Leu Gly Ser Thr Asn Leu  
 245 250 255

Tyr Gly Ser Gly Leu Val Asn Ala Glu Ala Ala Thr Arg  
 260 265

<210> 14  
 <211> 269  
 <212> PRT

5 <213> *Bacillus lentus* DSM 5483 clon F46  
 <400> 14

Ala Gln Thr Ile Pro Trp Gly Ile Ser Arg Val Gln Ala Pro Ala Ala  
 1 5 10 15  
 His Asn Arg Gly Leu Thr Gly Ser Gly Val Lys Val Ala Val Leu Asp  
 20 25 30  
 Thr Gly Ile Ser Thr His Pro Asp Leu Asn Ile Arg Gly Gly Ala Ser  
 35 40 45  
 Phe Val Pro Gly Glu Pro Ser Thr Gln Asp Gly Asn Gly His Gly Thr  
 50 55 60  
 His Val Ala Gly Thr Ile Ala Ala Leu Asn Asn Ser Ile Gly Val Leu  
 65 70 75 80  
 Gly Val Ala Pro Ser Ala Glu Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu Gly Ala  
 85 90 95  
 Asp Gly Arg Gly Ala Ile Ser Ser Ile Ala Gln Gly Leu Glu Trp Ala  
 100 105 110  
 Gly Asn Asn Gly Met His Val Ala Asn Leu Ser Leu Gly Ser Pro Ser  
 115 120 125  
 Pro Ser Ala Thr Leu Glu Gln Ala Val Asn Ser Ala Thr Ser Arg Gly  
 130 135 140  
 Val Leu Val Val Ala Ala Ser Gly Asn Glu Gly Ala Ser Ser Ile Ser  
 145 150 155 160  
 Tyr Pro Ala Arg Tyr Ala Asn Ala Met Ala Val Gly Ala Thr Asp Gln  
 165 170 175  
 Asn Asn Asn Arg Ala Ser Phe Ser Gln Tyr Gly Pro Gly Leu Asp Ile  
 180 185 190  
 Met Ala Pro Gly Val Asn Ile Gln Ser Thr Tyr Pro Gly Ser Thr Tyr  
 195 200 205  
 Ala Ser Leu Asn Gly Thr Ser Met Ala Thr Pro His Val Ala Gly Ala  
 210 215 220  
 Ala Ala Leu Val Lys Gln Lys Asn Pro Ser Trp Ser Asn Val Gln Ile  
 225 230 235 240  
 Arg Asn His Leu Lys Asn Thr Ala Thr Ser Leu Gly Ser Thr Asn Leu  
 245 250 255  
 Tyr Gly Ser Gly Leu Val Asn Ala Glu Ala Ala Thr Arg  
 260 265



<210> 15

<211> 269

<212> PRT

<213> *Bacillus lentus* DSM 5483 clon F47

5 <400> 15

```

Ala Gln Thr Ile Pro Trp Gly Ile Ser Arg Val Gln Ala Pro Ala Ala
 1           5           10           15
His Asn Arg Gly Leu Thr Gly Ser Gly Val Lys Val Ala Val Leu Asp
          20           25           30
Thr Gly Ile Ser Thr His Pro Asp Leu Asn Ile Arg Gly Gly Ala Ser
          35           40           45
Phe Val Pro Gly Glu Pro Ser Thr Gln Asp Gly Asn Gly His Gly Thr
          50           55           60
His Val Ala Gly Thr Ile Ala Ala Leu Asn Asn Ser Ile Gly Val Leu
 65           70           75           80
Gly Val Ala Pro Ser Ala Glu Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu Gly Ala

```

				85					90					95			
Asp	Gly	Arg	Gly	Ala	Ile	Ser	Ser	Ile	Ala	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ala		
			100					105					110				
Gly	Asn	Asn	Gly	Met	His	Val	Ala	Asn	Leu	Ser	Leu	Gly	Ser	Pro	Ser		
		115						120				125					
Pro	Ser	Ala	Thr	Leu	Glu	Gln	Ala	Val	Asn	Ser	Ala	Thr	Ser	Arg	Gly		
	130					135					140						
Val	Leu	Val	Val	Ala	Ala	Ser	Gly	Asn	Asp	Gly	Ala	Ser	Ser	Ile	Ser		
145					150					155					160		
Tyr	Pro	Ala	Arg	Tyr	Ala	Asn	Ala	Met	Ala	Val	Gly	Ala	Thr	Asp	Gln		
				165					170					175			
Asn	Asn	Asn	Arg	Ala	Ser	Phe	Ser	Gln	Tyr	Gly	Pro	Gly	Leu	Asp	Ile		
			180					185					190				
Met	Ala	Pro	Gly	Val	Asn	Ile	Gln	Ser	Thr	Tyr	Pro	Gly	Ser	Thr	Tyr		
		195					200					205					
Ala	Ser	Leu	Asn	Gly	Thr	Ser	Met	Ala	Thr	Pro	His	Val	Ala	Gly	Ala		
	210					215					220						
Ala	Ala	Leu	Val	Lys	Gln	Lys	Asn	Pro	Ser	Trp	Ser	Asn	Val	Gln	Ile		
225					230					235					240		
Arg	Asn	His	Leu	Lys	Asn	Thr	Ala	Thr	Ser	Leu	Gly	Ser	Thr	Asn	Leu		
				245					250					255			
Tyr	Gly	Ser	Gly	Leu	Val	Asn	Ala	Glu	Ala	Ala	Thr	Arg					
			260					265									

<210> 16

<211> 269

<212> PRT

5 <213> *Bacillus lentus* DSM 5483 clon F49

<400> 16

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

His Asn Arg Gly Leu Thr Gly Ser Gly Val Lys Val Ala Val Leu Asp  
 20 25 30

Thr Gly Ile Ser Thr His Pro Asp Leu Asn Ile Arg Gly Gly Ala Ser  
 35 40 45

Phe Val Pro Gly Glu Pro Ser Thr Gln Asp Gly Asn Gly His Gly Thr  
 50 55 60

His Val Ala Gly Thr Ile Ala Ala Leu Asn Asn Ser Ile Gly Val Leu  
 65 70 75 80

Gly Val Ala Pro Ser Ala Glu Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu Gly Ala  
 85 90 95

Asp Gly Arg Gly Ala Ile Ser Ser Ile Ala Gln Gly Leu Glu Trp Ala  
 100 105 110  
 Gly Asn Asn Gly Met His Val Ala Asn Leu Ser Leu Gly Ser Pro Ser  
 115 120 125  
 Pro Ser Ala Thr Leu Glu Gln Ala Val Asn Ser Ala Thr Ser Arg Gly  
 130 135 140  
 Val Leu Val Val Ala Ala Ser Gly Asn Ser Gly Ala Ser Ser Ile Ser  
 145 150 155 160  
 Tyr Pro Ala Arg Tyr Ala Asn Ala Met Ala Val Gly Ala Thr Asp Gln  
 165 170 175  
 Asn Asn Asn Arg Ala Ser Phe Ser Gln Tyr Gly Pro Gly Leu Asp Ile  
 180 185 190  
 Met Ala Pro Gly Val Asn Ile Gln Ser Thr Tyr Pro Gly Ser Thr Tyr  
 195 200 205  
 Ala Ser Asp Asn Gly Thr Ser Met Ala Thr Pro His Val Ala Gly Ala  
 210 215 220  
 Ala Ala Leu Val Lys Gln Lys Asn Pro Ser Trp Ser Asn Val Gln Ile  
 225 230 235 240  
 Arg Asn His Leu Lys Asn Thr Ala Thr Ser Leu Gly Ser Thr Asn Leu  
 245 250 255  
 Tyr Gly Ser Gly Leu Val Asn Ala Glu Ala Ala Thr Arg  
 260 265

<210> 17

<211> 269

<212> PRT

5 <213> *Bacillus lentus* DSM 5483 clon F54

<400> 17

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

His Asn Arg Gly Leu Thr Gly Ser Gly Val Lys Val Ala Val Leu Asp  
 20 25 30

Thr Gly Ile Ser Thr His Pro Asp Leu Asn Ile Arg Gly Gly Ala Ser  
 35 40 45

Phe Val Pro Gly Glu Pro Ser Thr Gln Asp Gly Asn Gly His Gly Thr  
 50 55 60

His Val Ala Gly Thr Ile Ala Ala Leu Asn Asn Ser Ile Gly Val Leu  
 65 70 75 80

Gly Val Ala Pro Ser Ala Glu Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu Gly Ala  
 85 90 95

Asp Gly Gly Gly Ala Ile Ser Ser Ile Ala Gln Gly Leu Glu Trp Ala  
 100 105 110  
 Gly Asn Asn Gly Met His Val Ala Asn Leu Ser Leu Gly Ser Pro Ser  
 115 120 125  
 Pro Ser Ala Thr Leu Glu Gln Ala Val Asn Ser Ala Thr Ser Arg Gly  
 130 135 140  
 Val Leu Val Val Ala Ala Ser Gly Asn Ser Gly Ala Ser Ser Ile Ser  
 145 150 155 160  
 Tyr Pro Ala Arg Tyr Ala Asn Ala Met Ala Val Gly Ala Thr Asp Gln  
 165 170 175  
 Asn Asn Asn Arg Ala Ser Phe Ser Gln Tyr Gly Pro Gly Leu Asp Ile  
 180 185 190  
 Met Ala Pro Gly Val Asn Ile Gln Ser Thr Tyr Pro Gly Ser Thr Tyr  
 195 200 205  
 Ala Ser Asp Asn Gly Thr Ser Met Ala Thr Pro His Val Ala Gly Ala  
 210 215 220  
 Ala Ala Leu Val Lys Gln Lys Asn Pro Ser Trp Ser Asn Val Gln Ile  
 225 230 235 240  
 Arg Asn His Leu Lys Asn Thr Ala Thr Ser Leu Gly Ser Thr Asn Leu  
 245 250 255  
 Tyr Gly Ser Gly Leu Val Asn Ala Glu Ala Ala Thr Arg  
 260 265

<210> 18

<211> 269

<212> PRT

5 <213> *Bacillus lentus* DSM 5483 clon F55

<400> 18

Ala Gln Thr Ile Pro Trp Gly Ile Ser Arg Val Gln Ala Pro Ala Ala  
 1 5 10 15  
 His Asn Arg Gly Leu Thr Gly Ser Gly Val Lys Val Ala Val Leu Asp  
 20 25 30  
 Thr Gly Ile Ser Thr His Pro Asp Leu Asn Ile Arg Gly Gly Ala Ser  
 35 40 45  
 Phe Val Pro Gly Glu Pro Ser Thr Gln Asp Gly Asn Gly His Gly Thr  
 50 55 60  
 His Val Ala Gly Thr Ile Ala Ala Leu Asn Asn Ser Ile Gly Val Leu  
 65 70 75 80  
 Gly Val Ala Pro Ser Ala Glu Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu Gly Ala  
 85 90 95  
 Asp Gly Arg Gly Ala Ile Ser Ser Ile Ala Gln Gly Leu Glu Trp Ala

100

105

110

Gly Asn Asn Gly Met His Val Ala Asn Leu Ser Leu Gly Ser Pro Ser  
 115 120 125  
 Pro Ser Ala Thr Leu Glu Gln Ala Val Asn Ser Ala Thr Ser Arg Gly  
 130 135 140  
 Val Leu Val Val Ala Ala Ser Gly Asn Glu Gly Ala Ser Ser Ile Ser  
 145 150 155 160  
 Tyr Pro Ala Arg Tyr Ala Asn Ala Met Ala Val Gly Ala Thr Asp Gln  
 165 170 175  
 Asn Asn Asn Arg Ala Ser Phe Ser Gln Tyr Gly Pro Gly Leu Asp Ile  
 180 185 190  
 Met Ala Pro Gly Val Asn Ile Gln Ser Thr Tyr Pro Gly Ser Thr Tyr  
 195 200 205  
 Ala Ser Asp Asn Gly Thr Ser Met Ala Thr Pro His Val Ala Gly Ala  
 210 215 220  
 Ala Ala Leu Val Lys Gln Lys Asn Pro Ser Trp Ser Asn Val Gln Ile  
 225 230 235 240  
 Arg Asn His Leu Lys Asn Thr Ala Thr Ser Leu Gly Ser Thr Asn Leu  
 245 250 255  
 Tyr Gly Ser Gly Leu Val Asn Ala Glu Ala Ala Thr Arg  
 260 265

<210> 19  
<211> 807

<212> DNA  
<213> *Bacillus lentus* DSM 5483  
<400> 19

5

```

gcgcaatcag tgccatgggg aattagccgt gtgcaagccc cggctgcca taaccgtgga 60
ttgacagggt ctggtgtaaa agttgctgtc ctcgatacag gtatttccac tcatccagac 120
ttaaataatc gtggtggcgc tagctttgta ccaggggaac catccactca agatggggaat 180
gggcatggca cgcagtgggc cgggacgatt gctgctttaa acaattcgat tggcgttcct 240
ggcgtagcgc ctagtgcgga actatacgcg gttaaagttt taggagccga cggtagagggt 300
gcaatcagct cgattgcca agggttggaa tgggcagggg acaatggcat gcacgttgct 360
aatttgagtt taggaagccc ttcgccaagt gccacacttg agcaagctgt taatagcgcg 420
acttctagag gcgttcctgt tgtagcggca tctgggaatt caggtgcaag ctcaatcagc 480
tatccggccc gttatgcgaa cgcaatggca gtcggagcta ctgaccaaaa caacaaccgc 540
gccagctttt cacagtatgg cgcaggcctt gacattgtcg caccaggggt aaacgtgcag 600
agcacatacc caggttcaac gtatgccagc ttaaaccgta catcgatggc tactcctcat 660
gttgacaggt cagcagccct tgttaaacia aagaacccat cttggtccaa tgtacaaatc 720
cgcaaccatc taaagaatac ggcaacgagc ttaggaagca cgaacttgta tggagcggga 780
cttgtcaatg cagaagcggc aacacgc 807
    
```

<210> 20  
<211> 807  
<212> DNA  
<213> *Bacillus lentus* DSM 5463 clon M130  
<400> 20

10

```

gcgcaaacag tgccatgggg aattagccgt gtgcaagccc cggctgcca taaccgtgga 60
ttgacagggt ctggtgtaaa agttgctgtc ctcgatacag gtatttccac tcatccagac 120
ttaaataatc gtggtggcgc tagctttgta ccaggggaac catccactca agatggggaat 180
gggcatggca cgcagtgggc cgggacgatt gctgctttaa acaattcgat tggcgttcct 240
ggcgtagcgc ctagtgcgga actatacgcg gttaaagttt taggagccga cggtagagggt 300
gcaatcagct cgattgcca agggttggaa tgggcagggg acaatggcat gcacgttgct 360
aatttgagtt taggaagccc ttcgccaagt gccacacttg agcaagctgt taatagcgcg 420
acttctagag gcgttcctgt tgtagcggca tctgggaatt caggtgcaag ctcaatcagc 480
tatccggccc gttatgcgaa cgcaatggca gtcggagcta ctgaccaaaa caacaaccgc 540
gccagctttt cacagtatgg cccaggcctt gacattatgg caccaggggt aaacattcag 600
agcacatacc caggttcaac gtatgccagc ttaaaccgta catcgatggc tactcctcat 660
gttgacaggt cagcagccct tgttaaacia aagaacccat cttggtccaa tgtacaaatc 720
cgcaaccatc taaagaatac ggcaacgagc ttaggaagca cgaacttgta tggagcggga 780
cttgtcaatg cagaagcggc aacacgc 807
    
```

<210> 21  
<211> 807  
<212> DNA  
<213> *Bacillus lentus* DSM 5483 clon M131  
<400> 21

15



```

gcgcaaacaa tcccatgggg aattagccgt gtgcaagccc cggctgocca taaccgigga 60
ttgacagggt ctggtgtaaa agttgctgct ctcgatacag gtatttccac tcatccagac 120
ttaaataatc gtggtggcgc tagctttgta ccaggggaac catccactca agatgggaat 180
gggcatggca cgcattgtgc cgggacgatt gctgctttaa acaattcgat tggcgttctt 240
ggcgtagcgc ctagtgcgga actatacgtt gttaaagttt taggagccga cggtagaggt 300
gcaatcagct cgattgccc aagggttgaa tgggcagggg acaatggcat gcacgttgct 360
aatttgagtt taggaagccc ttcgccaagt gccacacttg agcaagctgt taatagcgcg 420
acttctagag gcgttcttgt tgtagcggca tctgggaatt caggtgcaag ctcaatcagc 480
tatccggccc gttatgcgaa cgcaatggca gtccggagcta ctgacccaaa caacaaccgc 540
gccagctttt cacagtatgg cccagggcct gacattatgg caccaggggt aaacattcag 600
agcacatacc caggttcaac gtatgccagc ttaaaccgta catcgatgge tactcctcat 660
gttgccaggtg cagcagccct tgttaaacia aagaacccat cttggtccaa tgtacaaatc 720
cgcaaccatc taaagaatac ggcaacgagc ttaggaagca cgaacttgta tgggaagcga 780
cttgtcaatg cagaagcggc aacacgc
    
```

<210> 22

<211> 269

<212> PRT

5 <213> *Bacillus lentus* DSM 5483

<400> 22

```

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

```

His Asn Arg Gly Leu Thr Gly Ser Gly Val Lys Val Ala Val Leu Asp
          20                               25                               30
    
```

```

Thr Gly Ile Ser Thr His Pro Asp Leu Asn Ile Arg Gly Gly Ala Ser
          35                               40                               45
    
```

```

Phe Val Pro Gly Glu Pro Ser Thr Gln Asp Gly Asn Gly His Gly Thr
          50                               55                               60
    
```

```

His Val Ala Gly Thr Ile Ala Ala Leu Asn Asn Ser Ile Gly Val Leu
    
```

65					70						75				80
Gly	Val	Ala	Pro	Ser	Ala	Glu	Leu	Tyr	Ala	Val	Lys	Val	Leu	Gly	Ala
				85					90					95	
Asp	Gly	Arg	Gly	Ala	Ile	Ser	Ser	Ile	Ala	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ala
			100					105					110		
Gly	Asn	Asn	Gly	Met	His	Val	Ala	Asn	Leu	Ser	Leu	Gly	Ser	Pro	Ser
			115				120					125			
Pro	Ser	Ala	Thr	Leu	Glu	Gln	Ala	Val	Asn	Ser	Ala	Thr	Ser	Arg	Gly
						135						140			
Val	Leu	Val	Val	Ala	Ala	Ser	Gly	Asn	Ser	Gly	Ala	Ser	Ser	Ile	Ser
145					150					155					160
Tyr	Pro	Ala	Arg	Tyr	Ala	Asn	Ala	Met	Ala	Val	Gly	Ala	Thr	Asp	Gln
				165					170					175	
Asn	Asn	Asn	Arg	Ala	Ser	Phe	Ser	Gln	Tyr	Gly	Ala	Gly	Leu	Asp	Ile
			180					185					190		
Val	Ala	Pro	Gly	Val	Asn	Val	Gln	Ser	Thr	Tyr	Pro	Gly	Ser	Thr	Tyr
		195					200					205			
Ala	Ser	Leu	Asn	Gly	Thr	Ser	Met	Ala	Thr	Pro	His	Val	Ala	Gly	Ala
						215					220				
Ala	Ala	Leu	Val	Lys	Gln	Lys	Asn	Pro	Ser	Trp	Ser	Asn	Val	Gln	Ile
225					230					235					240
Arg	Asn	His	Leu	Lys	Asn	Thr	Ala	Thr	Ser	Leu	Gly	Ser	Thr	Asn	Leu
				245					250					255	
Tyr	Gly	Ser	Gly	Leu	Val	Asn	Ala	Glu	Ala	Ala	Thr	Arg			
			260					265							

&lt;210&gt; 23

&lt;211&gt; 269

&lt;212&gt; PRT

5 <213> *Bacillus lentus* DSM 5483 clon M130

&lt;400&gt; 23

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

His Asn Arg Gly Leu Thr Gly Ser Gly Val Lys Val Ala Val Leu Asp  
 20 25 30

Thr Gly Ile Ser Thr His Pro Asp Leu Asn Ile Arg Gly Gly Ala Ser  
 35 40 45

Phe Val Pro Gly Glu Pro Ser Thr Gln Asp Gly Asn Gly His Gly Thr  
 50 55 60

His Val Ala Gly Thr Ile Ala Ala Leu Asn Asn Ser Ile Gly Val Leu  
 65 70 75 80

Gly Val Ala Pro Ser Ala Glu Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu Gly Ala  
 85 90 95

Asp Gly Arg Gly Ala Ile Ser Ser Ile Ala Gln Gly Leu Glu Trp Ala  
 100 105 110

Gly Asn Asn Gly Met His Val Ala Asn Leu Ser Leu Gly Ser Pro Ser  
 115 120 125

Pro Ser Ala Thr Leu Glu Gln Ala Val Asn Ser Ala Thr Ser Arg Gly  
 130 135 140

Val Leu Val Val Ala Ala Ser Gly Asn Ser Gly Ala Ser Ser Ile Ser  
 145 150 155 160

Tyr Pro Ala Arg Tyr Ala Asn Ala Met Ala Val Gly Ala Thr Asp Gln  
 165 170 175

Asn Asn Asn Arg Ala Ser Phe Ser Gln Tyr Gly Pro Gly Leu Asp Ile  
 180 185 190

Met Ala Pro Gly Val Asn Ile Gln Ser Thr Tyr Pro Gly Ser Thr Tyr  
 195 200 205

Ala Ser Leu Asn Gly Thr Ser Met Ala Thr Pro His Val Ala Gly Ala  
 210 215 220

Ala Ala Leu Val Lys Gln Lys Asn Pro Ser Trp Ser Asn Val Gln Ile  
 225 230 235 240

Arg Asn His Leu Lys Asn Thr Ala Thr Ser Leu Gly Ser Thr Asn Leu  
 245 250 255

Tyr Gly Ser Gly Leu Val Asn Ala Glu Ala Ala Thr Arg  
 260 265



Gly Val Ala Pro Ser Ala Glu Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu Gly Ala  
85 90 95

Asp Gly Arg Gly Ala Ile Ser Ser Ile Ala Gln Gly Leu Glu Trp Ala  
100 105 110

Gly Asn Asn Gly Met His Val Ala Asn Leu Ser Leu Gly Ser Pro Ser  
115 120 125

Pro Ser Ala Thr Leu Glu Gln Ala Val Asn Ser Ala Thr Ser Arg Gly  
130 135 140

Val Leu Val Val Ala Ala Ser Gly Asn Ser Gly Ala Ser Ser Ile Ser  
145 150 155 160

Tyr Pro Ala Arg Tyr Ala Asn Ala Met Ala Val Gly Ala Thr Asp Gln  
165 170 175

Asn Asn Asn Arg Ala Ser Phe Ser Gln Tyr Gly Pro Gly Leu Asp Ile  
180 185 190

Met Ala Pro Gly Val Asn Ile Gln Ser Thr Tyr Pro Gly Ser Thr Tyr  
195 200 205

Ala Ser Leu Asn Gly Thr Ser Met Ala Thr Pro His Val Ala Gly Ala  
210 215 220

Ala Ala Leu Val Lys Gln Lys Asn Pro Ser Trp Ser Asn Val Gln Ile  
225 230 235 240

Arg Asn His Leu Lys Asn Thr Ala Thr Ser Leu Gly Ser Thr Asn Leu  
245 250 255

Tyr Gly Ser Gly Leu Val Asn Ala Glu Ala Ala Thr Arg  
260 265

<210> 25  
<211> 1727  
<212> DNA

5 <213> *Bacillus licheniformis* ATCC 53926

<220>  
<221> 5'UTR  
<222> (240)..(313)  
<220>

10 <221> CDS  
<222> (314)..(1450)  
<220>

<221> péptido señal..  
<222> (314)..(397)

15 <220>  
<221> péptido mat..  
<222> (626)..(1447)

<220>  
<221> terminador

- <222> (1394)..(1563)
- <220>
- <221> 3'UTR
- <222> (1451)..(1727)
- 5 <220>
- <221> propiedades diversas
- <222> (84)..(89)
- <223> sitio de restricción Ava I
- <220>
- 10 <221> propiedades diversas
- <222> (376)..(381)
- <223> sitio de restricción Cla I
- <220>
- <221> propiedades diversas
- 15 <222> (638)..(643)
- <223> sitio de restricción Nco I
- <220>
- <221> propiedades diversas
- <222> (950)..(955)
- 20 <223> sitio de restricción Kpn I
- <220>
- <221> propiedades diversas
- <222> (1394)..(1399)
- <223> sitio de restricción Kpn I
- 25 <220>
- <221> propiedades diversas
- <222> (1558)..(1563)
- <223> sitio de restricción Kpn I
- <400> 25

```

gtctcctgga tctcataaaa taaatgaata gtattttcat aaaatgaatc atatggatgc 60
aatctcctgt cattctgctg gcctcggga cctctttccc tcggaggctg aagcggctcta 120
ttcatacttt cgaactgaac atttttctaa aacagttatt aataaccaa aaattttaa 180
ttggtcctcc aaaaaaatag gcctaccata taattcattt tttttctata ataaattaac 240
agaataattg gaatagatta tattatcctt ctatttaaat tattctgaat aaagaggagg 300
agagtgagta atg atg agg aaa aag agt ttt tgg ctt ggg atg ctg acg 349
          Met Arg Lys Lys Ser Phe Trp Leu Gly Met Leu Thr
                    -100                      -95

gcc ttc atg ctc gtg ttc acg atg gca tcg atc gat tcc gct tct gct 397
Ala Phe Met Leu Val Phe Thr Met Ala Ser Ile Asp Ser Ala Ser Ala
          -90                      -85                      -80

gct caa ccg gcg aaa aat gtt gaa aag gat tat att gtc gga ttt aag 445
Ala Gln Pro Ala Lys Asn Val Glu Lys Asp Tyr Ile Val Gly Phe Lys
          -75                      -70                      -65

```

30

tca gga gtg aaa acc gca tct gtc aaa aag gac atc atc aaa gag agc	493
Ser Gly Val Lys Thr Ala Ser Val Lys Lys Asp Ile Ile Lys Glu Ser	
-60 -55 -50 -45	
ggc gga aaa gtg gac aag cag ttt aga atc atc aac gcg gca aaa gcg	541
Gly Gly Lys Val Asp Lys Gln Phe Arg Ile Ile Asn Ala Ala Lys Ala	
-40 -35 -30	
aag cta gac aaa gaa gcg ctt aag gaa gtc aaa aat gat ccg gat gtc	589
Lys Leu Asp Lys Glu Ala Leu Lys Glu Val Lys Asn Asp Pro Asp Val	
-25 -20 -15	
gct tat gtg gaa gag gat cat gtg gcc cat gcc ttg gcg caa acc gtt	637
Ala Tyr Val Glu Glu Asp His Val Ala His Ala Leu Ala Gln Thr Val	
-10 -5 -1 1	
cca tgg ggc att cct ctc att aaa gcg gac aaa gtg cag gct caa ggc	685
Pro Trp Gly Ile Pro Leu Ile Lys Ala Asp Lys Val Gln Ala Gln Gly	
5 10 15 20	
ttt aag gga gcg aat gta aaa gta gcc gtc ctg gat aca gga atc caa	733
Phe Lys Gly Ala Asn Val Lys Val Ala Val Leu Asp Thr Gly Ile Gln	
25 30 35	
gct tct cat ccg gac ttg aac gta gtc ggc gga gca agc ttt gtg gct	781
Ala Ser His Pro Asp Leu Asn Val Val Gly Gly Ala Ser Phe Val Ala	
40 45 50	
ggc gaa gct tat aac acc gac ggc aac gga cac ggc aca cat gtt gcc	829
Gly Glu Ala Tyr Asn Thr Asp Gly Asn Gly His Gly Thr His Val Ala	
55 60 65	
ggt aca gta gct gcg ctt gac aat aca acg ggt gta tta ggc gtt gcg	877
Gly Thr Val Ala Ala Leu Asp Asn Thr Thr Gly Val Leu Gly Val Ala	
70 75 80	
cca agc gta tcc ttg tac gcg gtt aaa gta ctg aat tca agc gga agc	925
Pro Ser Val Ser Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu Asn Ser Ser Gly Ser	
85 90 95 100	
gga tca tac agc ggc att gta agc ggt acc gag tgg gcg aca aca aac	973
Gly Ser Tyr Ser Gly Ile Val Ser Gly Thr Glu Trp Ala Thr Thr Asn	
105 110 115	
ggc atg gat gtt atc aat atg agc ctt ggg gga gca tca ggc tcg aca	1021
Gly Met Asp Val Ile Asn Met Ser Leu Gly Gly Ala Ser Gly Ser Thr	
120 125 130	
gcg atg aaa cag gca gtc gac aat gca tat gca aga ggg gtt gtc gtt	1069
Ala Met Lys Gln Ala Val Asp Asn Ala Tyr Ala Arg Gly Val Val Val	
135 140 145	
gta gct gca gca ggg aac agc gga tct tca gga aac acg aat aca att	1117
Val Ala Ala Ala Gly Asn Ser Gly Ser Ser Gly Asn Thr Asn Thr Ile	
150 155 160	
ggc tat cct gca aaa tac gat tct gtc atc gct gtt ggt gcg gta gac	1165
Gly Tyr Pro Ala Lys Tyr Asp Ser Val Ile Ala Val Gly Ala Val Asp	





Asn Val Lys Val Ala Val Leu Asp Thr Gly Ile Gln Ala Ser His Pro  
 130 135 140  
 Asp Leu Asn Val Val Gly Gly Ala Ser Phe Val Ala Gly Glu Ala Tyr  
 145 150 155 160  
 Asn Thr Asp Gly Asn Gly His Gly Thr His Val Ala Gly Thr Val Ala  
 165 170 175  
 Ala Leu Asp Asn Thr Thr Gly Val Leu Gly Val Ala Pro Ser Val Ser  
 180 185 190  
 Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu Asn Ser Ser Gly Ser Gly Ser Tyr Ser  
 195 200 205  
 Gly Ile Val Ser Gly Thr Glu Trp Ala Thr Thr Asn Gly Met Asp Val  
 210 215 220  
 Ile Asn Met Ser Leu Gly Gly Ala Ser Gly Ser Thr Ala Met Lys Gln  
 225 230 235 240  
 Ala Val Asp Asn Ala Tyr Ala Arg Gly Val Val Val Val Ala Ala Ala  
 245 250 255  
 Gly Asn Ser Gly Ser Ser Gly Asn Thr Asn Thr Ile Gly Tyr Pro Ala  
 260 265 270  
 Lys Tyr Asp Ser Val Ile Ala Val Gly Ala Val Asp Ser Asn Ser Asn  
 275 280 285  
 Arg Ala Ser Phe Ser Ser Val Gly Ala Glu Leu Glu Val Met Ala Pro  
 290 295 300  
 Gly Ala Gly Val Tyr Ser Thr Tyr Pro Thr Asn Thr Tyr Ala Thr Leu  
 305 310 315 320  
 Asn Gly Thr Ser Met Ala Ser Pro His Val Ala Gly Ala Ala Ala Leu  
 325 330 335  
 Ile Leu Ser Lys His Pro Asn Leu Ser Ala Ser Gln Val Arg Asn Arg  
 340 345 350  
 Leu Ser Ser Thr Ala Thr Tyr Leu Gly Thr Ser Phe Tyr Tyr Gly Lys  
 355 360 365  
 Gly Leu Ile Asn Val Glu Ala Ala Ala Gln  
 370 375

## REIVINDICACIONES

1. Una proteasa subtilisina mutante del *Bacillus lentus* DSM 5483, caracterizada por lo menos por una alteración de aminoácido que se traduce en una menor carga positiva o una mayor carga negativa en la región de la bolsa de fijación al sustrato, dicha alteración de aminoácido es R99E, R99G, R99A o R99S con arreglo al recuento de la SEQ ID NO 22.
2. Proteasa mutante según la reivindicación 1, derivada de la proteasa descrita en la SEQ ID NO 22 por la siguiente alteración de aminoácido: R99E, R99G, R99A o R99S.
3. Proteasa mutante según la reivindicación 1, derivada de la proteasa descrita en la SEQ ID NO 24 por la siguiente alteración de aminoácido: R99G, R99A o R99S, con preferencia una proteasa descrita en la SEQ ID NO 11, SEQ ID NO 12, SEQ ID NO 13 o SEQ ID NO 17.
4. Proteasa mutante según la reivindicación 1, derivada de la proteasa descrita en la SEQ ID NO 23 por una de las siguientes alteraciones de aminoácido: R99G, R99A o R99S, con preferencia una proteasa descrita en la SEQ ID NO 10.
5. Composición detergente que contiene por lo menos un tensioactivo y una proteasa subtilisina mutada según una de las reivindicaciones de 1 a 4.
6. Una composición detergente según la reivindicación 5 que contiene una cantidad proteolíticamente activa de dicha proteasa mutada, dicha proteasa tiene una relación de actividad queratinasa/caseinasa (proporción KC) inferior a 0,80, con preferencia inferior a 0,70, con mayor preferencia entre 0,2 y 0,65.
7. Una composición detergente según la reivindicación 6 para el lavado de tejidos compuestos por fibras proteinogénicas.
8. Una composición detergente según una de las reivindicaciones de 5 a 7, en la que dicha proteasa tiene una actividad proteolítica de 100 PU/g a 7500 PU/g.
9. Una composición detergente según una de las reivindicaciones de 5 a 8, en la que dicha proteasa se codifica con la SEQ ID NO 10, SEQ ID NO 11, SEQ ID NO 12, SEQ ID NO 13 o SEQ ID NO 17.
10. Una composición detergente según una de las reivindicaciones de 5 a 9, en la que dicho por lo menos un tensioactivo contiene un tensioactivo no iónico elegido entre el grupo formado por un poliglucósido alquil-graso, un polialcoxilato alquil-graso, una polihidroxiamida de ácidos grasos, una alquilamina grasa etoxilada, una alquilamina grasa propoxilada, un diol vecinal etoxilado, un diol vecinal propoxilado, un éster de alquilo de ácido graso etoxilado, un éster de alquilo de ácido graso propoxilado, una amida de ácido graso etoxilado, una amida de ácido graso propoxilado y mezclas de los mismos.
11. Una composición detergente según la reivindicación 10, en la que dicho tensioactivo no iónico está presente en una cantidad del 2% al 25% en peso.
12. Una composición detergente según la reivindicación 10 ó 11, que contiene además un tensioactivo aniónico, elegido entre el grupo formado por: un sulfato de alquil-graso, un éter-sulfato de alquil-graso, un éster de ácido sulfo-graso, una disal de ácido sulfo-graso y combinaciones de los mismos.
13. Una composición detergente según una de las reivindicaciones de 5 a 9, en la que dicho por lo menos un tensioactivo contiene un tensioactivo aniónico elegido entre el grupo formado por un sulfato de alquil-graso, un éter-sulfato de alquil-graso, un éster de ácido sulfo-graso, una disal de ácido sulfo-graso y combinaciones de los mismos.
14. Una composición detergente según la reivindicación 12 ó 13, en la que dicho tensioactivo aniónico está presente en una cantidad del 2% al 25% en peso.
15. Una composición detergente según una de las reivindicaciones de 12 a 14, en la que dicho tensioactivo aniónico se elige entre el grupo formado por un sulfato de alquilo, un sulfato de alquenilo, un éter-sulfato de alquilo, un éter-sulfato de alquenilo, dichos grupos alquilo o alquenilo contienen de 8 a 22 átomos de carbono, con preferencia de 12 a 18 átomos de carbono.
16. Una composición detergente según una de las reivindicaciones de 5 a 15, que contiene además una sustancia soporte (builder) elegida entre el grupo formado por un alumosilicato de metal alcalino, un silicato cristalino de metal alcalino con un módulo superior a 1, un policarboxilato monomérico, un policarboxilato polimérico y mezclas de los mismos.
17. Una composición detergente según la reivindicación 16, en la que dicha sustancia soporte está presente en una cantidad del 2,5% al 60% en peso.
18. Una composición detergente según una de las reivindicaciones de 5 a 17 que contiene además del 20% al 55% en peso de una sustancia soporte inorgánica; hasta el 15% en peso de una sustancia soporte orgánica soluble en agua; del 2,5% al 20% en peso de un tensioactivo aniónico; del 1% al 20% en peso de un tensioactivo no iónico; hasta el 25% en peso de un agente blanqueante; hasta el 8% en peso de un activador de blanqueo;

hasta el 20% en peso de una sal inorgánica; del 0,4% al 1,2% en peso de lipasas, cutinasas, amilasas, celulasas, pululanasas, oxidasas o peroxidasas.

19. Una composición detergente según la reivindicación 18, en la que dicha sal inorgánica es un carbonato de metal alcalino, un hidrogenocarbonato de metal alcalino o un sulfato de metal alcalino.
- 5 20. Un método para lavar materiales textiles, que consiste en poner en contacto dichos materiales textiles con una composición detergente según una de las reivindicaciones de 5 a 19.
21. Un método para lavar materiales textiles según la reivindicación 20, en el que dichos materiales textiles están compuestos por fibras proteinogénicas.
- 10 22. Un método según las reivindicaciones 20 ó 21 para eliminar las manchas de la ropa que tenga manchas no solo de sangre sino también de huevo.

AvaI

ctcgggaacctcttccctgccaggctgaagcggtc  
gagccctggagaaagggacggtccgacttcgccag

tattcatactttcgaactgaacatTTTTctaaaac  
ataagtatgaaagcttgacttgtaaaaagatTTTg

agttattaataaccaaaaaattTTTaaattggtcct  
tcaataattattggtTTTTTaaaatttaaccagga

caaaaaaataggcctaccatataattcattTTTT  
ggtTTTTTatccggatggtatattaagtaaaaa

ttctataataaattaacagaataattggaatagat  
aagatattatttaattgtcttattaaccttatcta

tatattatccttctattttaattattctgaataaa  
atataataggaagataaatttaataagacttattt

gaggaggagagtgagtaatgatgaggaaaaagagt  
ctcctcctctcactcattactactcctTTTTctca

TTTTggcttgggatgctgacggccttcattgctcgt  
aaaaccgaaccctacgactgccggaagtacgagca

ClaI

gttcacgatggcatcgat  
caagtgctaccgtagcta

FIG. 1