

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 368 943**

51 Int. Cl.:  
**C12N 9/18** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06776589 .1**  
96 Fecha de presentación: **03.08.2006**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1910532**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **16.04.2008**

54 Título: **USO DE ESTERASAS PARA SEPARAR MATERIALES PLÁSTICOS.**

30 Prioridad:  
**05.08.2005 DE 102005037659**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**23.11.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**23.11.2011**

73 Titular/es:  
**HENKEL AG & CO. KGAA  
HENKELSTRASSE 67  
40589 DÜSSELDORF, DE**

72 Inventor/es:  
**MICHEL, Andreas;  
PÜTZ, André;  
MAURER, Karl-Heinz;  
EGGERT, Thorsten y  
JÄGER, Karl-Erich**

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

**ES 2 368 943 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Uso de esterasas para separar materiales plásticos.

5 La presente invención se refiere a detergentes o productos de limpieza que contienen para-nitrobencilesterasas (pNB-esterasas) y a su uso en el acabado de fibras, sobre todo de tipo sintético, a los correspondientes procesos de limpieza y purificación, así como a otras posibles aplicaciones técnicas. Especialmente se refiere al uso de pNB-esterasas como protección contra el "pilling" (formación de bolitas) o para disminuir o evitar su aparición, sobre todo en tejidos, en particular de fibras sintéticas, concretamente de fibras de poliéster, así como al uso de pNB-esterasas para separar materiales plásticos, en particular compuestos de poliéster.

10 Las esterasas constituyen en general un grupo de enzimas hidrolíticas con una gran variedad natural de sustratos y tipos de reacción. La especificidad del sustrato y la activación enzimática difiere respecto a las lipasas. De éstas es sabido que se activan mediante la interfase lípido/agua antes de hidrolizar sustratos insolubles en agua con ácidos grasos de cadena larga. Según Arpigny (Arpigny, Jäger, 1999 Biochem. J. 343, p. 177-183) hay que distinguir tres clases de esterasas (EC 3.1.1): las auténticas lipasas (EC 3.1.1.3), las carboxilesterasas (EC 3.1.1.1) y varios tipos de fosfolipasas. De todos modos las funciones fisiológicas de muchas esterasas, como p.ej. las para-nitrobencil-esterasas (pNB-esterasas), no se han aclarado hasta la fecha. Los enzimas esterolíticos se caracterizan usualmente por poseer regiones conservadas que comprenden la tríada catalítica y también por su capacidad de catalizar un amplio espectro de reacciones. En unas condiciones de reacción definidas cada hidrolasa tiene para un determinado sustrato una preferencia estérica específica que puede designarse como su huella dactilar característica. Las esterasas pueden usarse para hidrolizar enzimáticamente ésteres de ácidos carboxílicos a sus correspondientes ácidos carboxílicos y alcoholes. También pueden emplearse para transesterificaciones y síntesis de ésteres. Su capacidad de actuación en sistemas tanto acuosos como no acuosos hace que las esterasas sean herramientas valiosas para la síntesis orgánica. En este caso las esterasas tienen especial interés en la síntesis de productos enantioméricamente puros.

15 Como condición previa para el uso comercial de las esterasas es deseable disponer de más información acerca de las propiedades biocatalíticas de las esterasas que catalizan la conversión de compuestos orgánicos.

20 Como "pilling" se entiende la extracción por fricción de fibrillas delgadas de tejidos o géneros de punto, las cuales se enrollan formando bolitas (borra, nódulos) y luego solo quedan unidas a la superficie del tejido o malla mediante unas pocas fibras sueltas. Cuando son de fibras sintéticas, estas pequeñas bolitas están firmemente adheridas a la superficie del tejido. Por lo tanto se buscan soluciones que por una parte reduzcan los nódulos ya desarrollados (desaglomeración) y por otra protejan las fibras contra su formación, a fin de evitar que aparezcan las antiestéticas bolitas.

25 Es conocido el uso de celulosas para el acabado "anti-pilling" del algodón y de otras fibras o tejidos naturales. Sin embargo las celulosas son poco adecuadas para tratar la formación de nódulos o bolitas de fibras sintéticas, como por ejemplo las de poliéster o las acrílicas.

30 Por consiguiente la presente invención tenía por objeto encontrar nuevas vías que fueran apropiadas para contrarrestar el "pilling", especialmente de fibras de poliéster o acrílicas, y/o para cortar o descomponer las estructuras de tipo nodular en formación. Otro objetivo era proporcionar nuevas esterasas, sobre todo para su uso en detergentes y/o productos de limpieza.

35 Estos objetivos se logran mediante el uso de pNB-esterasas para el acabado de fibras, sobre todo de tipo sintético, particularmente para el acabado "anti-pilling" en detergentes y productos de limpieza, así como en agentes de acabado de tejidos, sobre todo en productos para su tratamiento previo y/o posterior que contengan pNB-esterasas, en procesos adecuados de acabado, limpieza y purificación, y mediante el uso de pNB-esterasas en detergentes y productos de limpieza, así como en otras posibles aplicaciones técnicas. La presente invención se refiere especialmente al uso de pNB-esterasas como protección contra el "pilling" (formación de bolitas) o para disminuir o evitar su aparición, sobre todo en tejidos, en particular los de fibras sintéticas, concretamente de fibras de poliéster, así como al uso de pNB-esterasas para separar materiales plásticos, en particular compuestos de poliéster.

40 Cuando se evita el "pilling" o se reducen las bolitas formadas sobre las fibras, especialmente en los tejidos, la prenda se hace más confortable, debido ante todo a una mayor suavidad, y conserva por más tiempo su buen aspecto.

45 Además se ofrecen detergentes y productos de limpieza apropiados y procesos idóneos de limpieza y purificación, así como posibilidades de empleo para este tipo de esterasas.

50 La solución estriba en el uso de para-nitrobencilesterasas (pNB-esterasas), sobre todo de aquellas que se pueden obtener a partir de microorganismos, en concreto de bacterias, preferentemente de bacterias del género *Bacillus*.

55 Para usar en los productos de la presente invención y en otras aplicaciones de la misma mencionadas más adelante son especialmente adecuadas las esterasas que, según los métodos citados bajo 2.4 en el apartado de ejemplos,

muestran una actividad específica frente al sustrato bis-(p-metilbenzoato) de etilenglicol de 0,1 hasta 30, preferiblemente de 0,6 hasta 20, especialmente de 0,7 hasta 15, con mayor preferencia de 0,9 hasta 10, sobre todo de 1 hasta 5, particularmente de 1,1 hasta 4, con mucha mayor preferencia de 1,5 hasta 3 ( $\mu$ moles de ácido liberado)/(min-mg de enzima). Estas esterasas han resultado especialmente ventajosas al usarlas en los productos o aplicaciones y métodos de la presente invención.

Son especialmente idóneas las esterasas con secuencias de aminoácidos idénticas a las indicadas en el protocolo de secuencias como SEQ ID NO. 1, 2, 4, 6, 11-14, 20-26, al menos en un 50%, preferiblemente en un 60%, especialmente en un 70%, preferentemente en al menos un 80%, con especial preferencia en al menos un 90%, preferiblemente en un 95% y sobre todo en un 100%, u homólogas de las mismas en al menos un 80%, preferiblemente en al menos un 85%, con especial preferencia en al menos un 90%, preferentemente en al menos un 95% y sobre todo en un 100%.

Se facilitan detergentes y productos de limpieza apropiados y procesos idóneos de limpieza y purificación, así como posibilidades de empleo para este tipo de esterasas. Por último se definen posibles aplicaciones técnicas para las esterasas encontradas.

Para usar en los productos de la presente invención y también en otras aplicaciones de la misma mencionadas más adelante son especialmente adecuadas las esterasas homólogas de la secuencia proteica indicada como SEQ ID NO. 12 en al menos un 50%, al menos un 55%, especialmente en al menos un 60%, preferiblemente en al menos un 65%, con especial preferencia en al menos un 70%, preferentemente en al menos un 75%, muy preferentemente en al menos un 80%, con especial preferencia en al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 99%, sobre todo un 100%.

Homologar es comparar una secuencia de ácido nucleico o de aminoácidos con la de genes o proteínas conocidos. Se hace, por ejemplo, por alineamiento. El grado de homología es un porcentaje de identidad como el que puede determinarse, por ejemplo, siguiendo el método indicado por D. J. Lipman y W. R. Pearson en Science 227 (1985), p. 1435-1441. Este dato puede referirse a toda la proteína o a la región correspondientemente relacionada. Un concepto de homología más amplio, la analogía, se refiere también a las variaciones conservadas, es decir aminoácidos con una actividad química similar a la observada, pues dentro de la proteína suelen desarrollar actividades químicas parecidas. En el caso de los ácidos nucleicos solo se conoce el porcentaje de identidad.

Por homologación pueden deducirse de la secuencia de ácido nucleico o de nucleótidos las funciones de regiones individuales de la misma, así como la actividad enzimática de todo el enzima en cuestión. Las regiones homólogas de proteínas distintas son aquellas que tienen funciones comparables y pueden reconocerse por identidad o por sustituciones conservadas en la secuencia principal de aminoácidos. Incluyen aminoácidos individuales, regiones muy pequeñas, llamadas cajas, formadas por pocos aminoácidos, hasta regiones de mayor longitud en la secuencia de aminoácidos. Por tanto las funciones de las regiones homólogas también incluyen las funciones parciales más pequeñas entre las ejercidas por la proteína íntegra, como por ejemplo la creación de enlaces individuales de puente de hidrógeno para complejar un sustrato o formar un complejo de transición. Otras regiones de la proteína que no intervienen propiamente en la reacción enzimática pueden modificarse de manera cualitativa o cuantitativa. Ello se refiere por ejemplo a la estabilidad del enzima, a la actividad, a las condiciones de reacción o a la especificidad del sustrato.

El término esterasa se refiere a un enzima con actividad de esterasa o a una esterasa. Por lo tanto, además de las funciones de los pocos restos de aminoácido que forman parte del centro catalíticamente activo también entran en consideración todas las funciones resultantes del efecto de toda la proteína restante, o de una o más de sus partes, en las regiones con auténtica actividad catalítica. En la presente invención también se consideran como actividad esterolítica aquellas funciones modificadoras o actividades parciales coadyuvantes de una reacción de esterasa. A dichas funciones auxiliares o actividades parciales pertenece por ejemplo la fijación de un sustrato, un producto intermedio o final, la activación o inhibición o intervención reguladora de la actividad hidrolítica. También puede tratarse, por ejemplo, de la formación de un elemento estructural alejado del centro activo. La segunda condición para ser una proteína con actividad de esterasa, según la presente invención, es naturalmente que la acción química de los restos propiamente activos, bien sola o por efecto adicional de las partes modificadoras, produzca una hidrólisis de los enlaces éster. Asimismo es posible modificar cualitativa o cuantitativamente las actividades de otras esterasas mediante una o más partes de la proteína según la presente invención, por ejemplo. Esta influencia en otros factores también se considera como actividad de esterasa. También son enzimas activos aquellas esterasas cuya actividad es bloqueada en un momento determinado, por ejemplo mediante un inhibidor. Lo importante es su aptitud esencial para la correspondiente reacción de esterasa.

En el sentido de la presente invención las para-nitrobencil-esterasas son aquellos enzimas capaces de catalizar la hidrólisis del para-nitrofenilacetato. Igualmente se prefieren todos los enzimas designados como para-nitrobencil-esterasas en el banco de datos y se incluyen en las para-nitrobencil-esterasas de la presente invención.

Se prefieren especialmente aquellas esterasas que, según los métodos citados bajo 2.4 en el apartado de ejemplos, muestran una actividad específica frente al sustrato bis-(p-metilbenzoato) de etilenglicol de 0,1 hasta 30, preferi-

blemente de 0,6 hasta 20, especialmente de 0,7 hasta 15, con mayor preferencia de 0,9 hasta 10, sobre todo de 1 hasta 5, particularmente de 1,1 hasta 4, con mucha mayor preferencia de 1,5 hasta 3  $\mu$ moles de ácido liberado/min-mg de enzima. Estas esterases han resultado especialmente útiles al usarlas en los productos o aplicaciones y métodos de la presente invención.

5 Se prefieren especialmente las esterases homólogas de la secuencia proteica indicada como SEQ ID NO. 12 en al menos un 50%, al menos un 55%, especialmente en al menos un 60%, preferiblemente en al menos un 65%, con especial preferencia en al menos un 70%, preferentemente en al menos un 75%, muy preferentemente en al menos un 80%, con especial preferencia en al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 99%. Se  
10 prefiere sobre todo la esterasa según la Seq ID nº 12 o fragmentos de esta esterasa, especialmente aquellos que poseen actividad de esterasa. Estas esterases presentan en particular una estabilidad sorprendentemente buena a temperaturas y valores de pH elevados. Se encontró que estas esterases eran estables o activas durante mucho tiempo a valores de pH alcalinos, incluso a una temperatura igual o superior a 60°C.

15 Por lo tanto las esterases de la presente invención son especialmente idóneas para usar a pH alcalino y a temperaturas altas, particularmente en detergentes para lavado en caliente, que suelen dar un pH alcalino, y sobre todo en detergentes de ropa blanca (temperatura de lavado 95°C).

20 En el sentido de la presente invención todos los enzimas, proteínas, fragmentos, proteínas de fusión y derivados se incluyen en el término general proteínas, a no ser que deban citarse explícitamente como tales.

25 Como rendimiento de un enzima se entiende su eficacia en el ámbito técnico considerado, preferiblemente en el marco de un agente expresamente desarrollado. Se basa en la propia actividad enzimática, pero además depende de otros factores relevantes para el correspondiente proceso, como por ejemplo la estabilidad, la unión al sustrato, la interacción con el material soporte del sustrato o con otros ingredientes, y sobre todo de las sinergias.

30 En el sentido de la presente solicitud de patente, poder de lavado o poder detergente de un producto de limpieza se refiere al efecto que el producto en cuestión produce en los artículos sucios, por ejemplo en tejidos u objetos con superficies duras. Se evalúa la contribución de cada componente de dicho producto, por ejemplo de cada enzima, al poder de lavado o poder detergente de todo el detergente o producto de limpieza, pues de las características enzimáticas de un enzima no puede deducirse sin más su contribución al poder detergente de un producto. Aquí juegan otros factores como por ejemplo la estabilidad, la unión al sustrato, la unión al objeto lavado o las interacciones con otros ingredientes del detergente o del producto de limpieza, sobre todo las sinergias, durante la eliminación de la suciedad.

35 La presente invención se basa en el conocimiento de que las p-nitrobencilesterasas, en particular aquellos enzimas que se hallan de forma natural en bacterias, sobre todo del género *Bacillus*, particularmente de las especies *Bacillus licheniformis* y *subtilis*, son adecuadas para disminuir o evitar la formación de nódulos ("pilling") sobre fibras textiles o tejidos.

40 Los poliésteres son polímeros cuyos eslabones están unidos mediante enlaces éster. Los homopolíésteres pueden dividirse en dos grupos según su estructura química, los tipos de ácido hidroxicarboxílico (poliéster AB) y los tipos de ácido dihidroxidicarboxílico (poliéster AA-BB). Los primeros se obtienen a partir de un solo monómero p.ej. por policondensación de un ácido w-hidroxicarboxílico o polimerización de un éster cíclico (lactona) por apertura del anillo.  
45 En cambio los últimos se forman por policondensación de dos monómeros complementarios, p.ej. un diol y un ácido dicarboxílico. Se obtienen poliésteres ramificados y reticulados mediante la policondensación de alcoholes tri- o polifuncionales con ácidos carboxílicos polifuncionales. A los poliésteres también pertenecen genéricamente los policarbonatos (poliésteres del ácido carbónico). Los poliésteres del tipo AB (I) son, entre otros, ácidos poliglicólicos (*poliglicólicos*, R = CH<sub>2</sub>), ácidos polilácticos (*poliláctidos*, R = CH-CH<sub>3</sub>), poli(ácidoβ -hidroxibutírico) [*poli(ácido 3-hidroxibutírico*, R = CH(CH<sub>3</sub>)-CH<sub>2</sub>], poli-ε-caprolactonas [R = (CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>] y ácidos polihidroxibenzoicos (R = C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>).

50 Los poliésteres del tipo AA-BB (II) puramente alifáticos son policondensados de dioles y ácidos dicarboxílicos alifáticos que, entre otras aplicaciones, se usan como productos con grupos hidroxilo terminales (como polidioles) para preparar poliésteres poliuretánicos [p.ej. politetrametilenadipato, R<sup>1</sup> = R<sup>2</sup> = (CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>]. Cuantitativamente tienen gran importancia industrial los poliésteres del tipo AA-BB formados por dioles alifáticos y ácidos dicarboxílicos aromáticos, sobre todo los polialquilentereftalatos [R<sup>2</sup> = C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>, siendo el polietilentereftalato (PET) R<sup>1</sup> = (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>, el polibutilentereftalato (PBT) R<sup>1</sup> = (CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub> y el poli(1,4-ciclohexandimetilen-tereftalato (PCDT) R<sup>1</sup> = CH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>-CH<sub>2</sub>] los más representativos. Las propiedades de estos tipos de poliéster se pueden modificar y adaptar ampliamente a distintos campos de aplicación, usando en la policondensación otros ácidos dicarboxílicos aromáticos (p.ej. ácido isoftálico) o mezclas de dioles.  
60

65 Son poliésteres aromáticos puros los poliariatos, a los cuales pertenecen los poli(ácido 4-hidroxibenzoico) (fórmula I, R = C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), los policondensados de bisfenol A y ácidos ftálicos (fórmula II, R<sup>1</sup> = C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>, R<sup>2</sup> = C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>) o también los de bisfenoles y fosgenos).

Además de los poliésteres saturados ya citados también se pueden preparar poliésteres insaturados partiendo de

ácidos dicarboxílicos insaturados, los cuales, como resinas de poliéster, concretamente de poliéster insaturado (UP), han adquirido gran importancia técnica.

5 En la naturaleza también se encuentran poliésteres, como los formados por ácidos hidroxicarboxílicos (por ejemplo: dépsidos y depsipéptidos). El ácido poli(β-hidroxibutírico) sirve como sustancia de reserva en muchas bacterias. Las abejas minadoras producen poliésteres a partir de los ácidos 18-hidroxiocetadecanoico y 20-hidroxiicosenoico para revestir sus nidos.

10 Las pNB-esterasas se caracterizan por proporcionar una protección especialmente buena de las fibras textiles contra la formación de bolitas.

15 Son para-nitrobencilesterasas (p-nitrobencilesterasas, pNB-esterasas, EST-B) especialmente apropiadas en el sentido de la presente invención enzimas como los descritos en las solicitudes de patente US 5,468,632, US 5,906,930, US 5,945,325, EP 0549264.

20 También se prefiere especialmente el uso de para-nitrobencilesterasas con una secuencia de aminoácidos que sea idéntica de la indicada en SEQ ID NO. 1, 2, 4, 6, 11-14 o 20-25 al menos en un 50%, preferiblemente en al menos un 60%, especialmente en al menos un 70%, al menos en un 80%, al menos en un 85%, al menos en un 86%, al menos en un 87%, al menos en un 88%, al menos en un 89%, al menos en un 90%, al menos en un 91%, al menos en un 92%, al menos en un 93%, al menos en un 94%, al menos en un 95%, al menos en un 96%, al menos en un 97%, al menos en un 98%, al menos en un 99%, al menos en un 95% o en un 100% y/u homóloga de la misma %, al menos en un 80%, al menos en un 85%, al menos en un 86%, al menos en un 87%, al menos en un 88%, al menos en un 89%, al menos en un 90%, al menos en un 91%, al menos en un 92%, al menos en un 93%, al menos en un 94%, al menos en un 95%, al menos en un 96%, al menos en un 97%, al menos en un 98%, al menos en un 99%, al menos en un 95% o en un 100%.

25 Se prefieren especialmente aquellas p-nitrobencilesterasas que son idénticas en un 95%, con especial preferencia en un 98%, sobre todo en un 100%, a las secuencias de aminoácidos indicadas (1, 2, 4, 6, 11-14, 20-25).

30 En este caso se prefieren aquellas esterasas que según los métodos citados bajo 2.4 en el apartado de ejemplos, muestran una actividad específica frente al substrato bis-(p-metilbenzoato) de etilenglicol de 0,1 hasta 30, preferiblemente de 0,6 hasta 20, especialmente de 0,7 hasta 15, con mayor preferencia de 0,9 hasta 10, sobre todo de 1 hasta 5, particularmente de 1,1 hasta 4, con mucha mayor preferencia de 1,5 hasta 3 (μmoles de ácido liberado)/(min·mg de enzima). Estas esterasas han resultado especialmente ventajosas al usarlas en los productos o aplicaciones y métodos de la presente invención.

35 Se prefieren especialmente aquellas esterasas que son homólogas de la secuencia proteica indicada como Seq. ID n° 12 en al menos un 50%, %, al menos en un 55%, especialmente en al menos un 60%, preferentemente en al menos un 65%, con especial preferencia en al menos un 70%, preferiblemente en al menos un 75%, sobre todo en un 80%, con especial preferencia en al menos un 85%, al menos en un 90%, al menos en un 95%, al menos en un 99%, sobre todo en un 100%.

40 Otro objeto de la presente invención es el uso de p-nitrobencilesterasas para separar polialquiltereftalatos, en concreto polietilentereftalatos (abreviados PET o PETE).

45 Las esterasas también pueden emplearse para separar o descomponer plásticos, sobre todo poliésteres y/o plastificantes contenidos en los plásticos. En los plásticos se utilizan frecuentemente ftalatos como plastificantes, a fin de mejorar sus propiedades para la transformación y el uso.

50 La presente invención se refiere a la separación parcial o total de piezas de moldeo, materiales textiles, revestimientos, uniones adhesivas o espumas de polímeros biológicamente degradables con enzimas. Sobre todo se refiere a la degradación enzimática de poliésteres. El método para descomponer polímeros se puede llevar a cabo de varias maneras:

55 El polímero se añade a la solución acuosa enzimática. El polímero biológicamente degradable puede añadirse en forma de film, lámina o granulado. Las piezas moldeadas pueden añadirse tal cual o trituradas. Los materiales revestidos o adheridos o los materiales recubiertos o pegados con polímeros biológicamente degradables, como, por ejemplo, papel o cartón y papel o cartón revestido, pueden incorporarse enteros o triturados a la solución enzimática.

60 Asimismo, la solución acuosa enzimática puede aplicarse o proyectarse por pulverización sobre el revestimiento o pieza moldeada que debe descomponerse.

65 Según la presente invención el método descrito de descomposición enzimática de polímeros biológica y enzimáticamente degradables y las mezclas elaboradas con los mismos se puede emplear, por ejemplo, para la inclusión de sustancias químicas, principios activos, hormonas, agentes auxiliares, enzimas, microorganismos, semillas vegetales (p.ej. en cápsulas y microcápsulas) y su liberación controlada mediante el uso de enzimas.

Así pues, aplicando el método de la presente invención, p.ej. en plantas procesadoras de basura, el medioambiente se puede librar rápidamente de polímeros biológicamente degradables o de sus mezclas.

5 Para ello se prefieren especialmente aquellas esterazas que según los métodos citados bajo 2.4 en el apartado de ejemplos, muestran una actividad específica frente al substrato bis-(p-metilbenzoato) de etilenglicol de 0,1 hasta 30, preferiblemente de 0,6 hasta 20, especialmente de 0,7 hasta 15, con mayor preferencia de 0,9 hasta 10, sobre todo de 1 hasta 5, en particular de 1,1 hasta 4, con mucha mayor preferencia de 1,5 hasta 3 ( $\mu$ moles de ácido liberado)/(min·mg de enzima). Estas esterazas han resultado especialmente ventajosas al usarlas en los productos o aplica-  
10 ciones y métodos de la presente invención.

Se prefieren especialmente aquellas esterazas que son homólogas de la secuencia proteica indicada como Seq. ID nº 12 en al menos un 50%, %, al menos en un 55%, especialmente en al menos un 60%, preferentemente en al menos un 65%, con especial preferencia en al menos un 70%, preferiblemente en al menos un 75%, sobre todo en un 80%, con especial preferencia en al menos un 85%, al menos en un 90%, al menos en un 95%, al menos en un 99%, sobre todo en un 100%. También se prefieren especialmente aquellas mutaciones del enzima indicado como SEQ ID NO. 12 que mejoran aún más el efecto según la presente invención.

20 La secuencia nucleótida de una esteraza de *Bacillus subtilis* (17A1) utilizable según la presente invención está indicada en el protocolo de secuencias de la presente solicitud como SEQ ID NO. 3. Comprende 1470 pb. La secuencia aminoácida derivada de ésta se indica en SEQ ID NO. 1. Comprende 489 aminoácidos, seguidos de un codón de parada.

25 La secuencia nucleótida de una esteraza de *Bacillus licheniformis* (19C5) utilizable según la presente invención está indicada en el protocolo de secuencias de la presente solicitud como SEQ ID NO. 4. Comprende respectivamente 1470 pb. La secuencia aminoácida derivada de la misma se indica en SEQ ID NO. 2. Comprende 489 aminoácidos, seguidos de un codón de parada.

30 Por sus reconocibles coincidencias y su relación con las otras esterazas señaladas dichas esterazas pueden considerarse como p-nitrobencilesterazas.

Por lo tanto un objeto especial de la presente invención es el uso conforme a la misma de una esteraza con una secuencia aminoácida idéntica a las indicadas en SEQ ID NO. 1, 2, 5 o 6, al menos en un 70%.

35 Es más preferible el uso de aquellas esterazas cuya secuencia aminoácida es idéntica a las indicadas en SEQ ID NO. 1, 2, 5 o 6, sobre todo 1 o 2, respectivamente en un 72%, 74%, 76%, 78%, 80%, 82%, 84%, 85%, 86%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% y 100%. Es de esperar que sus propiedades sean crecientemente análogas a las de las esterazas encontradas.

40 La forma de ejecución más preferida de este objeto de la presente invención es el empleo de una esteraza cuya secuencia aminoácida sea totalmente idéntica a las indicadas en SEQ ID NO. 1, 2, 5 o 6.

En este caso se trata de la nueva esteraza de *Bacillus subtilis* o *licheniformis* hallada y disponible por la presente invención.

45 Estas esterazas no se conocen en el estado técnico actual. Tal como se indica en los ejemplos se pueden aislar, producir y utilizar. Además se caracterizan porque, cuando se usan en un medio adecuado, su rendimiento se aproxima o incluso aventaja al de los enzimas arraigados para tal fin.

50 Como punto de partida para el desarrollo de esterazas de uso industrial en detergentes puede servir un enzima natural de origen microbiano, que luego puede optimizarse mediante métodos mutagénicos conocidos, como por ejemplo mutagénesis puntual, fragmentación, delección, inserción o fusión con otras proteínas o partes de proteínas u otras modificaciones según la aplicación deseada. Estas optimizaciones pueden ser, por ejemplo, adaptaciones a la influencia de la temperatura, a oscilaciones del pH, a condiciones redox y/o a otros factores relevantes para el sector  
55 técnico de aplicación. Es deseable, por ejemplo, una mejora de la estabilidad a la oxidación, de la resistencia a los agentes desnaturizantes o a la descomposición proteolítica, a las temperaturas altas, a medios ácidos o fuertemente alcalinos, una disminución de la actividad inmunogénica o del efecto alérgico.

60 Los métodos mutagénicos se basan en una de las correspondientes secuencias nucleótidas, indicadas en SEQ ID NO. 3, 4, 7 u 8, o en secuencias nucleótidas suficientemente similares a ellas. Los correspondientes métodos de biología molecular están descritos en el estado técnico, por ejemplo en manuales como el de Fritsch, Sambrook y Maniatis "Molecular cloning: a laboratory manual", Cold Spring Harbour Laboratory Press, Nueva York, 1989. Una forma de ejecución preferida consiste en usar todas las proteínas enumeradas hasta ahora, las cuales se caracteri-  
65 zan por haberse obtenido mediante derivación adicional.

Como derivados se entienden las proteínas resultantes de modificar adicionalmente las mencionadas proteínas.

Estas modificaciones pueden influir por ejemplo en la estabilidad, en la especificidad del sustrato o en la fuerza de unión al mismo, o en la actividad enzimática. También pueden servir para disminuir la capacidad inmunogénica o alérgica de la proteína, aumentando así, por ejemplo, su compatibilidad con la piel.

5 Estos procesos de derivación pueden ser por ejemplo biológicos, tal vez relacionados con la síntesis proteica del organismo huésped productor. En tal caso cabe destacar los acoplamientos de compuestos de bajo peso molecular, como lípidos u oligosacáridos.

10 No obstante los procesos de derivación también pueden ser químicos, como es el caso de la transformación química de una cadena lateral o la unión covalente de otro compuesto, por ejemplo macromolecular, a la proteína. Así, por ejemplo, es posible acoplar aminas a grupos carboxilo de un enzima, para variar su punto isoeléctrico. Se pueden fijar, por ejemplo, macromoléculas de tipo proteico a proteínas de la presente invención, mediante compuestos químicos más o menos bifuncionales. Por ejemplo, una proteína de la presente invención se puede dotar de un dominio de fijación mediante un conector. Estos derivados son especialmente adecuados para los detergentes o productos de limpieza. De modo análogo a la patente WO 00/01831 también pueden unirse inhibidores de esterasas mediante conectores, en concreto aminoácidos conectores, a las proteínas de la presente invención. Los acoplamientos con otros compuestos macromoleculares, como por ejemplo polietilenglicol, mejoran otras propiedades de la molécula como la estabilidad o la compatibilidad con la piel.

20 En un sentido más amplio, también pueden considerarse derivados de las proteínas de la presente invención los preparados de estas enzimas. Según su proceso de obtención, elaboración o preparación una proteína va asociada con diversas sustancias, procedentes por ejemplo del cultivo de los microorganismos productores. Una proteína también puede estar mezclada selectivamente con ciertas sustancias, por ejemplo, para aumentar su estabilidad. Por tanto cualquier preparado de una proteína de la presente invención se incluye en ésta, independientemente del hecho de que en un determinado preparado despliegue o no esta actividad enzimática, pues puede ser conveniente que tenga poca o ninguna actividad durante el almacenamiento y solo ejerza su función estereofítica en el momento del uso, lo cual puede regularse, por ejemplo, mediante sustancias auxiliares adecuadas.

30 Una forma de ejecución preferida consiste en utilizar todas las proteínas mencionadas hasta ahora, con la característica adicional de estar estabilizadas.

35 Así se aumenta su estabilidad durante su almacenamiento y/o uso, por ejemplo durante el proceso de lavado, con lo cual se prolonga y refuerza su acción. La estabilidad de las esterasas de la presente invención se puede aumentar, por ejemplo, acoplándolas a polímeros. Para ello es necesario unir las proteínas a tales polímeros, mediante una etapa de acoplamiento químico, antes de utilizarlas en los medios correspondientes.

40 Se prefieren las estabilizaciones por mutagénesis puntual de la propia molécula, porque no requieren ninguna operación adicional tras la obtención de la proteína. En el estado técnico se conocen algunas mutaciones puntuales adecuadas para ello.

Otras posibilidades son por ejemplo:  
 - la sustitución de determinados restos de aminoácido por prolina,  
 - la introducción de grupos polares o cargados en la superficie de la molécula.

45 Otra posibilidad de estabilización frente a temperaturas altas y a la acción de los tensioactivos consiste en sustituir los aminoácidos situados del extremo N-terminal por aquellos que entran en contacto con el resto de la molécula mediante interacciones no covalentes, contribuyendo así a mantener la estructura globular.

50 Las formas de ejecución preferidas son aquellas en que la molécula está estabilizada de varias maneras. Se puede partir del hecho de que varias mutaciones estabilizadoras tienen un efecto aditivo.

En una forma de ejecución preferida se usan aquellas proteínas mencionadas hasta ahora que se caracterizan por la posibilidad de ser obtenidas de una fuente natural, sobre todo de un microorganismo.

55 Se puede tratar, por ejemplo, de hongos o bacterias unicelulares, pues en la mayoría de los casos son más fáciles de conseguir y manipular que los organismos pluricelulares o que los cultivos celulares de metazoos, aunque éstos pueden ser una buena opción para formas de ejecución especiales y por tanto no deben excluirse por principio del objeto de la presente invención.

60 Es posible que los productores naturales generen un enzima según la presente invención, pero en las condiciones antes citadas solo lo expresarán y/o cederán en pequeña medida al medio circundante. Pero esto no excluye que se puedan determinar experimentalmente unas condiciones ambientales apropiadas u otros factores, cuyo efecto favorezca una producción económicamente rentable de la proteína de la presente invención. Un mecanismo regulador de este tipo se puede usar selectivamente para la producción biotecnológica. Si ello tampoco es factible, siempre pueden servir para aislar el gen correspondiente.

Entre ellas se prefieren especialmente las procedentes de bacterias gram-positivas, ya que éstas no poseen ninguna membrana externa y por tanto ceden inmediatamente las proteínas secretadas al medio circundante.

Se prefieren sobre todo las procedentes de bacterias gram-positivas del género *Bacillus*.

Las esterasas de *Bacillus* presentan a priori buenas propiedades para diversas aplicaciones técnicas, entre ellas cierta estabilidad a temperatura elevada y a los agentes oxidantes o desnaturalizantes. Además las mayores experiencias en cuanto a producción biotecnológica se han realizado con enzimas microbianas, en lo que respecta por ejemplo a la construcción de vectores de clonación ventajosos, a la selección de células huésped y condiciones de crecimiento o a la evaluación de riesgos, como por ejemplo el poder alergénico. Asimismo, como microorganismos productores de rendimiento especialmente elevado, los bacilos están implantados en los procesos industriales. La experiencia acumulada de que se dispone para la preparación y el uso de estas enzimas también favorece su posterior desarrollo según la presente invención, sobre todo, por ejemplo, en lo referente a su compatibilidad con otros compuestos químicos, como por ejemplo los ingredientes de los detergentes o productos de limpieza.

Entre las especies de *Bacillus* se prefieren a su vez el *Bacillus subtilis* o el *licheniformis*.

De ambas se obtuvieron originalmente las formas de ejecución de los enzimas de la presente invención. Las correspondientes secuencias están indicadas en el protocolo de secuencias. De estas o parecidas cepas se pueden obtener las variantes arriba descritas, sobre todo empleando métodos estándar de biología molecular como por ejemplo PCR y/o métodos de mutagénesis puntual ya conocidos.

Como células huésped para la expresión proteica de esterasas utilizables según la presente invención sirven en principio todos los organismos no humanos, es decir procariotas, eucariotas o cianófitos. Se prefieren las células huésped fáciles de manipular genéticamente por lo que se refiere, por ejemplo, a la transformación con el vector de expresión, a su implantación estable y a la regulación de la expresión, por ejemplo hongos o bacterias unicelulares. Además las células huésped preferidas se caracterizan por su facilidad de manipulación microbiológica y biotecnológica, es decir, por ejemplo, facilidad de cultivo, elevados índices de crecimiento, pequeñas exigencias en cuanto a medios de fermentación y buenos niveles de producción y secreción de proteínas extrañas. Preferentemente se eligen cepas de laboratorio orientadas a la expresión, que pueden adquirirse en el comercio o a través de bancos de cepas que son accesibles. Así, teóricamente, cada proteína de la presente invención puede obtenerse a partir de un gran número de organismos huésped. Dada la gran cantidad de distintos sistemas disponibles según el estado técnico, los sistemas óptimos de expresión deben averiguarse experimentalmente para cada caso. Las bacterias preferidas como células huésped son las de tipo gram-positivo, particularmente las pertenecientes al género *Bacillus*, muy especialmente de las especies *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis* o *Bacillus alcalophilus*.

Son ejemplos de eucariotas adecuados los hongos actinomicetos o levaduras de los géneros *Saccharomyces* o *Kluyveromyces*, así como sistemas de expresión a base de hongos termófilos. Éstos son especialmente apropiados para la expresión de variantes resistentes a la temperatura. Entre las modificaciones producidas por los sistemas eucarióticos, sobre todo en relación con la síntesis proteica, cabe citar por ejemplo la fijación de compuestos de bajo peso molecular como anclajes de membrana u oligosacáridos. Estas modificaciones con oligosacáridos pueden ser convenientes para disminuir el potencial alérgico, por ejemplo. También puede ser ventajosa una coexpresión con los enzimas generados de manera natural por dichas células.

Los métodos de preparación de una proteína según la presente invención son objeto independiente de la misma.

Por tanto se reivindica cualquier método de preparación de una proteína arriba descrita de la presente invención, o de un fragmento proteico, proteína de fusión o derivado de la misma, mediante el uso de un ácido nucleico arriba descrito según la presente invención y/o de un vector arriba descrito según la presente invención y/o de una de las células arriba descritas según la presente invención.

Como ejemplo pueden citarse aquellos procedimientos químicos de síntesis que desde el punto de vista económico son especialmente ventajosos para fragmentos más cortos.

En cambio, por otra parte, se prefieren todos los métodos preparativos de biología molecular, microbiológicos o biotecnológicos, establecidos en el estado técnico y ya mencionados arriba en algunos aspectos. De acuerdo con ello, usando métodos de biología molecular de por sí conocidos pueden sintetizarse oligonucleótidos y oligopéptidos - hasta completar genes y proteínas - correspondientes a las secuencias de ADN y aminoácidos arriba señaladas, las cuales pueden tomarse, por ejemplo, del protocolo de secuencias, preferentemente de las correspondientes a SEQ ID NO. 1, 2, 5 e incluso 6.

Los detergentes o productos de limpieza caracterizados por contener una proteína de la presente invención como la descrita arriba son objeto independiente de la presente invención.

Todos los tipos de detergentes o productos de limpieza, especialmente mezclas, recetas, soluciones, etc., cuyas

posibilidades de aplicación mejoren con la adición de una de las proteínas de la presente invención arriba descritas se incluyen en el alcance de la protección de la presente invención. Según el sector de aplicación puede tratarse por ejemplo de mezclas sólidas, por ejemplo polvos con proteínas liofilizadas o encapsuladas, o de productos líquidos o en forma de gel. Las recetas preferidas contienen por ejemplo sustancias tampón, estabilizantes y/o complementos reactivos con las esterasas y/u otros ingredientes sinérgicos con las esterasas.

Este objeto de la presente invención comprende todos los tipos imaginables de detergentes, tanto los concentrados como los productos que se usan sin diluir, a escala comercial, en lavadoras o en el lavado y limpieza manual. Como ejemplo cabe mencionar los productos de limpieza para tejidos, moquetas o fibras naturales, que según la presente invención reciben el nombre de detergentes. También, por ejemplo, los productos lavavajillas o los detergentes o limpiadores manuales para superficies duras como metal, vidrio, porcelana, cerámica, baldosas, piedra, superficies pintadas, plásticos, madera o cuero, los cuales según la presente invención reciben el nombre de detergentes. Cualquier detergente o producto de limpieza constituye una forma de ejecución de la presente invención, siempre que esté enriquecido con una proteína de la presente invención o un fragmento proteico, proteína de fusión o derivado según la presente invención.

Las formas de ejecución de la presente invención comprenden todas las formas de suministro de los detergentes o productos de limpieza convenientes o establecidas en el estado técnico, entre ellas, por ejemplo, productos sólidos, en polvo, líquidos, geles o pastas, dado el caso también en varias fases, comprimidos o no; incluyendo asimismo, por ejemplo, exudados, granulados, tabletas o saquitos, envasados en recipientes grandes o en porciones.

En una forma de ejecución preferida los detergentes o productos de limpieza de la presente invención contienen las proteínas de la presente invención arriba descritas o utilizables según la presente invención en una cantidad comprendida entre 0,0001 µg y 480 mg, preferiblemente entre 0,005 µg y 420 mg, con especial preferencia entre 0,02 µg y 360 mg, sobre todo entre 0,05 µg y 240 mg por gramo de producto.

Además de una proteína de la presente invención un detergente o producto de limpieza según la presente invención contiene, si es preciso, otros ingredientes como estabilizadores enzimáticos, tensioactivos, p.ej. no iónicos, aniónicos y/o anfóteros, y/o blanqueadores y/o potenciadores, así como otros componentes usuales que se detallan a continuación.

Entre los ingredientes habituales de los detergentes o productos de limpieza también se cuentan en general los enzimas de acción detergente o limpiadora.

Por lo tanto los detergentes o productos de limpieza que además de una proteína de la presente invención arriba descrita se caracterizan por un contenido adicional de enzimas son formas de ejecución preferida de la presente invención. Entre estas enzimas adicionales cabe citar otras esterasas, proteasas amilasas, celulasas, hemicelulasas como por ejemplo β-glucanasas, óxidorreductasas como por ejemplo lacasas, cutinasas y/o lipasas, pero también esterasas y todos los demás enzimas descritos en el estado técnico para este sector de aplicación.

Los enzimas como proteasas, amilasas, lipasas o celulasas se emplean desde hace décadas como componentes activos en detergentes o productos de limpieza. Su respectiva contribución al rendimiento del detergente o producto de limpieza en cuestión es, en el caso de las proteasas, la capacidad de descomponer impurezas que contengan proteínas; en el caso de las amilasas la descomposición de impurezas que contengan almidones y en el caso de las lipasas la disociación de las grasas. Además de por su capacidad de eliminar la suciedad, es decir por su poder detergente o limpiador primario, las celulasas se utilizan preferiblemente en detergentes, sobre todo por su aporte al poder limpiador secundario de un detergente y por su acción sobre las fibras textiles. Los respectivos productos de hidrólisis son atacados, disueltos, emulsionados o suspendidos por los demás componentes del detergente o producto limpiador o debido a su mayor solubilidad son arrastrados por el agua de lavado, con cual se producen ventajosamente efectos sinérgicos entre los enzimas y los demás ingredientes.

Las proteasas pueden tener sobre las fibras naturales, especialmente sobre lana o seda, tener un efecto comparable al de la contribución de las celulasas al poder limpiador secundario de un detergente. Por su acción sobre la estructura superficial de dichos tejidos pueden ejercer un efecto alisador sobre el material y, por lo tanto, contrarrestar el afieltrado.

Otros enzimas multiplican el poder detergente de los respectivos productos por su correspondiente rendimiento enzimático específico. Entre éstos se cuentan por ejemplo hemicelulasas como las β-glucanasas, óxidorreductasas como las lacasas o enzimas que disuelven la pectina, los cuales se usan concretamente en detergentes especiales.

Para usar en los detergentes o productos de limpieza de la presente invención entran primero en consideración los enzimas obtenidos a partir de microorganismos como bacterias u hongos. Se producen del modo conocido mediante procesos de fermentación con microorganismos adecuados.

Una proteína de la presente invención y/u otras proteínas incluidas se pueden proteger con estabilizadores, por ejemplo contra la desnaturalización, la descomposición o la inactivación causada por factores físicos, por oxidación o

por disociación proteolítica, sobre todo durante el almacenamiento. Esto es válido para todos los productos de la presente invención, sobre todo para detergentes o productos de limpieza.

5 Un grupo de estabilizadores lo constituyen los inhibidores de proteasa reversibles, los cuales se disocian al diluir el producto en el agua de lavado. El hidrocloreto de benzamidina y la leupeptina se han introducido para este uso. A menudo se usa bórax, ácidos bóricos, ácidos borónicos o sus sales o ésteres y entre ellos, sobre todo, derivados con grupos aromáticos, ácidos fenilborónicos orto-, meta- y para-sustituidos, así como sus sales o ésteres. Los peptidoaldehídos, es decir oligopéptidos con el extremo C reducido y en concreto de 2 - 50 monómeros, se utilizan para la inhibición reversible de la proteasas en los detergentes y productos de limpieza. A los inhibidores peptídicos de proteasa reversibles pertenece entre otros el ovomucoide. Por ejemplo, se pueden usar inhibidores peptídicos reversibles específicos de la proteasa subtilisina en medios que contengan proteasas y proteínas de fusión de proteasa e inhibidor adecuadas.

15 Otros estabilizadores enzimáticos son aminoalcoholes como mono-, di-, trietanol- y -propanolamina y sus mezclas, ácidos carboxílicos alifáticos de hasta C<sub>12</sub>, como el ácido succínico, otros ácidos dicarboxílicos o sales de dichos ácidos. En el estado técnico se revelan para esta finalidad amidoalcoxilatos de ácidos grasos con grupos terminales cerrados. Algunos ácidos orgánicos empleados como potenciadores también tienen la capacidad de estabilizar un enzima contenido en el producto.

20 Otros estabilizadores enzimáticos usados con frecuencia son alcoholes alifáticos inferiores, pero sobre todo polioles como, por ejemplo, glicerina, etilenglicol, propilenglicol o sorbita. También se usan sales de calcio, como por ejemplo el acetato o el formiato cálcico, y sales de magnesio.

25 Los oligómeros de poliamida o compuestos poliméricos como la lignina, copolímeros vinílicos hidrosolubles o éteres de celulosa, polímeros acrílicos y/o poliamidas estabilizan el preparado enzimático contra factores físicos u oscilaciones de pH, entre otros. Los polímeros que contienen poliamina-N-óxido actúan a la vez como estabilizadores enzimáticos e inhibidores del desteñido. Otros estabilizadores poliméricos son los polioxialquilenos C<sub>8</sub>-C<sub>18</sub> lineales. Los alquilpoliglicósidos podrían estabilizar los componentes enzimáticos del producto de la presente invención e incluso incrementar su rendimiento. Los compuestos nitrogenados reticulados cumplen una doble función como agentes de liberación de suciedad y como estabilizadores enzimáticos. En una mezcla con otros estabilizadores un polímero no iónico hidrófobo estabiliza una celulasa y por tanto estos u otros componentes análogos también serían adecuados para el enzima principal de la presente invención.

35 Los reductores y los antioxidantes aumentan la estabilidad de los enzimas frente a la degradación oxidativa. Son conocidos los reductores que contienen azufre. Otros ejemplos son el sulfito sódico y los azúcares reductores.

40 En muchos casos también se utilizan combinaciones de estabilizadores, por ejemplo de polioles, ácido bórico y/o bórax, la combinación de ácido bórico o borato, sales reductoras y ácido succínico u otros ácidos dicarboxílicos o la combinación de ácido bórico o borato con polioles o compuestos poliamínicos y con sales reductoras. El efecto de los estabilizadores péptido-aldehídicos se incrementa mediante la combinación con ácido bórico y/o derivados del mismo y aún más con el uso de iones calcio.

45 Los productos con las actividades enzimáticas estabilizadas son formas de ejecución preferidas de la presente invención. Se prefieren especialmente los que llevan enzimas estabilizados según varias de las maneras descritas.

50 Como los productos de la presente invención pueden suministrarse en cualquier forma imaginable, todas las formulaciones de enzimas o proteínas de la presente invención que sirvan de aditivo para los correspondientes productos también son respectivamente formas de ejecución preferidas de la misma. Como ejemplo cabe citar formulaciones líquidas, granulados sólidos o cápsulas.

55 La forma encapsulada se ofrece para proteger los enzimas u otros ingredientes frente a otros componentes, como por ejemplo los blanqueadores, o para permitir una liberación controlada. Según su tamaño se distingue entre mili-, micro- y nanocápsulas. Para los enzimas se prefieren especialmente las microcápsulas. Un método de encapsulación posible consiste en encapsular las proteínas, partiendo de una mezcla de la solución proteica con una solución o suspensión de almidón o de un derivado de almidón, en esta sustancia.

60 En caso de productos sólidos las proteínas se pueden usar, por ejemplo, en forma seca, granulada y/o encapsulada. Se pueden añadir por separado, es decir como fase única, o junto con otros componentes en la misma fase, con o sin compactación. Si hay que elaborar enzimas microencapsulados en forma sólida, el agua de las soluciones acuosas resultantes del proceso se puede eliminar por métodos conocidos del estado técnico como secado por pulverización, centrifugación o resolubilización en otro disolvente. Las partículas obtenidas de este modo suelen tener un tamaño comprendido entre 50 y 200 µm.

65 Los enzimas y también la proteína de la presente invención pueden añadirse a los productos líquidos, geles o pastas de la presente invención en solución concentrada, suspensión o emulsión, acuosa o no, partiendo de un procedimiento de obtención y preparación de proteínas realizado según el estado técnico, pero también en forma de gel o

encapsuladas o en forma de polvo desecado. Estos detergentes o productos de limpieza de la presente invención se preparan en general mezclando simplemente los ingredientes, que pueden introducirse tal cual o en disolución en un mezclador automático.

5 Aparte del poder detergente primario, las esterasas contenidas en los productos de limpieza también cumplen la función de activar otros componentes por división esterolítica o inactivarlos tras un determinado tiempo de acción. La proteína de la presente invención también puede ejercer funciones reguladoras similares. Otra forma de ejecución de la presente invención son los productos con cápsulas de material sensible a las esterasas, que al cabo de un tiempo prefijado son hidrolizadas por las proteínas de la presente invención, por ejemplo, liberando su contenido.  
10 También se puede conseguir un efecto parecido en otros productos de varias fases.

Otra forma de ejecución son los detergentes o productos de limpieza para el tratamiento de materias primas textiles o el cuidado de los tejidos, los cuales se caracterizan por contener una de las proteínas de la presente invención arriba descritas, sola o junto con otros ingredientes activos, especialmente para fibras o tejidos con componentes de fibra sintética y sobre todo de poliéster.  
15

Las fibras sintéticas, como por ejemplo las de poliéster, también tienen una estructura superficial característica, la cual después de muchos procesos de lavado puede presentar efectos no deseados, como por ejemplo la tendencia al afieltrado, el llamado "pilling". Para evitarlo, las materias primas o el tejido terminado, es decir el material textil o las fibras, se tratan con productos de la presente invención, los cuales contribuyen por ejemplo a alisar la estructura superficial y a contrarrestar el afieltrado.  
20

Los productos de la presente invención se usan preferentemente para mejorar el aspecto y/o la estructura superficial de fibras afieltradas, sobre todo de poliéster. Los enzimas de la presente invención tienen la capacidad de partir los enlaces éster de las fibras sintéticas afieltradas y por tanto revertir el afieltrado del tejido o de las fibras ("depilling"), evitarlo de antemano, mantenerlo, ralentizarlo claramente y/o pararlo del todo.  
25

En una forma de ejecución preferida el producto está concebido con una esterasa de la presente invención para poder emplearlo regularmente como agente de conservación, por ejemplo añadiéndolo al proceso de lavado, tras el lavado o aplicándolo independientemente del lavado. El efecto deseado consiste en lograr que el tejido mantenga una estructura superficial lisa durante largo tiempo y/o en prevenir y/o reducir su deterioro.  
30

Un objeto propio de la presente invención son los procesos automáticos de limpieza de tejidos o de superficies duras caracterizados porque al menos en una de sus etapas se activa una proteína, arriba descrita, de la presente invención, un fragmento de proteína, una proteína de fusión o un derivado de la misma, concretamente en una cantidad de 0,01 µg hasta 96 g, preferiblemente de 0,05 µg hasta 72 g, con especial preferencia de 0,1 µg hasta 48 g y sobre todo de 0,5 µg hasta 24 g por aplicación.  
35

Aquí se incluyen tanto procesos manuales como automáticos, prefiriéndose los automáticos por ser más precisos a la hora de regular, por ejemplo, las cantidades empleadas y los tiempos de actuación.  
40

En general los procesos de limpieza de tejidos se caracterizan por aplicar al objeto del lavado, en varias etapas, diversas sustancias detergentes que luego se enjuagan tras un tiempo de acción o por tratar el objeto del lavado de otro modo con un detergente o una disolución de este producto. Lo mismo vale para la limpieza de todos los demás materiales que no son tejidos, agrupados bajo el término de superficies duras. Todos los procesos imaginables de lavado o de limpieza se pueden enriquecer con proteínas de la presente invención en al menos una de sus etapas y por tanto constituyen formas de ejecución de la presente invención.  
45

Una etapa individual de un proceso de este tipo para la limpieza automática de tejidos puede consistir, si se desea, en aplicar un enzima de la presente invención como único ingrediente activo junto a los compuestos estabilizantes, sales o sustancias tampón. Ésta es una forma de ejecución especialmente preferida de la presente invención.  
50

En otra forma de ejecución preferida de dichos procesos, los respectivos enzimas de la presente invención se preparan en el marco de una de las recetas arriba indicadas para los detergentes o productos de limpieza de la presente invención.  
55

Las formas de ejecución preferidas de este objeto de la presente invención son procesos para el tratamiento o el cuidado de materiales textiles, que se caracterizan porque al menos en una de sus etapas se activa una proteína de la presente invención, arriba descrita, sobre todo para materiales textiles, fibras o tejidos con componentes sintéticos y especialmente para aquellos que llevan fibras sintéticas, en concreto de poliéster.  
60

Puede tratarse por ejemplo de procesos de preparación de materiales destinados a la elaboración de tejidos, como acabado antiafieltrado, o por ejemplo de procesos en que la limpieza de tejidos usados se enriquece con un componente de mantenimiento. En las formas de ejecución preferidas son preferentemente procesos de tratamiento de materiales textiles, fibras o tejidos que llevan componentes sintéticos, sobre todo fibras sintéticas, en concreto de poliéster.  
65

Un objeto propio de la presente invención es el uso de una proteína arriba descrita, de la presente invención, para limpiar tejidos o superficies duras.

5 Para dicho uso son válidos, preferiblemente, los márgenes de concentración arriba indicados.

Por tanto las proteínas de la presente invención, sobre todo aquellas que poseen las propiedades arriba descritas y las que corresponden a los procesos arriba descritos, se pueden usar para eliminar nódulos o afieltrados molestos ("depilling"). Las formas de ejecución son, por ejemplo, el lavado manual o la eliminación manual de manchas de tejidos o de superficies duras o el uso en un proceso automático.

En una forma de ejecución preferida de dicha aplicación los correspondientes enzimas de la presente invención se preparan en el marco de una de las recetas arriba indicadas para los productos de la presente invención, preferiblemente detergentes o productos de limpieza.

El uso de las proteínas de la presente invención en detergentes y productos de limpieza también puede rebajar el brillo satinado que puede observarse en las fibras de poliéster y que los clientes consideran más bien de mala calidad. Asimismo se puede reducir la aparición de zonas brillantes en las fibras sintéticas durante el lavado o incluso evitarlas sustancialmente. Estas zonas brillantes en las fibras, producidas p.ej. por roce o fricción, se reducen con el uso de detergentes y productos de limpieza que contienen los enzimas de la presente invención.

Además los enzimas de la presente invención se pueden usar para evitar y/o impedir totalmente la redeposición, es decir la adhesión, de la suciedad del agua de lavado durante el proceso de limpieza.

25 Además el uso de los enzimas de la presente invención en detergentes y productos de limpieza permite mejorar globalmente el rendimiento del lavado.

Las para-nitrobencilesterasas se pueden usar asimismo en síntesis química o en métodos de purificación de una síntesis química. Como los enzimas poseen en general centros catalíticos estéreoselectivos es posible utilizarlos para separar racematos o para síntesis estéreoselectivas.

Otra forma de ejecución del objeto de la presente invención es el uso de una proteína de la presente invención como la descrita arriba para el tratamiento de materias primas naturales o sintéticas, particularmente para el tratamiento de la superficie.

Esta aplicación tiene lugar preferiblemente en el marco de productos o procesos adecuados. Es necesaria, por ejemplo, cuando hay que liberar materias primas de ciertas impurezas. En este caso cabe citar en primer lugar la obtención de materias primas sintéticas, pero también sustancias preparadas biotecnológicamente mediante fermentaciones, como por ejemplo los antibióticos.

El uso de para-nitrobencilesterasas, obtenibles preferentemente de bacterias del género *Bacillus*, en procesos de preparación y/o purificación de poliésteres, sobre todo de polialquiltereftalatos, es otro objeto preferido de la presente invención. En la preparación de polialquiltereftalatos, sobre todo de polietilentereftalatos (PET), el rendimiento de polímero se ve influido por una reacción secundaria que produce la formación de oligómeros cíclicos. El uso de la presente invención permite contrarrestar la formación de oligómeros cíclicos y disponer de los monómeros para proseguir la reacción. Así se limitan los productos de la reacción secundaria y se alcanza un mayor rendimiento del polímero deseado.

Otra forma de ejecución de este objeto de la presente invención es el uso de una proteína de la presente invención como la descrita arriba para obtener o tratar materias primas o productos intermedios de la producción textil, sobre todo para eliminar capas protectoras de los tejidos.

Esta aplicación tiene lugar preferiblemente en el marco de productos o procesos adecuados. Un ejemplo de obtención o de tratamiento de materias primas o de productos intermedios para la producción textil es el acabado de fibras sintéticas. Los procesos o aplicaciones enzimáticas superan a los procedimientos químicos comparables, especialmente en los que respecta a su compatibilidad medioambiental.

En una forma de ejecución preferida se usan proteínas de la presente invención para eliminar capas protectoras de los tejidos, sobre todo de productos intermedios o materias primas, o alisar su superficie, antes de seguir elaborándolos en una etapa subsiguiente.

Otra forma de ejecución de este objeto de la presente invención es el uso de una proteína de la presente invención como la descrita arriba para tratar materias primas textiles o cuidar tejidos, sobre todo para tratar fibras sintéticas, en particular de poliéster, o tejidos mixtos que llevan fibras sintéticas.

Esta aplicación tiene lugar preferiblemente en el marco de productos o procesos adecuados. Según lo antedicho las

respectivas materias primas textiles se liberan de impurezas gracias a las esterases; además un material que consta al menos parcialmente de proteína se beneficia de la capacidad alisadora de la superficie y de las propiedades protectoras del enzima esterolítico. Por este motivo también se incluye como aplicación el cuidado de los materiales en cuestión. Por tanto se reivindica el tratamiento superficial de fibras sintéticas, sobre todo de poliéster, o de tejidos mixtos que llevan fibras sintéticas, lo cual es válido tanto para la fabricación de dichos tejidos como para el cuidado durante su uso, por ejemplo en relación con su limpieza (véase arriba).

Ejemplos:

## 1. Secuencias de las esterases de la presente invención

Tabla 1: asignación de los números ID de secuencia

SEQ-ID No.	Organismo	Proteína/ADN/ARN	Nº de registro en el banco de datos NCBI	Esterasa/lipasa
1	Bacillus subtilis	Proteína	-	PNBE
2	Bacillus licheniformis	Proteína	-	PNBE
3	Bacillus subtilis	ADN/ARN	-	PNBE
4	Bacillus licheniformis	ADN/ARN	-	PNBE
5	Bacillus subtilis	Preproteína	-	PNBE
6	Bacillus licheniformis	Preproteína	-	PNBE
7	Bacillus subtilis	ADN/ARN	-	PNBE
8	Bacillus subtilis	ADN/ARN	-	PNBE
9	Artificial	Péptido señalizador	-	PNBE
10	Artificial	ADN/ARN	-	PNBE
11	Bacillus subtilis	Proteína	gi 1762126	PNBE
12	Bacillus licheniformis DSM 13	Proteína	gi 52346943	PNBE
13	Bacillus subtilis	Proteína	gi 7546321	PNBE
14	Bacillus subtilis	Proteína	gi 468046	PNBE
15	Bacillus subtilis	Proteína	gi 1762126	PNBE
16	Bacillus subtilis	Proteína	gi 1495277	PNBE
17	Bacillus subtilis	Proteína	gi 1945688	PNBE
18	Bacillus subtilis	Proteína	gi 2635952	PNBE
19	Bacillus licheniformis ATCC 14580	Proteína	gi 52002286	PNBE
20	Staphylococcus epidermidis ATCC 12228	Proteína	gi 27316488	PNBE
21	Staphylococcus aureus	Proteína	gi 57286454	PNBE
22	Streptomyces avermitilis MA-4680	Proteína	gi 29611030	PNBE
23	Caulobacterium crescentus CB15	Proteína	gi 13422044	PNBE
24	Clostridium acetobutylicum ATCC824	Proteína	gi 14994366	PNBE
25	Artificial	Proteína	gi 7546320	PNBE
26	Burkholderia cepacia	Proteína	gi 67464317	Lipasa
27	Bacillus licheniformis DSM 13	ADN	-	PNBE

## 2. Determinación de las actividades enzimáticas

### 2.1 Determinación de la actividad de la esterasa con *para*-nitrofenilésteres

La actividad de la esterasa se determinó de forma estándar con *para*-nitrofenil-acetato (pNPA). Para ello se preparó una solución estándar 400 mM en DMSO. Se mezclaron 980  $\mu$ l de una solución 50 mM de tampón Tris-HCl (pH 8,0) con 10  $\mu$ l de *para*-nitrofenil-acetato disuelto en DMSO. Si no se describe lo contrario, la reacción se realizó a temperatura ambiente y se inició mediante la adición de 10  $\mu$ l de solución enzimática. A continuación se midió el aumento de la absorción a 410 nm (UV MC<sup>2</sup>, de SAFAS, Mónaco). La actividad enzimática se alcanzó con un coeficiente de extinción de 17100 [M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>], definiéndose como 1 unidad la cantidad de enzima que liberaba 1  $\mu$ mol de *p*-nitrofenol por minuto.

### 2.2 Determinación de la actividad de la esterasa con rojo fenol

Para el lavado bioquímico con dialquilftalato-hidrolasa se determinó la actividad esterolítica frente a dietilftalato (DE-T) como sustrato, empleando un método de medición fotométrico que señala la acidificación del sistema de ensayo mediante un indicador de pH. Este sistema de ensayo se basa en la misma afinidad protónica del tampón empleado (tampón EPPS; pKa = 8,0) y del indicador de pH utilizado (rojo fenol; pKa = 8,0), que da un recorrido lineal del descenso de absorción a 560 nm. Para el cálculo de actividad se usaron las siguientes fórmulas 2.1 y 2.2, donde Q = "factor tampón"; C<sub>tampón</sub> = concentración final de tampón; C<sub>indicador</sub> = concentración final de indicador;  $\Delta E_{560nm}$ : diferencia entre la forma desprotonada y la forma protonada del rojo fenol; A: actividad de la esterasa; dE/dt: descenso de la extinción frente a un intervalo de tiempo; V<sub>reacción</sub>: volumen de reacción:

$$Q = \frac{c_{\text{tampón}} * 1}{c_{\text{indicador}} \Delta \epsilon_{560\text{nm}} * l} \quad (2.1)$$

$$A = (\mu\text{mol} * \text{min}^{-1}) = \frac{dE}{dt} * Q * V_{\text{reacción}} * 10^{-6} \quad (2.2)$$

5 Se encontró una actividad enzimática correspondiente a un coeficiente de extinción molar determinado empíricamente de 58000 [M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>] para la forma desprotonada y de 100 [M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>] para la forma protonada, definiéndose como 1 unidad la cantidad de enzima que liberaba 1 μmol de ácido por minuto.

### 2.3 Determinación de la actividad de la esterasa por valoración

10 Se determinaron las actividades de las esterasas frente a varios sustratos de la familia de los ftalatos (fig. 4) utilizando el aparato de valoración 702 STAT (de METROHM LDT., Suiza). Los ftalatos se disolvieron en dietiléter con 0,5 g de Triton X100. A continuación se eliminó el dietiléter con corriente de nitrógeno. Se añadieron 50 ml de tampón (Tris/HCl 2 mM, pH 9), se homogeneizó con ultrasonidos y se emplearon a distintas concentraciones finales (0,3 mM hasta 100 mM) en un volumen total de reacción de 2 ml (incluyendo el enzima). El tampón de reacción se incubó  
15 previamente a 30°C durante al menos 10 minutos. Después de añadir el enzima se anotó el consumo de NaOH (determinación de la concentración valorando tres veces con ácido oxálico) a una temperatura de reacción de 30°C. Se definió una unidad como la actividad enzimática correspondiente a la liberación de 1 μmol de ácido por minuto.

### 2.4 Determinación de la actividad de la esterasa por hidrólisis del bis-(p-metilbenzoato) de etilenglicol

#### 2.4.1 Síntesis del bis-(p-metilbenzoato) de etilenglicol

25 El bis-(p-metilbenzoato) de etilenglicol se sintetizó por esterificación de cloruro de 4-metilbenzoilo con etilenglicol (véase fig. 1). Se introduce etilenglicol y piridina en un matraz redondo con condensador de reflujo y se añade gota a gota cloruro de 4-metilbenzoilo, enfriando con hielo. Después de dejar la mezcla 16 horas en reposo, el éster sólido resultante se separó por filtración y se recristalizó en 70% de etanol-30% de agua. A continuación se lavó el sólido con etanol al 70% y se liofilizó durante 24 horas.

#### 2.4.2 Determinación de la actividad enzimática

30 La disociación del bis-(p-metilbenzoato) de etilenglicol catalizada por los enzimas de la presente invención da 2 equivalentes de ácido 4-metilbenzoico y etilenglicol (véase fig. 2).

35 Para la preparación del ensayo enzimático se mezcla la cantidad deseada de sustrato con 0,5 g de Triton X100 y se disuelve en 50 ml de etanol (al 99%, desnaturalizado), calentando. Una vez disuelto todo el sustrato se añade la solución a 50 ml de tampón (Tris/HCl 2 mM, pH 9), agitando fuertemente con un Ultra-Turrax. A continuación esta solución se agitó al menos durante 12 horas a temperatura ambiente para eliminar gran parte del etanol empleado. La solución de sustrato así preparada se valoró directamente. El tampón de reacción se preincubó a 30°C durante  
40 al menos 10 minutos.

45 Se usaron distintas concentraciones finales (0,67 mM hasta 50 mM) en un volumen total de reacción de 2 ml, incluyendo el enzima. Después de añadir el enzima se anotó el consumo de NaOH (determinación de la concentración valorando tres veces con ácido oxálico mediante el aparato de valoración 702 STAT (de METROHM LDT., Suiza)) a una temperatura de reacción de 30°C. Se definió una unidad como la actividad enzimática correspondiente a la liberación de 1 μmol de ácido por minuto.

50 En éste y en los demás ejemplos, para las esterasas empleadas se usan las siguientes abreviaturas: enzima según SeqID No. 12 (pNB-Est13), enzima según SeqID No. 2 (pNB-Est19), enzima según SeqID No. 1 (pNB-Est17). Los datos de la tabla 2 obtenidos para dichas esterasas se determinaron por valoración y son los valores medios de tres mediciones efectuadas independientemente entre sí, con una desviación estándar relativa inferior al 5%.

Tabla 2: datos cinéticos de la hidrólisis del bis-(p-metilbenzoato) de etilenglicol por las *para*-nitrobenzil-esterasas pNB-Est17, pNB-Est19 y pNB-Est13

bis-(p-metilbenzoato) de etilenglicol	Vmax [μmol/min]	K <sub>M</sub> [mM]	k <sub>cat</sub> (1/s)	k <sub>cat</sub> / K <sub>M</sub> [1/mM*s]	Actividad específica [μmol/min*mg]
Enzima según SeqID No. 1 (pNB-Est17)	0,642	9,83	5177	527	1,60
Enzima según SeqID No. 2 (pNB-Est19)	0,385	3,59	3838	1070	1,19
Enzima según SeqID No. 12 (pNB-Est13)	1,801	11,21	9358	835	2,87

### 3. Análisis de la especificidad del sustrato frente a *para*-nitrofenilésteres y triglicéridos de distinta longitud de cadena

Para determinar las especificidades de las esterasas estudiadas respecto a las longitudes de cadena se emplearon *p*-nitrofenilésteres de distinta longitud de cadena como sustrato de las mediciones espectroscópicas de actividad. Para ello los *p*-nitrofenilésteres se disolvieron en 10 ml de isopropanol y se mezclaron con 90 ml de tampón fosfato (pH 8, hidrógenofosfato disódico y dihidrógenofosfato potásico). La concentración final del sustrato fue de 0,8 mM. Se mezclaron respectivamente 990  $\mu$ l de la mezcla tampón-sustrato con 10  $\mu$ l del enzima analizado y se incubó un minuto a temperatura ambiente. A continuación se midió el aumento de absorción a 410 nm (UV MC<sup>2</sup>, de SAFAS, Mónaco). La actividad enzimática se alcanzó con un coeficiente de extinción de 17100 [M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>], definiéndose como 1 unidad la cantidad de enzima que liberaba 1  $\mu$ mol de *p*-nitrofenol por minuto.

Los valores que figuran en la tabla 3 son promedios de tres mediciones efectuadas independientemente entre sí, con una desviación estándar relativa inferior al 10%.

Tabla 3: especificidades de sustrato de *p*NB-Est13, *p*NB-Est17 y *p*NB-Est19 para distintas longitudes de cadena de los *para*-nitrofenilésteres en las condiciones descritas

Sustrato	Actividad específica [U/mg]		
	<i>p</i> NB-Est13	<i>p</i> NB-Est17	<i>p</i> NB-Est19
<i>p</i> -NP-butirato	22,4	196,3	234,8
<i>p</i> -NP-caproato	50,5	102,7	249,6
<i>p</i> -NP-caprilato	13,0	73,2	83,6
<i>p</i> -NP-caprato	4,4	10,2	3,9
<i>p</i> -NP-laurato	1,3	3,4	4,0
<i>p</i> -NP-miristato	< 1	< 1	1,3
<i>p</i> -NP-palmitato	< 1	< 1	< 1
<i>p</i> -NP-estearato	< 1	< 1	< 1

### 4. Detección analítica de los productos de hidrólisis de diferentes ftalatos de dialquilo tras la incubación con las *para*-nitrobencil-esterasas *p*NB-Est17, *p*NB-Est19 y *p*NB-Est13

La actividad esterolítica de las *p*NB-esterasas analizadas frente a distintos ftalatos de dialquilo se verificó mediante la detección de los productos de disociación. La detección se llevó a cabo tanto por cromatografía de capa fina como por cromatografía de gases acoplada a espectroscopia de masas (GC/MS). En la siguiente tabla 4 se indican los valores R<sub>F</sub> de los eductos y de los productos después de realizar una cromatografía de capa fina. La detección de una o dos manchas nuevas ya denotaba una hidrólisis. Las respectivas pruebas en blanco no mostraron manchas adicionales.

Como eluyente en la cámara de capa fina presaturada se usó 90% de diclorometano/10% de metanol, las sustancias se separaron sobre láminas recubiertas de gel de sílice 60 F254; la detección de las manchas individuales se llevó a cabo bajo luz UV; la concentración de sustrato en la mezcla fue de 6,67 mM, el tiempo de incubación 2 h a temperatura ambiente.

Tabla 4: recorridos característicos (valores R<sub>F</sub>) de los eductos y productos determinados por análisis de cromatografía en capa fina de las mezclas reactivas con *p*NB-esterasas

Sustrato	Valor R <sub>F</sub> del sustrato	Valor R <sub>F</sub> del producto 1	Valor R <sub>F</sub> del producto 2
Dimetiltereftalato	0,78	0,18	-
Dietiltereftalato	0,75	0,21	-
Dimetilisofthalato	0,78	0,23	-
Dimetilftalato	0,70	0,07	-
Dietilftalato	0,73	0,13	-
Dibutilftalato	0,74	0,13	-
Fenilbenzoato	0,76	0,45	0,25

Tras el análisis GC/MS de la mezcla reactiva los picos de masa de los productos disociados se asignaron por comparación con la base de datos WILEY, confirmándose la hidrólisis ya observada en los análisis de cromatografía en capa fina. En la figura 4 están representadas esquemáticamente todas las reacciones observadas. Para cada reacción enzimática se midieron muestras en blanco consistentes en la mezcla reactiva sin enzima o sin sustrato. En todos los ftalatos y tereftalatos investigados se ha comprobado que solo se hidroliza uno de los dos posibles grupos funcionales. En ninguna mezcla reactiva se detectó el ácido ftálico, tereftálico o isoftálico libre. El correspondiente producto de la reacción es el monoéster del compuesto de partida, así como el respectivo alcohol. Como sustrato ajeno a los ftalatos se analizó la hidrólisis del benzoato de fenilo. Como productos de la hidrólisis se detectaron fenol y ácido benzoico.

### 5. Determinación de los valores $V_{max}$ , $k_M$ , $k_{cat}$ y $k_{cat}/k_M$ de las *para*-nitrobencil-esterasas *pNB-Est17*, *pNB-Est19* y *pNB-Est13* frente a distintos ftalatos y tereftalatos

Para la determinación de constantes cinéticas como  $V_{max}$ ,  $k_M$ ,  $k_{cat}$  y  $k_{cat}/k_M$  para las tres *para*-nitrobencil-esterasas *pNB-Est17*, *pNB-Est19* y *pNB-Est13* frente a distintos ftalatos y tereftalatos se realizaron valoraciones titulométricas. Las respectivas actividades enzimáticas se determinaron para distintas concentraciones de sustrato y se evaluaron según MICHAELIS-MENTEN (véanse fig. 5 a 7). Para calcular la constante cinética ( $k_{cat}$  o  $k_2$ ) y la eficiencia catalítica ( $k_{cat}/k_M$ ) se tomaron los valores  $k_M$  y  $V_{max}$  encontrados – suponiendo que la concentración de enzima empleada era la misma que la de enzima activo. Los valores resultantes están resumidos respectivamente en la tabla.

Los valores que aparecen en las figuras 5 a 7 son promedios de tres valoraciones titulométricas realizadas independientemente entre sí, con una desviación estándar relativa inferior al 5%. El cálculo de  $k_{cat}$  y  $k_{cat}/k_M$  se efectuó suponiendo que la concentración de enzima empleada era la misma que la de enzima activo.

En el caso de las tres *para*-nitrobencil-esterasas investigadas se pudo detectar el monoéster del compuesto de partida con su alcohol correspondiente. En ningún caso pudo detectarse el ácido ftálico, tereftálico o isoftálico libre.

#### Hidrólisis de ftalato de dimetilo con distinta posición (*orto*, *meta*, *para*)

Tabla 5: valores de  $k_M$  y  $V_{max}$  y de  $k_{cat}$  y  $k_{cat}/k_M$  de la hidrólisis de ácido dimetilftálico en posición *orto*, *meta* y *para*: DMP = ácido dimetilftálico; DMIP = ácido dimetilisoftálico; DMT = ácido dimetilereftálico; por *pNB-Est17*, *pNB-Est19* y *pNB-Est13*

Substrato DMP	<i>pNB-Est17</i>	<i>pNB-Est19</i>	<i>pNB-Est13</i>
$V_{Max}$ [U/mg]	14,09	15,76	9,11
$k_M$ [mM]	27,70	20,35	8,68
$k_{cat}$ [1/s]	45672	50970	29735
$k_{cat}/k_M$ [1/mM·s]	1649	2505	3427
Substrato DMIP	<i>pNB-Est17</i>	<i>pNB-Est19</i>	<i>pNB-Est13</i>
$V_{Max}$ [U/mg]	11,99	8,55	27,67
$k_M$ [mM]	3,67	2,44	2,93
$k_{cat}$ [1/s]	38880	27637	90267
$k_{cat}/k_M$ [1/mM·s]	10594	11327	30808
Substrato DMT	<i>pNB-Est17</i>	<i>pNB-Est19</i>	<i>pNB-Est13</i>
$V_{Max}$ [U/mg]	18,52	15,96	4,53
$k_M$ [mM]	5,99	13,56	6,87
$k_{cat}$ [1/s]	60028	50718	14784
$k_{cat}/k_M$ [1/mM·s]	10021	3741	2152

#### Hidrólisis de ftalatos con distinta longitud de cadena (*orto*)

Tabla 6: valores de  $k_M$  y  $V_{max}$  y de  $k_{cat}$  y  $k_{cat}/k_M$  de la hidrólisis de ftalatos en posición *orto* con distinta longitud de la cadena alquílica (DMP = ácido dimetilftálico; DEP = ácido dietilftálico; DBP = ácido dibutilftálico) por *pNB-Est17*, *pNB-Est19* y *pNB-Est13*

Substrato DMP	<i>pNB-Est17</i>	<i>pNB-Est19</i>	<i>pNB-Est13</i>
$V_{Max}$ [U/mg]	14,09	15,76	9,11
$k_M$ [mM]	27,70	20,35	8,68
$k_{cat}$ [1/s]	45672	50970	29735
$k_{cat}/k_M$ [1/mM·s]	1649	2505	3427
Substrato DEP	<i>pNB-Est17</i>	<i>pNB-Est19</i>	<i>pNB-Est13</i>
$V_{Max}$ [U/mg]	9,57	7,20	3,21
$k_M$ [mM]	5,20	3,55	4,14
$k_{cat}$ [1/s]	31065	23265	10468
$k_{cat}/k_M$ [1/mM·s]	5974	6554	2528
Substrato DBP	<i>pNB-Est17</i>	<i>pNB-Est19</i>	<i>pNB-Est13</i>
$V_{Max}$ [U/mg]	48,03	40,69	2,87
$k_M$ [mM]	1,24	0,70	1,16
$k_{cat}$ [1/s]	155676	23265	9356
$k_{cat}/k_M$ [1/mM·s]	125545	187329	8066

**Hidrólisis de ftalatos con distinta longitud de cadena (*para*)**Tabla 7: valores de  $k_M$  y  $V_{max}$  y de  $k_{cat}$  y  $k_{cat}/k_M$  de la hidrólisis del tereftalato de dimetilo (DMT) y del tereftalato de dietilo (DET) por *p*NB-Est17, *p*NB-Est19 y *p*NB-Est13

<b>Substrato DMT</b>	<b><i>p</i>NB-Est17</b>	<b><i>p</i>NB-Est19</b>	<b><i>p</i>NB-Est13</b>
$V_{Max}$ [U/mg]	18,52	15,69	4,53
$k_M$ [mM]	5,99	13,56	6,87
$k_{cat}$ [1/s]	60028	50718	14784
$k_{cat}/k_M$ [1/mM·s]	10021	3741	2152
<b>Substrato DET</b>	<b><i>p</i>NB-Est17</b>	<b><i>p</i>NB-Est19</b>	<b><i>p</i>NB-Est13</b>
$V_{Max}$ [U/mg]	28,06	30,79	3,57
$k_M$ [mM]	1,06	0,97	1,21
$k_{cat}$ [1/s]	90998	99411	12574
$k_{cat}/k_M$ [1/mM·s]	85847	102486	10392

Explicación de las figuras

Fig. 1: síntesis de bis-(*p*-metilbenzoato) de etilenglicol por esterificación de ácido 4-metilbenzoico con etilenglicol.

Fig. 2: esquema de la hidrólisis enzimática del bis-(*p*-metilbenzoato) de etilenglicol.

Fig. 3: detección de la hidrólisis enzimática e identificación de los productos de la hidrólisis del bis-(*p*-metilbenzoato) de etilenglicol por *para*-nitrobencil-esterasas.

Fig. 4: representación esquemática de las reacciones de tereftalato de dimetilo, tereftalato de dietilo, ftalato de dimetilo, ftalato de dietilo, ftalato de dibutilo, isoftalato de dimetilo y benzoato de fenilo catalizadas enzimáticamente.

Fig. 5: cinéticas MICHAELIS-MENTEN de las *para*-nitrobencil-esterasas *p*NB-Est17 (o), *p*NB-Est19 ( $\Delta$ ) y *p*NB-Est13 ( $\square$ ) frente a ácido dimetilftálico (DMP), ácido dimetilisoftálico (DMIP) y ácido dimetiltereftálico (DMT).

Fig. 6: cinéticas MICHAELIS-MENTEN de las *para*-nitrobencil-esterasas *p*NB-Est17 (o), *p*NB-Est19 ( $\Delta$ ) y *p*NB-Est13 ( $\square$ ) frente a los ésteres orto-ftálicos de: ácido dimetilftálico (DMP), ácido dietilftálico (DEP) y ácido dibutilftálico (DBP).

Fig. 7: cinéticas MICHAELIS-MENTEN de las *para*-nitrobencil-esterasas *p*NB-Est17 (o), *p*NB-Est19 ( $\Delta$ ) y *p*NB-Est13 ( $\square$ ) frente a los ésteres para-ftálicos: tereftalato de dimetilo (DMT) y tereftalato de dietilo (DET).

## LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Henkel KGaA

<120> H 06819 PCT

<130> Esterasa

<150> DE 10 2005 037 659.2 <151> 05.08.2005

<160> 27

<170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

<211> 489

<212> PRT

<213> Bacillus subtilis

<400> 1

ES 2 368 943 T3

Met Thr His Gln Ile Val Thr Thr Gln Tyr Gly Lys Val Lys Gly Thr  
 1 5 10 15

Thr Glu Asn Gly Val His Lys Trp Lys Gly Ile Pro Tyr Ala Lys Pro  
 20 25 30

Pro Val Gly Gln Trp Arg Phe Lys Ala Pro Glu Pro Pro Glu Val Trp  
 35 40 45

Glu Asp Val Leu Asp Ala Thr Ala Tyr Gly Pro Ile Cys Pro Gln Pro  
 50 55 60

Ser Asp Leu Leu Ser Leu Ser Tyr Thr Glu Leu Pro Arg Gln Ser Glu  
 65 70 75 80

Asp Cys Leu Tyr Val Asn Val Phe Ala Pro Asp Thr Pro Ser Gln Asn  
 85 90 95

Leu Pro Val Met Val Trp Ile His Gly Gly Ala Phe Tyr Leu Gly Ala  
 100 105 110

Gly Ser Glu Pro Leu Tyr Asp Gly Ser Lys Leu Ala Ala Gln Gly Glu  
 115 120 125

Val Ile Val Val Thr Leu Asn Tyr Arg Leu Gly Pro Phe Gly Phe Leu  
 130 135 140

His Leu Ser Ser Phe Asp Glu Ala Tyr Ser Asp Asn Leu Gly Leu Leu  
 145 150 155 160

Asp Gln Ala Ala Ala Leu Lys Trp Val Arg Glu Asn Ile Ser Ala Phe



ES 2 368 943 T3

Ala Lys Ala Glu Ile Thr Asp Glu Val Lys Gln Leu Ser His Thr Ile  
 420 425 430

Gln Ser Ala Trp Ile Thr Phe Ala Lys Thr Gly Asn Pro Ser Thr Glu  
 435 440 445

Ala Val Asn Trp Pro Thr Tyr His Glu Glu Thr Arg Glu Thr Leu Ile  
 450 455 460

Leu Asp Ser Glu Ile Thr Ile Glu Asn Asp Pro Glu Ser Glu Lys Arg  
 465 470 475 480

Gln Lys Leu Phe Pro Ser Lys Gly Glu  
 485

<210> 2

<211> 489

<212> PRT

5 <213> Bacillus licheniformis

<400> 2

Met Thr His Gln Ile Val Thr Thr Gln Tyr Gly Lys Val Lys Gly Thr  
 1 5 10 15

Thr Glu Asn Gly Val His Lys Trp Lys Gly Ile Pro Tyr Ala Lys Pro  
 20 25 30

Pro Val Gly Gln Trp Arg Phe Lys Ala Pro Glu Pro Pro Glu Val Trp  
 35 40 45

Glu Asp Val Leu Asp Ala Thr Ala Tyr Gly Pro Ile Cys Pro Gln Pro  
 50 55 60

Ser Asp Leu Leu Ser Leu Ser Tyr Thr Glu Leu Pro Arg Gln Ser Glu  
 65 70 75 80

Asp Cys Leu Tyr Val Asn Val Phe Ala Pro Asp Thr Pro Ser Gln Asn  
 85 90 95

Leu Pro Val Met Val Trp Ile His Gly Gly Ala Phe Tyr Leu Gly Ala  
 100 105 110

Gly Ser Glu Pro Leu Tyr Asp Gly Ser Lys Leu Ala Ala Gln Gly Glu  
 115 120 125

Val Ile Val Val Thr Leu Asn Tyr Arg Leu Gly Pro Phe Gly Phe Leu  
 130 135 140

ES 2 368 943 T3

His Leu Ser Ser Phe Asp Glu Ala Tyr Ser Asp Asn Leu Gly Leu Leu  
 145 150 155 160

Asp Gln Ala Ala Ala Leu Lys Trp Val Arg Glu Asn Ile Ser Ala Phe  
 165 170 175

Gly Gly Asp Pro Asp Asn Val Thr Val Phe Gly Glu Ser Ala Gly Gly  
 180 185 190

Met Ser Ile Ala Ala Leu Leu Ala Met Pro Ala Ala Lys Gly Leu Phe  
 195 200 205

Gln Lys Ala Ile Met Glu Ser Gly Ala Ser Arg Thr Met Thr Lys Glu  
 210 215 220

Gln Ala Ala Ser Thr Ser Ala Ala Phe Leu Gln Val Leu Gly Ile Asn  
 225 230 235 240

Glu Gly Gln Leu Asp Lys Leu His Thr Val Ser Ala Glu Asp Leu Leu  
 245 250 255

Lys Ala Ala Asp Gln Leu Arg Ile Ala Glu Lys Glu Asn Ile Phe Gln  
 260 265 270

Leu Phe Phe Gln Pro Ala Leu Asp Pro Lys Thr Leu Pro Ala Glu Pro  
 275 280 285

Glu Lys Ala Ile Ser Glu Gly Ala Ala Ser Gly Ile Pro Leu Leu Ile  
 290 295 300

Gly Thr Thr Arg Asp Glu Gly Tyr Leu Phe Phe Thr Pro Asp Ser Asp  
 305 310 315 320

Val His Ser Gln Glu Thr Leu Asp Ala Ala Leu Glu Tyr Leu Leu Gly  
 325 330 335

Lys Pro Leu Ala Glu Lys Ala Ala Asp Leu Tyr Pro Arg Ser Leu Glu  
 340 345 350

Ser Gln Ile His Met Met Thr Asp Leu Leu Phe Trp Arg Pro Ala Val  
 355 360 365

Ala Tyr Ala Ser Ala Gln Ser His Tyr Ala Pro Val Trp Met Tyr Arg  
 370 375 380

Phe Asp Trp His Pro Lys Lys Pro Pro Tyr Asn Lys Ala Phe His Ala  
 385 390 395 400

ES 2 368 943 T3

Leu Glu Leu Pro Phe Val Phe Gly Asn Leu Asp Gly Leu Glu Arg Met  
 405 410 415

Ala Lys Ala Glu Ile Thr Asp Glu Val Lys Gln Leu Ser His Thr Ile  
 420 425 430

Gln Ser Ala Trp Ile Thr Phe Ala Lys Thr Gly Asn Pro Ser Thr Glu  
 435 440 445

Ala Val Asn Trp Pro Thr Tyr His Glu Glu Thr Arg Glu Thr Leu Ile  
 450 455 460

Leu Asp Ser Glu Ile Thr Ile Glu Asn Asp Pro Glu Ser Glu Lys Arg  
 465 470 475 480

Gln Lys Leu Phe Pro Ser Lys Gly Glu  
 485

<210> 3  
 <211> 1470  
 <212> ADN  
 <213> Bacillus subtilis  
 <400> 3

5

atgactcacc aaatagtaac gactcaatac ggcaaagtaa aaggcacaac ggaaaacggc 60  
 gtacataagt ggaaaggcat cccctatgcc aagccgcctg tcggacaatg gcgttttaaa 120  
 gcacctgagc cgcttgaagt gtgggaagat gtccttgatg ccacagcgta cgccctatt 180  
 tgcccgcagc cgtctgattt gctctcactg tcgtatacag agctgccccg ccagtccgag 240  
 gattgcttgt atgtcaatgt atttgcgctt gacaccccaa gtcaaaatct tcctgtcatg 300  
 gtgtggattc acggaggcgc tttttatctt ggagcgggca gtgagccatt gtatgacgga 360  
 tcaaaacttg cggcacaggg agaagtcatt gtcgttacat tgaactatcg gctggggccg 420  
 tttggctttt tgcacttgtc ttcgtttgat gaggcgtatt ccgataacct tgggctttta 480  
 gaccaagccg ccgcaactgaa atgggtgctg gagaatattt cagcgttttg cggatgaccc 540  
 gataacgtaa cagtatttgg agaatccgcc ggcgggatga gcattgccgc gcttctcgct 600  
 atgcctgctg caaaaggcct gttccagaaa gcaatcatgg aaagcggcgc ttctcgaacg 660  
 atgacgaaag aacaagcggc gagcacctcg gcagcctttt tacaggtcct tgggattaac 720  
 gagggccaat tggataaatt gcatacggtt tctgcagaag atttgctaaa agcggctgat 780  
 cagcttcgga ttgcagaaaa agaaaatata tttcagctgt tcttcagcc cgcccttgat 840  
 ccaaaaacgc tgcttctgta accagaaaaa gcgatctcag aaggggctgc ttccggcatt 900  
 cctctattga ttggaacaac ccgtgatgaa ggatatttat tttcaccac ggattcagac 960

10

ES 2 368 943 T3

gttcattctc aggaaacgct tgatgcagca ctcgagtatt tactagggaa gccgctggca 1020  
gagaaagctg ccgatttgta tccgcgttct ctggaaagcc aaattcatat gatgactgat 1080  
ttattatfff ggcgccctgc cgtcgcctat gcatccgcac agtctcatta cgccctgtc 1140  
tggatgtaca ggttcgattg gcacccgaag aagccgccgt acaataaagc gtttcacgca 1200  
ttagagcttc cttttgtctt tggaaatctg gacggattgg aacgaatggc aaaagcggag 1260  
attacggatg aggtgaaaca gctttctcac acgatacaat cagcgtggat cacgttcgct 1320  
aaaacaggaa acccaagcac cgaagctgtg aattggccga cgtatcatga agaaaagaga 1380  
gagacgctga ttttagattc agagattacg atcgaaaacg atcccgaatc tgaaaaaagg 1440  
cagaagctat tcccttcaaa aggagaataa 1470

<210> 4

<211> 1470

<212> ADN

5 <213> Bacillus licheniformis

<400> 4

atgtctcata aaacagtaac aactcaatac ggcaaagtaa aaggcacaac agaaaacggc 60  
gtacataaat ggaaagcat cccctatgcc aaacctctg tccggccatt gcgttttaaa 120  
gcaccggaac ctctgaagc gtgggagaac gaactggacg caacagcata cggctctatt 180  
tgcccgagc cgtctgattt gctgtcactt tcgtatactg agctgccccg ccagtctgag 240  
gattgcttgt atatcaatgt atttgcgcct gatactcaa gtcaaaaacct gcctgtcatg 300  
gtatggattc acggcggcgc tttttatctt ggagcgggca gtgagccatt atatgatggg 360  
tcaagacttg cggcgcaggg agaagtcatt gtcgttacac tgaattatcg tctggggccg 420  
tttggatttt tacatttgtc ttcgtttgaa gagacgtatt ccgataacct tgggcttttg 480  
gaccaagccg ccgcactgaa atgggtgcga gacaatatct cagcatttgg cggatccg 540  
gataacgtaa cagtatttgg agaatcagca ggcggcatga gcattgccgc gctgctcgca 600  
atgcctgcgg caaaaggcct gttccagaaa gcaatcatgg aaagtggcgc ttccagaacg 660  
atgacaaaag aaaaagcggc tagcaccgcg gcagcctttt tagaggtcct tgggattgac 720  
gagagccaat tggacaggtt gcatactgta tctgcggaag atttgcttaa agcggccgat 780  
cagcttcgga aagcagaaaa tgaaaatctc tttcagctgt tcttccagcc cgcccttgat 840  
ccgaaaacgc tgctgctga accagaaaaa gcgatcgag agggtgctgc tgccggcatt 900  
ccgctgttaa tcggaacaaa ccgcgatgaa ggatatttat tttcaccoc ggactcagac 960  
gttcattctc aggaaacggt tgatgcgcg cttgtgtatt tattagggca gccgctggca 1020  
gagaaagccg ccgatctgta tccgcgttcg ctggaaagcc aaattcatat gatgactgat 1080  
ttgttatfff ggcgccggc cgtcgcctgt gcctccgcac agtccatta cgcgcctgtc 1140

ES 2 368 943 T3

tggatgtacc gattcgattg gcactctgat aagccgccgt ataataaagc gtttcacgca 1200  
 ttagagcttc cttttgtttt cggaaatctg gacgggtag aacggatggc aaaagcagag 1260  
 attacggatg aagtgaaaca gctctctcac accatacaat cagcatggat cacgttcgcc 1320  
 aaaacagga acccaagcac tgaagatgta aaatggccgg cgtatcatga ggaaacaaga 1380  
 gagacgctga ttttaaattc agagattgcg attgaaaacg accctgaagc tgaaaaaagg 1440  
 cagaaactat tcccttcaca aggagaataa 1470

<210> 5

<211> 518

<212> PRT

5 <213> Bacillus subtilis

<400> 5

Met Met Arg Lys Lys Ser Phe Trp Leu Gly Met Leu Thr Ala Phe Met  
1 5 10 15

Leu Val Phe Thr Met Ala Phe Ser Asp Ser Ala Ser Ala Met Thr His  
20 25 30

Gln Ile Val Thr Thr Gln Tyr Gly Lys Val Lys Gly Thr Thr Glu Asn  
35 40 45

Gly Val His Lys Trp Lys Gly Ile Pro Tyr Ala Lys Pro Pro Val Gly  
50 55 60

Gln Trp Arg Phe Lys Ala Pro Glu Pro Pro Glu Val Trp Glu Asp Val  
65 70 75 80

Leu Asp Ala Thr Ala Tyr Gly Pro Ile Cys Pro Gln Pro Ser Asp Leu  
85 90 95

Leu Ser Leu Ser Tyr Thr Glu Leu Pro Arg Gln Ser Glu Asp Cys Leu  
100 105 110

Tyr Val Asn Val Phe Ala Pro Asp Thr Pro Ser Gln Asn Leu Pro Val  
115 120 125

Met Val Trp Ile His Gly Gly Ala Phe Tyr Leu Gly Ala Gly Ser Glu  
130 135 140

Pro Leu Tyr Asp Gly Ser Lys Leu Ala Ala Gln Gly Glu Val Ile Val  
145 150 155 160

Val Thr Leu Asn Tyr Arg Leu Gly Pro Phe Gly Phe Leu His Leu Ser  
165 170 175

ES 2 368 943 T3

Ser Phe Asp Glu Ala Tyr Ser Asp Asn Leu Gly Leu Leu Asp Gln Ala  
 180 185 190

Ala Ala Leu Lys Trp Val Arg Glu Asn Ile Ser Ala Phe Gly Gly Asp  
 195 200 205

Pro Asp Asn Val Thr Val Phe Gly Glu Ser Ala Gly Gly Met Ser Ile  
 210 215 220

Ala Ala Leu Leu Ala Met Pro Ala Ala Lys Gly Leu Phe Gln Lys Ala  
 225 230 235 240

Ile Met Glu Ser Gly Ala Ser Arg Thr Met Thr Lys Glu Gln Ala Ala  
 245 250 255

Ser Thr Ser Ala Ala Phe Leu Gln Val Leu Gly Ile Asn Glu Gly Gln  
 260 265 270

Leu Asp Lys Leu His Thr Val Ser Ala Glu Asp Leu Leu Lys Ala Ala  
 275 280 285

Asp Gln Leu Arg Ile Ala Glu Lys Glu Asn Ile Phe Gln Leu Phe Phe  
 290 295 300

Gln Pro Ala Leu Asp Pro Lys Thr Leu Pro Ala Glu Pro Glu Lys Ala  
 305 310 315 320

Ile Ser Glu Gly Ala Ala Ser Gly Ile Pro Leu Leu Ile Gly Thr Thr  
 325 330 335

Arg Asp Glu Gly Tyr Leu Phe Phe Thr Pro Asp Ser Asp Val His Ser  
 340 345 350

Gln Glu Thr Leu Asp Ala Ala Leu Glu Tyr Leu Leu Gly Lys Pro Leu  
 355 360 365

Ala Glu Lys Ala Ala Asp Leu Tyr Pro Arg Ser Leu Glu Ser Gln Ile  
 370 375 380

His Met Met Thr Asp Leu Leu Phe Trp Arg Pro Ala Val Ala Tyr Ala  
 385 390 395 400

Ser Ala Gln Ser His Tyr Ala Pro Val Trp Met Tyr Arg Phe Asp Trp  
 405 410 415

His Pro Lys Lys Pro Pro Tyr Asn Lys Ala Phe His Ala Leu Glu Leu  
 420 425 430

ES 2 368 943 T3

Pro Phe Val Phe Gly Asn Leu Asp Gly Leu Glu Arg Met Ala Lys Ala  
 435 440 445

Glu Ile Thr Asp Glu Val Lys Gln Leu Ser His Thr Ile Gln Ser Ala  
 450 455 460

Trp Ile Thr Phe Ala Lys Thr Gly Asn Pro Ser Thr Glu Ala Val Asn  
 465 470 475 480

Trp Pro Thr Tyr His Glu Glu Thr Arg Glu Thr Leu Ile Leu Asp Ser  
 485 490 495

Glu Ile Thr Ile Glu Asn Asp Pro Glu Ser Glu Lys Arg Gln Lys Leu  
 500 505 510

Phe Pro Ser Lys Gly Glu  
 515

<210> 6  
 <211> 518  
 <212> PRT  
 <213> Bacillus licheniformis  
 <400> 6

5

Met Met Arg Lys Lys Ser Phe Trp Leu Gly Met Leu Thr Ala Phe Met  
 1 5 10 15

Leu Val Phe Thr Met Ala Phe Ser Asp Ser Ala Ser Ala Met Thr His  
 20 25 30

Gln Ile Val Thr Thr Gln Tyr Gly Lys Val Lys Gly Thr Thr Glu Asn  
 35 40 45

Gly Val His Lys Trp Lys Gly Ile Pro Tyr Ala Lys Pro Pro Val Gly  
 50 55 60

Gln Trp Arg Phe Lys Ala Pro Glu Pro Pro Glu Val Trp Glu Asp Val  
 65 70 75 80

Leu Asp Ala Thr Ala Tyr Gly Pro Ile Cys Pro Gln Pro Ser Asp Leu  
 85 90 95

Leu Ser Leu Ser Tyr Thr Glu Leu Pro Arg Gln Ser Glu Asp Cys Leu  
 100 105 110

Tyr Val Asn Val Phe Ala Pro Asp Thr Pro Ser Gln Asn Leu Pro Val  
 115 120 125

10

ES 2 368 943 T3

Met Val Trp Ile His Gly Gly Ala Phe Tyr Leu Gly Ala Gly Ser Glu  
130 135 140

Pro Leu Tyr Asp Gly Ser Lys Leu Ala Ala Gln Gly Glu Val Ile Val  
145 150 155 160

Val Thr Leu Asn Tyr Arg Leu Gly Pro Phe Gly Phe Leu His Leu Ser  
165 170 175

Ser Phe Asp Glu Ala Tyr Ser Asp Asn Leu Gly Leu Leu Asp Gln Ala  
180 185 190

Ala Ala Leu Lys Trp Val Arg Glu Asn Ile Ser Ala Phe Gly Gly Asp  
195 200 205

Pro Asp Asn Val Thr Val Phe Gly Glu Ser Ala Gly Gly Met Ser Ile  
210 215 220

Ala Ala Leu Leu Ala Met Pro Ala Ala Lys Gly Leu Phe Gln Lys Ala  
225 230 235 240

Ile Met Glu Ser Gly Ala Ser Arg Thr Met Thr Lys Glu Gln Ala Ala  
245 250 255

Ser Thr Ser Ala Ala Phe Leu Gln Val Leu Gly Ile Asn Glu Gly Gln  
260 265 270

Leu Asp Lys Leu His Thr Val Ser Ala Glu Asp Leu Leu Lys Ala Ala  
275 280 285

Asp Gln Leu Arg Ile Ala Glu Lys Glu Asn Ile Phe Gln Leu Phe Phe  
290 295 300

Gln Pro Ala Leu Asp Pro Lys Thr Leu Pro Ala Glu Pro Glu Lys Ala  
305 310 315 320

Ile Ser Glu Gly Ala Ala Ser Gly Ile Pro Leu Leu Ile Gly Thr Thr  
325 330 335

Arg Asp Glu Gly Tyr Leu Phe Phe Thr Pro Asp Ser Asp Val His Ser  
340 345 350

Gln Glu Thr Leu Asp Ala Ala Leu Glu Tyr Leu Leu Gly Lys Pro Leu  
355 360 365

Ala Glu Lys Ala Ala Asp Leu Tyr Pro Arg Ser Leu Glu Ser Gln Ile

ES 2 368 943 T3

370	375	380
His Met Met Thr Asp Leu Leu Phe Trp Arg Pro Ala Val Ala Tyr Ala		
385	390	395 400
Ser Ala Gln Ser His Tyr Ala Pro Val Trp Met Tyr Arg Phe Asp Trp		
	405	410 415
His Pro Lys Lys Pro Pro Tyr Asn Lys Ala Phe His Ala Leu Glu Leu		
	420	425 430
Pro Phe Val Phe Gly Asn Leu Asp Gly Leu Glu Arg Met Ala Lys Ala		
	435	440 445
Glu Ile Thr Asp Glu Val Lys Gln Leu Ser His Thr Ile Gln Ser Ala		
450	455	460
Trp Ile Thr Phe Ala Lys Thr Gly Asn Pro Ser Thr Glu Ala Val Asn		
465	470	475 480
Trp Pro Thr Tyr His Glu Glu Thr Arg Glu Thr Leu Ile Leu Asp Ser		
	485	490 495
Glu Ile Thr Ile Glu Asn Asp Pro Glu Ser Glu Lys Arg Gln Lys Leu		
	500	505 510
Phe Pro Ser Lys Gly Glu		
	515	

<210> 7  
 <211> 1557  
 <212> ADN  
 <213> Bacillus subtilis  
 <400> 7

5

atgatgagga aaaagagttt ttggcttggg atgctgacgg ccttcatgct cgtgttcacg	60
atggcattca gcgattccgc ttctgctatg actcatcaaa tagtaacgac tcaatacggc	120
aaagtaaaag gcacaacgga aaacggcgta cataagtgga aaggcatccc ctatgccaaag	180
ccgcctgtcg gacaatggcg ttttaaagca cctgagccgc ctgaagtgtg ggaagatgtc	240
cttgatgcca cagcgtacgg ccctatattgc ccgcagccgt ctgatttgct ctcaactgtcg	300
tatacagagc tgccccgcca gtccgaggat tgcttgtatg tcaatgtatt tgcgcctgac	360
acccaagtc aaaatcttcc tgtcatgggtg tggattcacg gaggcgcttt ttatcttggga	420
gcgggcagtg agccattgta tgacggatca aaacttgccg cacagggaga agtcattgtc	480
gttacattga actatcggct ggggcccgtt ggctttttgc acttgtcttc gtttgatgag	540

10

ES 2 368 943 T3

gcgtattccg ataaccttgg gcttttagac caagccgccg cactgaaatg ggtgcgggag 600  
aatatttcag cgtttggcgg tgatcccgat aacgtaacag tatttggaga atccgccggc 660  
gggatgagca ttgccgcgct tctcgctatg cctgcggcaa aaggcctggt ccagaaagca 720  
atcatggaaa gcggcgcttc tcgaacgatg acgaaagaac aagcggcgag cacctcggca 780  
gcctttttac aggtccttgg gattaacgag ggccaattgg ataaattgca tacggtttct 840  
gcagaagatt tgctaaaagc ggctgatcag cttcggattg cagaaaaaga aaatatcttt 900  
cagctgttct tccagcccgc ccttgatcca aaaacgctgc ctgctgaacc agaaaaagcg 960  
atctcagaag gggctgcttc cggcattcct ctattgattg gaacaaccgc tgatgaagga 1020  
tatttatttt tcaccccgga ttcagacggt cattctcagg aaacgcttga tgcagcactc 1080  
gagtatttac tagggaagcc gctggcagag aaagctgccg atttgtatcc gcgttctctg 1140  
gaaagccaaa ttcatatgat gactgattta ttattttggc gccctgccgt cgcctatgca 1200  
tccgcacagt ctattacgc cctgtctgg atgtacaggt tcgattggca cccgaagaag 1260  
ccgccgtaca ataaagcgtt tcacgcatta gagcttcctt ttgtctttgg aaatctggac 1320  
ggattggaac gaatggcaaa agcggagatt acggatgagg tgaaacagct ttctcacacg 1380  
atacaatcag cgtggatcac gtctgctaaa acaggaaacc caagcaccga agctgtgaat 1440  
tggccgacgt atcatgaaga aacgagagag acgctgattt tagattcaga gattacgatc 1500  
gaaaacgatc ccgaatctga aaaaaggcag aagctattcc cttcaaaagg agaataa 1557

<210> 8

<211> 1557

<212> ADN

5 <213> Bacillus licheniformis

<400> 8

atgatgagga aaaagagttt ttggcttggg atgctgacgg ccttcatgct cgtgttcacg 60  
atggcattca gcgattccgc ttctgctatg tctcataaaa cagtaacaac tcaatacggc 120  
aaagtaaaag gcacaacaga aaacggcgta cataaatgga aaggcatccc ctatgccaaa 180  
cctcctgtcg ggccattgcg ttttaaagca ccggaacctc ctgaagcgtg ggagaacgaa 240  
ctggacgcaa cagcatacgg ctctatttgc ccgcagccgt ctgatttget gtcactttcg 300  
tatactgagc tgccccgcca gtctgaggat tgcttgata tcaatgtatt tgcgcctgat 360  
actccaagtc aaaacctgcc tgatcatgga tggattcacg gcggcgcttt ttatcttggg 420  
gcgggcagtg agccattata tgatgggtca agacttgccg cgcagggaga agtcattgtc 480  
gttactactga attatcgtct ggggcccgtt ggatttttac atttgtcttc gtttgaagag 540  
acgtattccg ataaccttgg gcttttggac caagccgccg cactgaaatg ggtgcgagac 600  
aatatctcag catttggcgg tgatcccgat aacgtaacag tatttggaga atcagcaggc 660

ES 2 368 943 T3

ggcatgagca ttgccgcgct gctcgcgatg cctgcgggcaa aaggcctgtt ccagaaagca 720  
 atcatggaaa gtggcgcttc cagaacgatg acaaaagaaa aagcggctag caccgcggca 780  
 gccttttttag aggtccttgg gattgacgag agccaattgg acaggttgca tactgtatct 840  
 gcggaagatt tgcttaaagc ggccgatcag ctccggaaaag cagaaaatga aaatctcttt 900  
 cagctgttct tccagcccgc ccttgatccg aaaacgctgc ctgctgaacc agaaaaagcg 960  
 atcgcagagg gtgctgctgc cggcattccg ctgttaatcg gaacaaaccg cgatgaagga 1020  
 tatttttttt tcaccccgga ctcagacggt cattctcagg aaacgtttga tgccgcgctt 1080  
 gtgtatttat tagggcagcc gctggcagag aaagccgccc atctgtatcc gcgttcgctg 1140  
 gaaagccaaa ttcatatgat gactgatttg ttattttggc gcccggccgt cgctgtgcc 1200  
 tccgcacagt cccattacgc gcctgtctgg atgtaccgat tcgattggca ctctgataag 1260  
 ccgccgtata ataaagcgtt tcacgcatta gagcttctt ttgttttcgg aaatctggac 1320  
 gggttagaac ggatggcaaa agcagagatt acggatgaag tgaaacagct ctctcacacc 1380  
 atacaatcag catggatcac gttcgccaaa acagggaaacc caagcactga agatgtaaaa 1440  
 tggccggcgt atcatgagga aacaagagag acgctgattt taaattcaga gattgcgatt 1500  
 gaaaacgacc ctgaagctga aaaaaggcag aaactattcc cttcacaagg agaataa 1557

<210> 9  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220> SEÑAL  
 <223>  
 <400> 9

5

Met Met Arg Lys Lys Ser Phe Trp Leu Gly Met Leu Thr Ala Phe Met  
 1 5 10 15

Leu Val Phe Thr Met Ala Phe Ser Asp Ser Ala Ser Ala  
 20 25

10

<210> 10  
 <211> 87  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220> péptido señalizador  
 <223>  
 <400> 10

15

atgatgagga aaaagagttt ttggcttggg atgctgacgg ccttcatgct cgtgttcacg 60  
 atggcattca gcgattccgc ttctgct 87

20

<210> 11  
 <211> 489  
 <212> PRT  
 <213> Bacillus subtilis  
 <400> 11

25

ES 2 368 943 T3

Met Thr His Gln Ile Val Thr Thr Gln Tyr Gly Lys Val Lys Gly Thr  
 1 5 10 15

Thr Glu Asn Gly Val His Lys Trp Lys Gly Ile Pro Tyr Ala Lys Pro  
 20 25 30

Pro Val Gly Gln Trp Arg Phe Lys Ala Pro Glu Pro Pro Glu Val Trp  
 35 40 45

Glu Asp Val Leu Asp Ala Thr Ala Tyr Gly Ser Ile Cys Pro Gln Pro  
 50 55 60

Ser Asp Leu Leu Ser Leu Ser Tyr Thr Glu Leu Pro Arg Gln Ser Glu  
 65 70 75 80

Asp Cys Leu Tyr Val Asn Val Phe Ala Pro Asp Thr Pro Ser Lys Asn  
 85 90 95

Leu Pro Val Met Val Trp Ile His Gly Gly Ala Phe Tyr Leu Gly Ala  
 100 105 110

Gly Ser Glu Pro Leu Tyr Asp Gly Ser Lys Leu Ala Ala Gln Gly Glu  
 115 120 125

Val Ile Val Val Thr Leu Asn Tyr Arg Leu Gly Pro Phe Gly Phe Leu  
 130 135 140

His Leu Ser Ser Phe Asn Glu Ala Tyr Ser Asp Asn Leu Gly Leu Leu  
 145 150 155 160

Asp Gln Ala Ala Ala Leu Lys Trp Val Arg Glu Asn Ile Ser Ala Phe  
 165 170 175

Gly Gly Asp Pro Asp Asn Val Thr Val Phe Gly Glu Ser Ala Gly Gly  
 180 185 190

Met Ser Ile Ala Ala Leu Leu Ala Met Pro Ala Ala Lys Gly Leu Phe  
 195 200 205

Gln Lys Ala Ile Met Glu Ser Gly Ala Ser Arg Thr Met Thr Lys Glu  
 210 215 220

Gln Ala Ala Ser Thr Ser Ala Ala Phe Leu Gln Val Leu Gly Ile Asn  
 225 230 235 240

ES 2 368 943 T3

Glu Gly Gln Leu Asp Lys Leu His Thr Val Ser Ala Glu Asp Leu Leu  
 245 250 255

Lys Ala Ala Asp Gln Leu Arg Ile Ala Glu Lys Glu Asn Ile Phe Gln  
 260 265 270

Leu Phe Phe Gln Pro Ala Leu Asp Pro Lys Thr Leu Pro Glu Glu Pro  
 275 280 285

Glu Lys Ala Ile Ala Glu Gly Ala Ala Ser Gly Ile Pro Leu Leu Ile  
 290 295 300

Gly Thr Thr Arg Asp Glu Gly Tyr Leu Phe Phe Thr Pro Asp Ser Asp  
 305 310 315 320

Val His Ser Gln Glu Thr Leu Asp Ala Ala Leu Glu Tyr Leu Leu Gly  
 325 330 335

Lys Pro Leu Ala Glu Lys Val Ala Asp Leu Tyr Pro Arg Ser Leu Glu  
 340 345 350

Ser Gln Ile His Met Met Thr Asp Leu Leu Phe Trp Arg Pro Ala Val  
 355 360 365

Ala Tyr Ala Ser Ala Gln Ser His Tyr Ala Pro Val Trp Met Tyr Arg  
 370 375 380

Phe Asp Trp His Pro Lys Lys Pro Pro Tyr Asn Lys Ala Phe His Ala  
 385 390 395 400

Leu Glu Leu Pro Phe Val Phe Gly Asn Leu Asp Gly Leu Glu Arg Met  
 405 410 415

Ala Lys Ala Glu Ile Thr Asp Glu Val Lys Gln Leu Ser His Thr Ile  
 420 425 430

Gln Ser Ala Trp Ile Thr Phe Ala Lys Thr Gly Asn Pro Ser Thr Glu  
 435 440 445

Ala Val Asn Trp Pro Ala Tyr His Glu Glu Thr Arg Glu Thr Leu Ile  
 450 455 460

Leu Asp Ser Glu Ile Thr Ile Glu Asn Asp Pro Glu Ser Glu Lys Arg  
 465 470 475 480

Gln Lys Leu Phe Pro Ser Lys Gly Glu

ES 2 368 943 T3

<210> 12  
 <211> 490  
 <212> PRT  
 <213> Bacillus licheniformis  
 <400> 12

5

Met Tyr Asp Thr Thr Val Glu Thr Arg Phe Gly Lys Leu Lys Gly Arg  
 1 5 10 15

Ala Glu Asn Gly Val Arg Ile Phe Lys Gly Val Pro Tyr Ala Lys Pro  
 20 25 30

Pro Val Gly Asp Leu Arg Phe Arg Glu Pro Gln Arg Met Glu Ala Trp  
 35 40 45

Glu Gly Glu Leu Asp Ala Phe Gln Phe Gly Pro Val Cys Pro Gln Pro  
 50 55 60

Asp Gly Val Leu Pro Glu Ser Ala Gly Val Gln Lys Ser Glu Asp Cys  
 65 70 75 80

Leu Tyr Leu Asn Val Tyr Ala Pro Glu Glu Ala Asp Gly Asp Leu Pro  
 85 90 95

Val Met Val Trp Ile His Gly Gly Ala Phe Tyr Arg Gly Ala Gly Ser  
 100 105 110

Glu Pro Leu Tyr Asp Gly Thr Gln Leu Ala Lys Gln Gly Lys Val Ile  
 115 120 125

Val Val Thr Ile Asn Tyr Arg Leu Gly Pro Phe Gly Phe Leu His Leu  
 130 135 140

Ser Ser Ile Asp Asp Ser Tyr Ser Ser Asn Leu Gly Leu Leu Asp Gln  
 145 150 155 160

Ile Ala Ala Leu Glu Trp Val Lys Asp Asn Ile Ala Phe Phe Gly Gly  
 165 170 175

Asp Arg His His Ile Thr Val Phe Gly Glu Ser Ala Gly Ser Met Ser  
 180 185 190

Ile Ala Ser Leu Leu Ala Met Pro Lys Ala Lys Gly Leu Phe Gln Gln  
 195 200 205

Ala Ile Met Glu Ser Gly Ala Ser Ala Thr Met Ser Asp Lys Leu Ala



ES 2 368 943 T3

Phe Asp Gln Glu Val Ala Val Glu Ser Asp Pro Tyr Ser Asp Lys Arg  
 465 470 475 480

Lys Met Leu Thr Ala Pro Asn Pro Gln Ile  
 485 490

<210> 13  
 <211> 489  
 <212> PRT  
 5 <213> bacillus subtilis  
 <400> 13

Met Thr His Gln Ile Val Thr Thr Gln Tyr Gly Lys Val Lys Gly Thr  
 1 5 10 15

Thr Glu Asn Gly Val His Lys Trp Lys Gly Ile Pro Tyr Ala Lys Pro  
 20 25 30

Pro Val Gly Gln Trp Arg Phe Lys Ala Pro Glu Pro Pro Glu Val Trp  
 35 40 45

Glu Asp Val Leu Asp Ala Thr Ala Tyr Gly Pro Val Cys Pro Gln Pro  
 50 55 60

Ser Asp Leu Leu Ser Leu Ser Tyr Thr Glu Leu Pro Arg Gln Ser Glu  
 65 70 75 80

Asp Cys Leu Tyr Val Asn Val Phe Ala Pro Asp Thr Pro Ser Gln Asn  
 85 90 95

Leu Pro Val Met Val Trp Ile His Gly Gly Ala Phe Tyr Leu Gly Ala  
 100 105 110

Gly Ser Glu Pro Leu Tyr Asp Gly Ser Lys Leu Ala Ala Gln Gly Glu  
 115 120 125

Val Ile Val Val Thr Leu Asn Tyr Arg Leu Gly Pro Phe Gly Phe Met  
 130 135 140

His Leu Ser Ser Phe Asp Glu Ala Tyr Ser Asp Asn Leu Gly Leu Leu  
 145 150 155 160

Asp Gln Ala Ala Ala Leu Lys Trp Val Arg Glu Asn Ile Ser Ala Phe  
 165 170 175

Gly Gly Asp Pro Asp Asn Val Thr Val Phe Gly Glu Ser Ala Gly Gly  
 180 185 190

ES 2 368 943 T3

Met Ser Ile Ala Ala Leu Leu Ala Met Pro Ala Ala Lys Gly Leu Phe  
 195 200 205

Gln Lys Ala Ile Met Glu Ser Gly Ala Ser Arg Thr Met Thr Lys Glu  
 210 215 220

Gln Ala Ala Ser Thr Ala Ala Ala Phe Leu Gln Val Leu Gly Ile Asn  
 225 230 235 240

Glu Ser Gln Leu Asp Arg Leu His Thr Val Ala Ala Glu Asp Leu Leu  
 245 250 255

Lys Ala Ala Asp Gln Leu Arg Ile Ala Glu Lys Glu Asn Ile Phe Gln  
 260 265 270

Leu Phe Phe Gln Pro Ala Leu Asp Pro Lys Thr Leu Pro Glu Glu Pro  
 275 280 285

Glu Lys Ser Ile Ala Glu Gly Ala Ala Ser Gly Ile Pro Leu Leu Ile  
 290 295 300

Gly Thr Thr Arg Asp Glu Gly Tyr Leu Phe Phe Thr Ser Asp Ser Asp  
 305 310 315 320

Val Arg Ser Gln Glu Thr Leu Asp Ala Ala Leu Glu Tyr Ser Leu Gly  
 325 330 335

Lys Pro Leu Ala Glu Lys Ala Ala Asp Leu Tyr Pro Arg Ser Leu Glu  
 340 345 350

Ser Gln Ile His Met Val Thr Asp Leu Leu Phe Trp Arg Pro Ala Val  
 355 360 365

Ala Phe Ala Ser Ala Gln Ser His Tyr Ala Pro Val Trp Met Tyr Arg  
 370 375 380

Phe Asp Trp His Pro Glu Lys Pro Pro Tyr Asn Lys Ala Phe His Ala  
 385 390 395 400

Leu Glu Leu Pro Phe Val Phe Gly Asn Leu Asp Gly Leu Glu Arg Met  
 405 410 415

Ala Lys Ala Glu Ile Thr Asp Glu Val Lys Gln Leu Ser His Thr Ile  
 420 425 430

Gln Ser Ala Trp Ile Thr Phe Ala Lys Thr Gly Asn Pro Ser Thr Glu  
 435 440 445

ES 2 368 943 T3

Ala Val Asn Trp Pro Ala Tyr His Glu Glu Thr Arg Glu Thr Val Ile  
 450 455 460

Leu Asp Ser Glu Ile Thr Ile Glu Asn Asp Pro Glu Ser Glu Lys Arg  
 465 470 475 480

Gln Lys Leu Phe Pro Ser Lys Gly Glu  
 485

<210> 14

<211> 489

<212> PRT

5 <213> Bacillus subtilis

<400> 14

Met Thr His Gln Ile Val Thr Thr Gln Tyr Gly Lys Val Lys Gly Thr  
 1 5 10 15

Thr Glu Asn Gly Val His Lys Trp Lys Gly Ile Pro Tyr Ala Lys Pro  
 20 25 30

Pro Val Gly Gln Trp Arg Phe Lys Ala Pro Glu Pro Pro Glu Val Trp  
 35 40 45

Glu Asp Val Leu Asp Ala Thr Ala Tyr Gly Pro Ile Cys Pro Gln Pro  
 50 55 60

Ser Asp Leu Leu Ser Leu Ser Tyr Thr Glu Leu Pro Arg Gln Ser Glu  
 65 70 75 80

Asp Cys Leu Tyr Val Asn Val Phe Ala Pro Asp Thr Pro Ser Gln Asn  
 85 90 95

Leu Pro Val Met Val Trp Ile His Gly Gly Ala Phe Tyr Leu Gly Ala  
 100 105 110

Gly Ser Glu Pro Leu Tyr Asp Gly Ser Lys Leu Ala Ala Gln Gly Glu  
 115 120 125

Val Ile Val Val Thr Leu Asn Tyr Arg Leu Gly Pro Phe Gly Phe Leu  
 130 135 140

His Leu Ser Ser Phe Asp Glu Ala Tyr Ser Asp Asn Leu Gly Leu Leu  
 145 150 155 160

Asp Gln Ala Ala Ala Leu Lys Trp Val Arg Glu Asn Ile Ser Ala Phe  
 165 170 175

ES 2 368 943 T3

Gly Gly Asp Pro Asp Asn Val Thr Val Phe Gly Glu Ser Ala Gly Gly  
 180 185 190

Met Ser Ile Ala Ala Leu Leu Ala Met Pro Ala Ala Lys Gly Leu Phe  
 195 200 205

Gln Lys Ala Ile Met Glu Ser Gly Ala Ser Arg Thr Met Thr Lys Glu  
 210 215 220

Gln Ala Ala Ser Thr Ala Ala Ala Phe Leu Gln Val Leu Gly Ile Asn  
 225 230 235 240

Glu Ser Gln Leu Asp Arg Leu His Thr Val Ala Ala Glu Asp Leu Leu  
 245 250 255

Lys Ala Ala Asp Gln Leu Arg Ile Ala Glu Lys Glu Asn Ile Phe Gln  
 260 265 270

Leu Phe Phe Gln Pro Ala Leu Asp Pro Lys Thr Leu Pro Glu Glu Pro  
 275 280 285

Glu Lys Ser Ile Ala Glu Gly Ala Ala Ser Gly Ile Pro Leu Leu Ile  
 290 295 300

Gly Thr Thr Arg Asp Glu Gly Tyr Leu Phe Phe Thr Pro Asp Ser Asp  
 305 310 315 320

Val His Ser Gln Glu Thr Leu Asp Ala Ala Leu Glu Tyr Leu Leu Gly  
 325 330 335

Lys Pro Leu Ala Glu Lys Ala Ala Asp Leu Tyr Pro Arg Ser Leu Glu  
 340 345 350

Ser Gln Ile His Met Met Thr Asp Leu Leu Phe Trp Arg Pro Ala Val  
 355 360 365

Ala Tyr Ala Ser Ala Gln Ser His Tyr Ala Pro Val Trp Met Tyr Arg  
 370 375 380

Phe Asp Trp His Pro Glu Lys Pro Pro Tyr Asn Lys Ala Phe His Ala  
 385 390 395 400

Leu Glu Leu Pro Phe Val Phe Gly Asn Leu Asp Gly Leu Glu Arg Met  
 405 410 415

Ala Lys Ala Glu Ile Thr Asp Glu Val Lys Gln Leu Ser His Thr Ile  
 420 425 430

ES 2 368 943 T3

Gln Ser Ala Trp Ile Thr Phe Ala Lys Thr Gly Asn Pro Ser Thr Glu  
 435 440 445

Ala Val Asn Trp Pro Ala Tyr His Glu Glu Thr Arg Glu Thr Val Ile  
 450 455 460

Leu Asp Ser Glu Ile Thr Ile Glu Asn Asp Pro Glu Ser Glu Lys Arg  
 465 470 475 480

Gln Lys Leu Phe Pro Ser Lys Gly Glu  
 485

<210> 15

<211> 489

<212> PRT

5 <213> Bacillus subtilis

<400> 15

Met Thr His Gln Ile Val Thr Thr Gln Tyr Gly Lys Val Lys Gly Thr  
 1 5 10 15

Thr Glu Asn Gly Val His Lys Trp Lys Gly Ile Pro Tyr Ala Lys Pro  
 20 25 30

Pro Val Gly Gln Trp Arg Phe Lys Ala Pro Glu Pro Pro Glu Val Trp  
 35 40 45

Glu Asp Val Leu Asp Ala Thr Ala Tyr Gly Ser Ile Cys Pro Gln Pro  
 50 55 60

Ser Asp Leu Leu Ser Leu Ser Tyr Thr Glu Leu Pro Arg Gln Ser Glu  
 65 70 75 80

Asp Cys Leu Tyr Val Asn Val Phe Ala Pro Asp Thr Pro Ser Lys Asn  
 85 90 95

Leu Pro Val Met Val Trp Ile His Gly Gly Ala Phe Tyr Leu Gly Ala  
 100 105 110

Gly Ser Glu Pro Leu Tyr Asp Gly Ser Lys Leu Ala Ala Gln Gly Glu  
 115 120 125

Val Ile Val Val Thr Leu Asn Tyr Arg Leu Gly Pro Phe Gly Phe Leu  
 130 135 140

His Leu Ser Ser Phe Asn Glu Ala Tyr Ser Asp Asn Leu Gly Leu Leu  
 145 150 155 160

ES 2 368 943 T3

Asp Gln Ala Ala Ala Leu Lys Trp Val Arg Glu Asn Ile Ser Ala Phe  
 165 170 175

Gly Gly Asp Pro Asp Asn Val Thr Val Phe Gly Glu Ser Ala Gly Gly  
 180 185 190

Met Ser Ile Ala Ala Leu Leu Ala Met Pro Ala Ala Lys Gly Leu Phe  
 195 200 205

Gln Lys Ala Ile Met Glu Ser Gly Ala Ser Arg Thr Met Thr Lys Glu  
 210 215 220

Gln Ala Ala Ser Thr Ser Ala Ala Phe Leu Gln Val Leu Gly Ile Asn  
 225 230 235 240

Glu Gly Gln Leu Asp Lys Leu His Thr Val Ser Ala Glu Asp Leu Leu  
 245 250 255

Lys Ala Ala Asp Gln Leu Arg Ile Ala Glu Lys Glu Asn Ile Phe Gln  
 260 265 270

Leu Phe Phe Gln Pro Ala Leu Asp Pro Lys Thr Leu Pro Glu Glu Pro  
 275 280 285

Glu Lys Ala Ile Ala Glu Gly Ala Ala Ser Gly Ile Pro Leu Leu Ile  
 290 295 300

Gly Thr Thr Arg Asp Glu Gly Tyr Leu Phe Phe Thr Pro Asp Ser Asp  
 305 310 315 320

Val His Ser Gln Glu Thr Leu Asp Ala Ala Leu Glu Tyr Leu Leu Gly  
 325 330 335

Lys Pro Leu Ala Glu Lys Val Ala Asp Leu Tyr Pro Arg Ser Leu Glu  
 340 345 350

Ser Gln Ile His Met Met Thr Asp Leu Leu Phe Trp Arg Pro Ala Val  
 355 360 365

Ala Tyr Ala Ser Ala Gln Ser His Tyr Ala Pro Val Trp Met Tyr Arg  
 370 375 380

Phe Asp Trp His Pro Lys Lys Pro Pro Tyr Asn Lys Ala Phe His Ala  
 385 390 395 400

Leu Glu Leu Pro Phe Val Phe Gly Asn Leu Asp Gly Leu Glu Arg Met

ES 2 368 943 T3

405 410 415  
 Ala Lys Ala Glu Ile Thr Asp Glu Val Lys Gln Leu Ser His Thr Ile  
 420 425 430  
 Gln Ser Ala Trp Ile Thr Phe Ala Lys Thr Gly Asn Pro Ser Thr Glu  
 435 440 445  
 Ala Val Asn Trp Pro Ala Tyr His Glu Glu Thr Arg Glu Thr Leu Ile  
 450 455 460  
 Leu Asp Ser Glu Ile Thr Ile Glu Asn Asp Pro Glu Ser Glu Lys Arg  
 465 470 475 480  
 Gln Lys Leu Phe Pro Ser Lys Gly Glu  
 485

<210> 16  
 <211> 489  
 <212> PRT  
 5 <213> Bacillus subtilis  
 <400> 16

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

ES 2 368 943 T3

130						135						140			
His	Leu	Ser	Ser	Phe	Asn	Glu	Ala	Tyr	Ser	Asp	Asn	Leu	Gly	Leu	Leu
145					150					155					160
Asp	Gln	Ala	Ala	Ala	Leu	Lys	Trp	Val	Arg	Glu	Asn	Ile	Ser	Ala	Phe
				165					170					175	
Gly	Gly	Asp	Pro	Asp	Asn	Val	Thr	Val	Phe	Gly	Glu	Ser	Ala	Gly	Gly
			180					185					190		
Met	Ser	Ile	Ala	Ala	Leu	Leu	Ala	Met	Pro	Ala	Ala	Lys	Gly	Leu	Phe
		195					200						205		
Gln	Lys	Ala	Ile	Met	Glu	Ser	Gly	Ala	Ser	Arg	Thr	Met	Thr	Lys	Glu
	210						215				220				
Gln	Ala	Ala	Ser	Thr	Ser	Ala	Ala	Phe	Leu	Gln	Val	Leu	Gly	Ile	Asn
225					230					235					240
Glu	Gly	Gln	Leu	Asp	Lys	Leu	His	Thr	Val	Ser	Ala	Glu	Asp	Leu	Leu
				245					250					255	
Lys	Ala	Ala	Asp	Gln	Leu	Arg	Ile	Ala	Glu	Lys	Glu	Asn	Ile	Phe	Gln
			260					265						270	
Leu	Phe	Phe	Gln	Pro	Ala	Leu	Asp	Pro	Lys	Thr	Leu	Pro	Glu	Glu	Pro
		275					280					285			
Glu	Lys	Ala	Ile	Ala	Glu	Gly	Ala	Ala	Ser	Gly	Ile	Pro	Leu	Leu	Ile
	290					295					300				
Gly	Thr	Thr	Arg	Asp	Glu	Gly	Tyr	Leu	Phe	Phe	Thr	Pro	Asp	Ser	Asp
305					310					315					320
Val	His	Ser	Gln	Glu	Thr	Leu	Asp	Ala	Ala	Leu	Glu	Tyr	Leu	Leu	Gly
				325					330					335	
Lys	Pro	Leu	Ala	Glu	Lys	Val	Ala	Asp	Leu	Tyr	Pro	Arg	Ser	Leu	Glu
			340					345						350	
Ser	Gln	Ile	His	Met	Met	Thr	Asp	Leu	Leu	Phe	Trp	Arg	Pro	Ala	Val
		355					360					365			
Ala	Tyr	Ala	Ser	Ala	Gln	Ser	His	Tyr	Ala	Pro	Val	Trp	Met	Tyr	Arg
	370					375					380				

ES 2 368 943 T3

Phe Asp Trp His Pro Lys Lys Pro Pro Tyr Asn Lys Ala Phe His Ala  
385 390 395 400

Leu Glu Leu Pro Phe Val Phe Gly Asn Leu Asp Gly Leu Glu Arg Met  
405 410 415

Ala Lys Ala Glu Ile Thr Asp Glu Val Lys Gln Leu Ser His Thr Ile  
420 425 430

Gln Ser Ala Trp Ile Thr Phe Ala Lys Thr Gly Asn Pro Ser Thr Glu  
435 440 445

Ala Val Asn Trp Pro Ala Tyr His Glu Glu Thr Arg Glu Thr Leu Ile  
450 455 460

Leu Asp Ser Glu Ile Thr Ile Glu Asn Asp Pro Glu Ser Glu Lys Arg  
465 470 475 480

Gln Lys Leu Phe Pro Ser Lys Gly Glu  
485

- <210> 17
- <211> 489
- <212> PRT
- 5 <213> Bacillus subtilis
- <400> 17

Met Thr His Gln Ile Val Thr Thr Gln Tyr Gly Lys Val Lys Gly Thr  
1 5 10 15

Thr Glu Asn Gly Val His Lys Trp Lys Gly Ile Pro Tyr Ala Lys Pro  
20 25 30

Pro Val Gly Gln Trp Arg Phe Lys Ala Pro Glu Pro Pro Glu Val Trp  
35 40 45

Glu Asp Val Leu Asp Ala Thr Ala Tyr Gly Ser Ile Cys Pro Gln Pro  
50 55 60

Ser Asp Leu Leu Ser Leu Ser Tyr Thr Glu Leu Pro Arg Gln Ser Glu  
65 70 75 80

Asp Cys Leu Tyr Val Asn Val Phe Ala Pro Asp Thr Pro Ser Lys Asn  
85 90 95

Leu Pro Val Met Val Trp Ile His Gly Gly Ala Phe Tyr Leu Gly Ala  
100 105 110

ES 2 368 943 T3

Gly Ser Glu Pro Leu Tyr Asp Gly Ser Lys Leu Ala Ala Gln Gly Glu  
 115 120 125

Val Ile Val Val Thr Leu Asn Tyr Arg Leu Gly Pro Phe Gly Phe Leu  
 130 135 140

His Leu Ser Ser Phe Asn Glu Ala Tyr Ser Asp Asn Leu Gly Leu Leu  
 145 150 155 160

Asp Gln Ala Ala Ala Leu Lys Trp Val Arg Glu Asn Ile Ser Ala Phe  
 165 170 175

Gly Gly Asp Pro Asp Asn Val Thr Val Phe Gly Glu Ser Ala Gly Gly  
 180 185 190

Met Ser Ile Ala Ala Leu Leu Ala Met Pro Ala Ala Lys Gly Leu Phe  
 195 200 205

Gln Lys Ala Ile Met Glu Ser Gly Ala Ser Arg Thr Met Thr Lys Glu  
 210 215 220

Gln Ala Ala Ser Thr Ser Ala Ala Phe Leu Gln Val Leu Gly Ile Asn  
 225 230 235 240

Glu Gly Gln Leu Asp Lys Leu His Thr Val Ser Ala Glu Asp Leu Leu  
 245 250 255

Lys Ala Ala Asp Gln Leu Arg Ile Ala Glu Lys Glu Asn Ile Phe Gln  
 260 265 270

Leu Phe Phe Gln Pro Ala Leu Asp Pro Lys Thr Leu Pro Glu Glu Pro  
 275 280 285

Glu Lys Ala Ile Ala Glu Gly Ala Ala Ser Gly Ile Pro Leu Leu Ile  
 290 295 300

Gly Thr Thr Arg Asp Glu Gly Tyr Leu Phe Phe Thr Pro Asp Ser Asp  
 305 310 315 320

Val His Ser Gln Glu Thr Leu Asp Ala Ala Leu Glu Tyr Leu Leu Gly  
 325 330 335

Lys Pro Leu Ala Glu Lys Val Ala Asp Leu Tyr Pro Arg Ser Leu Glu  
 340 345 350

Ser Gln Ile His Met Met Thr Asp Leu Leu Phe Trp Arg Pro Ala Val  
 355 360 365

ES 2 368 943 T3

Ala Tyr Ala Ser Ala Gln Ser His Tyr Ala Pro Val Trp Met Tyr Arg  
 370 375 380

Phe Asp Trp His Pro Lys Lys Pro Pro Tyr Asn Lys Ala Phe His Ala  
 385 390 395 400

Leu Glu Leu Pro Phe Val Phe Gly Asn Leu Asp Gly Leu Glu Arg Met  
 405 410 415

Ala Lys Ala Glu Ile Thr Asp Glu Val Lys Gln Leu Ser His Thr Ile  
 420 425 430

Gln Ser Ala Trp Ile Thr Phe Ala Lys Thr Gly Asn Pro Ser Thr Glu  
 435 440 445

Ala Val Asn Trp Pro Ala Tyr His Glu Glu Thr Arg Glu Thr Leu Ile  
 450 455 460

Leu Asp Ser Glu Ile Thr Ile Glu Asn Asp Pro Glu Ser Glu Lys Arg  
 465 470 475 480

Gln Lys Leu Phe Pro Ser Lys Gly Glu  
 485

- <210> 18
- <211> 489
- <212> PRT
- 5 <213> Bacillus subtilis
- <400> 18

Met Thr His Gln Ile Val Thr Thr Gln Tyr Gly Lys Val Lys Gly Thr  
 1 5 10 15

Thr Glu Asn Gly Val His Lys Trp Lys Gly Ile Pro Tyr Ala Lys Pro  
 20 25 30

Pro Val Gly Gln Trp Arg Phe Lys Ala Pro Glu Pro Pro Glu Val Trp  
 35 40 45

Glu Asp Val Leu Asp Ala Thr Ala Tyr Gly Ser Ile Cys Pro Gln Pro  
 50 55 60

Ser Asp Leu Leu Ser Leu Ser Tyr Thr Glu Leu Pro Arg Gln Ser Glu  
 65 70 75 80

Asp Cys Leu Tyr Val Asn Val Phe Ala Pro Asp Thr Pro Ser Lys Asn  
 85 90 95

ES 2 368 943 T3

Leu Pro Val Met Val Trp Ile His Gly Gly Ala Phe Tyr Leu Gly Ala  
 100 105 110

Gly Ser Glu Pro Leu Tyr Asp Gly Ser Lys Leu Ala Ala Gln Gly Glu  
 115 120 125

Val Ile Val Val Thr Leu Asn Tyr Arg Leu Gly Pro Phe Gly Phe Leu  
 130 135 140

His Leu Ser Ser Phe Asn Glu Ala Tyr Ser Asp Asn Leu Gly Leu Leu  
 145 150 155 160

Asp Gln Ala Ala Ala Leu Lys Trp Val Arg Glu Asn Ile Ser Ala Phe  
 165 170 175

Gly Gly Asp Pro Asp Asn Val Thr Val Phe Gly Glu Ser Ala Gly Gly  
 180 185 190

Met Ser Ile Ala Ala Leu Leu Ala Met Pro Ala Ala Lys Gly Leu Phe  
 195 200 205

Gln Lys Ala Ile Met Glu Ser Gly Ala Ser Arg Thr Met Thr Lys Glu  
 210 215 220

Gln Ala Ala Ser Thr Ser Ala Ala Phe Leu Gln Val Leu Gly Ile Asn  
 225 230 235 240

Glu Gly Gln Leu Asp Lys Leu His Thr Val Ser Ala Glu Asp Leu Leu  
 245 250 255

Lys Ala Ala Asp Gln Leu Arg Ile Ala Glu Lys Glu Asn Ile Phe Gln  
 260 265 270

Leu Phe Phe Gln Pro Ala Leu Asp Pro Lys Thr Leu Pro Glu Glu Pro  
 275 280 285

Glu Lys Ala Ile Ala Glu Gly Ala Ala Ser Gly Ile Pro Leu Leu Ile  
 290 295 300

Gly Thr Thr Arg Asp Glu Gly Tyr Leu Phe Phe Thr Pro Asp Ser Asp  
 305 310 315 320

Val His Ser Gln Glu Thr Leu Asp Ala Ala Leu Glu Tyr Leu Leu Gly  
 325 330 335

Lys Pro Leu Ala Glu Lys Val Ala Asp Leu Tyr Pro Arg Ser Leu Glu  
 340 345 350

ES 2 368 943 T3

Ser Gln Ile His Met Met Thr Asp Leu Leu Phe Trp Arg Pro Ala Val  
 355 360 365

Ala Tyr Ala Ser Ala Gln Ser His Tyr Ala Pro Val Trp Met Tyr Arg  
 370 375 380

Phe Asp Trp His Pro Lys Lys Pro Pro Tyr Asn Lys Ala Phe His Ala  
 385 390 395 400

Leu Glu Leu Pro Phe Val Phe Gly Asn Leu Asp Gly Leu Glu Arg Met  
 405 410 415

Ala Lys Ala Glu Ile Thr Asp Glu Val Lys Gln Leu Ser His Thr Ile  
 420 425 430

Gln Ser Ala Trp Ile Thr Phe Ala Lys Thr Gly Asn Pro Ser Thr Glu  
 435 440 445

Ala Val Asn Trp Pro Ala Tyr His Glu Glu Thr Arg Glu Thr Leu Ile  
 450 455 460

Leu Asp Ser Glu Ile Thr Ile Glu Asn Asp Pro Glu Ser Glu Lys Arg  
 465 470 475 480

Gln Lys Leu Phe Pro Ser Lys Gly Glu  
 485

- <210> 19
- <211> 490
- <212> PRT
- 5 <213> Bacillus licheniformis
- <400> 19

Met Tyr Asp Thr Thr Val Glu Thr Arg Phe Gly Lys Leu Lys Gly Arg  
 1 5 10 15

Ala Glu Asn Gly Val Arg Ile Phe Lys Gly Val Pro Tyr Ala Lys Pro  
 20 25 30

Pro Val Gly Asp Leu Arg Phe Arg Glu Pro Gln Arg Met Glu Ala Trp  
 35 40 45

Glu Gly Glu Leu Asp Ala Phe Gln Phe Gly Pro Val Cys Pro Gln Pro  
 50 55 60

Asp Gly Val Leu Pro Glu Ser Ala Gly Val Gln Lys Ser Glu Asp Cys  
 65 70 75 80

ES 2 368 943 T3

Leu Tyr Leu Asn Val Tyr Ala Pro Glu Glu Ala Asp Gly Asp Leu Pro  
 85 90 95  
 Val Met Val Trp Ile His Gly Gly Ala Phe Tyr Arg Gly Ala Gly Ser  
 100 105 110  
 Glu Pro Leu Tyr Asp Gly Thr Gln Leu Ala Lys Gln Gly Lys Val Ile  
 115 120 125  
 Val Val Thr Ile Asn Tyr Arg Leu Gly Pro Phe Gly Phe Leu His Leu  
 130 135 140  
 Ser Ser Ile Asp Asp Ser Tyr Ser Ser Asn Leu Gly Leu Leu Asp Gln  
 145 150 155 160  
 Ile Ala Ala Leu Glu Trp Val Lys Asp Asn Ile Ala Phe Phe Gly Gly  
 165 170 175  
 Asp Arg His His Ile Thr Val Phe Gly Glu Ser Ala Gly Ser Met Ser  
 180 185 190  
 Ile Ala Ser Leu Leu Ala Met Pro Lys Ala Lys Gly Leu Phe Gln Gln  
 195 200 205  
 Ala Ile Met Glu Ser Gly Ala Ser Ala Thr Met Ser Asp Lys Leu Ala  
 210 215 220  
 Lys Ala Ala Ala Glu Arg Phe Leu Arg Ile Leu Asp Ile Asp His His  
 225 230 235 240  
 His Leu Glu Arg Leu His Asp Val Ser Asp Gln Glu Leu Leu Glu Ala  
 245 250 255  
 Ala Asp Gln Leu Arg Thr Leu Met Gly Glu Asn Ile Phe Glu Leu Ile  
 260 265 270  
 Phe Leu Pro Ala Leu Asp Glu Lys Thr Leu Pro Leu Lys Pro Glu Val  
 275 280 285  
 Ala Val Ala Lys Gly Ala Ala Lys Glu Ile Asn Leu Leu Ile Gly Thr  
 290 295 300  
 Asn Arg Asp Glu Gly Val Leu Phe Phe Pro Ser Asp Ser Asp Leu Leu  
 305 310 315 320  
 Pro Glu Ser Lys Ile Asn Glu Ile Leu Glu Glu Tyr Met Gly Lys Glu

ES 2 368 943 T3

325 330 335

Ala Ala Glu Ala Ala Ser Ser Leu Tyr Pro Arg Ser Leu Glu Gly His  
340 345 350

Val Asp Met Met Thr Asp Leu Ile Phe Trp His Pro Ser Val Val Phe  
355 360 365

Ala Ser Ala Gln Ser Arg Tyr Ala Ser Val Phe Met Tyr Arg Phe Asp  
370 375 380

Trp His Ala Asp Ser Glu Gln Pro Pro Phe Asn Lys Ala Ala His Gly  
385 390 395 400

Leu Glu Ile Pro Phe Val Phe Gly Asn Met Asp Ile Leu Glu Gln Leu  
405 410 415

Thr Gly Thr Lys Ala Gly Glu Glu Ala Gln Leu Leu Ala Glu Gln Ile  
420 425 430

Gln Ala Ala Trp Val Ser Phe Ala Arg Ser Gly Asn Pro Ser Thr Asp  
435 440 445

Asp Val Ser Trp Pro Asp Tyr Asp Glu Asp Ser Arg Lys Thr Leu Ile  
450 455 460

Phe Asp Gln Glu Val Ala Val Glu Ser Asp Pro Tyr Ser Asp Lys Arg  
465 470 475 480

Lys Met Leu Thr Ala Pro Asn Pro Gln Ile  
485 490

<210> 20

<211> 455

<212> PRT

5 <213> Staphylococcus epidermidis

<400> 20

Met Cys Ser Asn Met Val Gln Val Lys Ile Gly Asn Cys Thr Ile Asn  
1 5 10 15

Gly Leu His Lys Lys Asn Ile Asp Val Phe Leu Gly Ile Pro Tyr Ala  
20 25 30

Lys Ser Phe Asn Lys Ile Ser Arg Phe Gln His Ser Lys Leu Met Glu  
35 40 45

Leu Ser Lys Pro Met Ile Asp Ala Thr His Ile Gln Ser Ile Pro Pro



ES 2 368 943 T3

Ser Tyr Thr His Asp Glu Gly Asp Ile Tyr Ile Glu Asp Ala Thr Arg  
305 310 315 320

Thr Leu Pro Ser Glu Arg Phe Ile His Leu Met Ser Gln Tyr Gly Thr  
325 330 335

His Val Glu Lys Asn Asp Ala Leu Thr Met Lys Gln Gln Arg Asn Leu  
340 345 350

Ile Thr Glu Tyr Cys Phe Val Arg Pro Ile Tyr Leu Phe Leu Asn Lys  
355 360 365

Met Asn Ser Cys Asp Thr Trp Leu Ala Arg Phe Asp Trp His Gln Pro  
370 375 380

His Thr Ser Tyr Phe Lys Ser Ala Tyr His Ile Leu Asp Leu Val Phe  
385 390 395 400

Trp Phe Gly His Leu Ser Ile Leu Thr Lys Asn His Tyr Ser Ile Thr  
405 410 415

Gln His Asp Met Asn Leu Ser Arg Asn Met Ile Ser Asp Leu Ala Tyr  
420 425 430

Phe Ala Arg Lys Gly Lys Met Pro Trp Lys Cys Tyr Glu Pro Gln His  
435 440 445

Gln Ala Leu His Ile Tyr Arg  
450 455

<210> 21

<211> 450

<212> PRT

5 <213> Staphylococcus aureus

<400> 21

Met Lys Ile Asn Thr Thr Gly Gly Gln Ile His Gly Ile Thr Gln Asp  
1 5 10 15

Gly Leu Asp Ile Phe Leu Gly Ile Pro Tyr Ala Glu Pro Pro Val His  
20 25 30

Asp Asn Arg Phe Lys His Ser Thr Leu Lys Thr Gln Trp Ser Glu Pro  
35 40 45

Ile Asp Ala Thr Glu Ile Gln Pro Ile Pro Pro Gln Pro Asp Asn Lys  
50 55 60

ES 2 368 943 T3

Leu Glu Asp Phe Phe Ser Ser Gln Ser Thr Thr Phe Thr Glu His Glu  
 65 70 75 80  
 Asp Cys Leu Tyr Leu Asn Ile Trp Lys Gln His Asn Asp Gln Thr Lys  
 85 90 95  
 Lys Pro Val Ile Ile Tyr Phe Tyr Gly Gly Ser Phe Glu Asn Gly His  
 100 105 110  
 Gly Lys Ala Glu Leu Tyr Gln Pro Ala His Leu Val Gln Asn Asn Asp  
 115 120 125  
 Ile Ile Val Ile Thr Cys Asn Tyr Arg Leu Gly Ala Leu Gly Tyr Leu  
 130 135 140  
 Asp Trp Ser Tyr Phe Asn Lys Asp Phe His Ser Asn Asn Gly Leu Ser  
 145 150 155 160  
 Asp Gln Ile Asn Val Ile Lys Trp Val His Gln Phe Ile Glu Ser Phe  
 165 170 175  
 Gly Gly Asp Ala Asn Asn Ile Thr Leu Met Gly Gln Ser Ala Gly Ser  
 180 185 190  
 Met Ser Ile Leu Thr Leu Leu Lys Ile Pro Asp Ile Glu Pro Tyr Phe  
 195 200 205  
 His Lys Val Val Leu Leu Ser Gly Ala Leu Arg Leu Asp Thr Leu Glu  
 210 215 220  
 Ser Ala Arg Asn Lys Ala Gln His Phe Gln Lys Met Met Leu Asp Tyr  
 225 230 235 240  
 Leu Asp Thr Asp Asp Val Thr Ser Leu Ser Thr Asn Asp Ile Leu Met  
 245 250 255  
 Leu Met Ala Lys Leu Lys Gln Ser Arg Gly Pro Ser Lys Gly Leu Asp  
 260 265 270  
 Leu Ile Tyr Ala Pro Ile Lys Thr Asp Tyr Ile Gln Asn Asn Tyr Pro  
 275 280 285  
 Thr Thr Lys Pro Ile Phe Ala Cys Tyr Thr Lys Asp Glu Gly Asp Ile  
 290 295 300  
 Tyr Ile Thr Ser Glu Gln Lys Lys Leu Ser Pro Gln Arg Phe Ile Asp  
 305 310 315 320

ES 2 368 943 T3

Ile Met Glu Leu Asn Asp Ile Pro Leu Lys Tyr Glu Asp Val Gln Thr  
 325 330 335

Ala Lys Gln Gln Ser Leu Ala Ile Thr His Cys Tyr Phe Lys Gln Pro  
 340 345 350

Met Lys Gln Phe Leu Gln Gln Leu Asn Ile Gln Asp Ser Asn Ala Gln  
 355 360 365

Leu Trp Leu Ala Glu Phe Ala Trp His Asp Thr Ser Ser Ala His Tyr  
 370 375 380

Arg Ser Ala Tyr His Ile Leu Asp Met Val Phe Trp Phe Gly Asn Leu  
 385 390 395 400

Gln Ile Leu Ala Ala His Gln Tyr Pro Thr Thr Ala His Leu Lys Phe  
 405 410 415

Leu Ser Arg Gln Met Gln Asn Asp Leu Ala Asn Phe Ala Lys Ser Gly  
 420 425 430

Lys Met Pro Trp Pro Met Tyr His Asn Glu Arg Arg Tyr Tyr Arg Thr  
 435 440 445

Tyr Gln  
 450

<210> 22

<211> 492

<212> PRT

5 <213> Streptomyces avermitilis

<400> 22

Met Arg Gly Arg Leu Glu Gly Gly Leu Ala Val Phe Arg Gly Val Pro  
 1 5 10 15

Phe Ala Glu Pro Pro Val Gly Asp Ala Arg Phe Ala Ala Pro Arg Pro  
 20 25 30

Val Arg Ala Trp Asp Gly Thr Arg Asp Ala Phe Ala Phe Gly Pro Pro  
 35 40 45

Pro Pro Gln Glu Thr Gly Ile Gln Gly Arg Ala Ala Leu Leu Asp Ala  
 50 55 60

Pro Thr Gly Asp Asp Trp Leu Thr Val Asn Val Trp Thr Pro Asp Pro  
 65 70 75 80

ES 2 368 943 T3

Asp Pro Gly Ala Arg Arg Pro Val Met Val Trp Ile Tyr Gly Gly Ala  
 85 90 95

Tyr Lys Leu Gly His Ser Gly Ser Pro Gly Tyr Asp Ala Arg Arg Ile  
 100 105 110

Ala Arg Asp Gly Asp Val Val Val Val Thr Leu Asn Tyr Arg Val Gly  
 115 120 125

Ile Glu Gly Phe Ala Arg Val Asp Gly Ala Pro Ala Asn Arg Gly Leu  
 130 135 140

Leu Asp Gln Val Ala Ala Leu Glu Trp Val Arg Glu Asn Ile Thr Ala  
 145 150 155 160

Phe Gly Gly Asp Pro Gly Arg Val Thr Val Phe Gly Glu Ser Ala Gly  
 165 170 175

Ala Gly Ser Ile Ala Ser Leu Leu Ala Met Pro Ser Ala Ser Gly Leu  
 180 185 190

Phe Arg Arg Ala Ile Ala Gln Ser Val Pro Gly Thr Tyr Phe Ser Asp  
 195 200 205

Glu Leu Ala Lys Asp Ile Ala Ala Ala Ile Ala Ala Glu Ala Gly Leu  
 210 215 220

Arg Pro Thr Ala Ala Asp Leu Ser Thr Val Asp Pro Arg Gln Leu Pro  
 225 230 235 240

Ala Ala Gly Glu Ala Leu Ala Ala Thr Met Arg Gln Tyr Glu Asp Arg  
 245 250 255

Trp Gly Pro Val Val His Thr Leu Thr Pro Phe Ser Pro Val Val Asp  
 260 265 270

Gly Glu Val Leu Pro Thr Thr Pro Trp Gln Ala Leu Ala Ala Gly Thr  
 275 280 285

Ala Arg Asp Val Glu Leu Ile Val Gly His Asn Ser Glu Glu Phe Arg  
 290 295 300

Leu Phe Val Leu Leu Ser Gly Gln Leu Gly Lys Ile Thr Asp Gly Glu  
 305 310 315 320

Ala Arg Ala Ala Leu Arg Arg Phe Gly Pro Gly Pro Asp Ala Glu Gln  
 325 330 335

ES 2 368 943 T3

Ala Tyr Arg Thr Gly Phe Pro Asp Ala Ser Pro Gly Glu Leu Tyr Glu  
 340 345 350

Arg Val Met Ser Asp Trp Leu Phe His Met Pro Ser Leu His Leu Ala  
 355 360 365

Glu Ala Gln Leu Thr Gly Gly Gly Arg Ala His Val Tyr Glu Leu Thr  
 370 375 380

Trp Pro Ala Pro Gly Asn Gly Gly Val Leu Gly Ala Cys His Gly Leu  
 385 390 395 400

Asp Ile Pro Leu Leu Phe Gly Thr Phe Asp Ala Asp Leu Gly Ser Leu  
 405 410 415

Leu Phe Ala Gly Thr Glu Pro Ser Pro Glu Ala Glu Ala Leu Ser Ser  
 420 425 430

Arg Phe Arg Ala Ser Trp Thr Ala Phe Ala Arg Thr Gly Asp Pro Gly  
 435 440 445

Trp Pro Thr Tyr Asp Thr Glu Arg Arg Leu Val Gln Val Leu Asp Ala  
 450 455 460

Ala Pro Glu Val Ile Pro Tyr Pro Glu Glu Thr Ser Arg Arg Leu Trp  
 465 470 475 480

Glu Arg His Thr Phe Pro Ala Leu Pro Leu Ile Gln  
 485 490

<210> 23

<211> 515

<212> PRT

5 <213> *Caulobacter crescentus*

<400> 23

Met Gly Phe Thr Ala Glu Ala Arg Ser Pro Val Val Ala Thr Thr Asn  
 1 5 10 15

Gly Lys Val Arg Gly Tyr Leu Asp Gly Glu Val Ser Val Phe Lys Gly  
 20 25 30

Leu Arg Tyr Gly Ala Asp Thr Gly Gly Ala Arg Arg Phe Met Pro Pro  
 35 40 45

Val Lys Pro Glu Pro Trp Thr Glu Val Lys Asp Ala Leu Ala Tyr Gly  
 50 55 60

ES 2 368 943 T3

Pro Ala Ser Met Gln Thr Gly Lys Gly Glu Glu Gly Glu Thr Leu Ser  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Cys Leu Phe Leu Asn Val Trp Thr Pro Ala Arg Ala Ser Arg  
 85 90 95  
 Lys Thr Gly Leu Ala Asp Gly Ala Lys Arg Pro Val Met Phe Tyr Ile  
 100 105 110  
 His Gly Gly Ala Tyr Asn Gly Gly Ser Gly Ala Ser Pro Trp Tyr Glu  
 115 120 125  
 Gly Thr Lys Leu Ala Lys Arg Gly Asp Val Val Val Val Thr Val Asn  
 130 135 140  
 His Arg Leu Asn Ala Phe Gly Tyr Leu Tyr Leu Ala Arg Leu Phe Asn  
 145 150 155 160  
 Ala Pro Ser Val Ala Asp Ser Gly Asn Val Gly Gln Leu Asp Leu Val  
 165 170 175  
 Leu Ala Leu Gln Trp Val Arg Asp Asn Ile Ala Arg Phe Gly Gly Asp  
 180 185 190  
 Pro Asp Cys Val Met Leu Phe Gly Gln Ser Gly Gly Gly Ala Lys Ile  
 195 200 205  
 Ala Thr Leu Met Ala Met Pro Ser Ala Lys Gly Leu Phe His Arg Ala  
 210 215 220  
 Ala Thr Met Ser Gly Gln Gln Val Thr Val Gly Gly Pro Phe Asn Ala  
 225 230 235 240  
 Thr Arg Arg Ala Lys Ala Phe Leu Asp Lys Leu Gly Val Lys Asp Leu  
 245 250 255  
 Ala Ala Leu Arg Ala Leu Pro Ala Ala Glu Met Leu Ala Gly Leu Lys  
 260 265 270  
 Ala Val Asp Pro Ile Ala Gly Ser Gly Gly Val Tyr Val Gly Pro Val  
 275 280 285  
 Leu Asp Gln Arg Ser Leu Leu Arg His Pro Phe Phe Pro Asp Ala Ala  
 290 295 300  
 Pro Gln Ser Leu Ser Ile Pro Met Met Val Gly Asn Thr His Asp Glu





ES 2 368 943 T3

Ile Asp Asp Thr Cys Ser Ser Tyr Pro Gly Met Tyr Ile Pro Gly Pro  
 260 265 270

Val Leu Asp Asp Leu Ile Pro Arg Leu Pro Trp Glu Gly Ile Ala Leu  
 275 280 285

Gly Ser Ser Lys Gly Val Lys Leu Ile Ile Gly Thr Asn His Asp Glu  
 290 295 300

Gly Thr Leu Phe Ile Asn Lys Asn Lys Ser Met Leu Pro Gly Gly Trp  
 305 310 315 320

Lys Asp Val Glu Arg Met Leu Arg Met Asn Lys Cys Phe Asp Ser Leu  
 325 330 335

Pro Lys Ile His Lys Leu Tyr Asp Lys Phe Ser Glu Glu Met Ile Gln  
 340 345 350

Ile Gln Glu Ile Met Lys Asp Arg Thr Phe Leu Val Asp Ser Ile Lys  
 355 360 365

Val Ala Asp Ala Gln Ser Glu Lys Asn Asp Thr Trp Met Tyr Arg Phe  
 370 375 380

Asp Tyr Ala Pro Ile Ser Ala Lys Leu Asn Gly Leu Gly Ala Thr His  
 385 390 395 400

Ala Val Glu Val Ser Val Ala Leu Asn Asn Thr Lys Gly Glu Gly Ile  
 405 410 415

Ala Tyr Ser Phe Trp Arg Asp Thr Pro Glu Asp Ile Ile Lys Lys Phe  
 420 425 430

Ile Glu Asn Met His Met Ser Trp Val Asn Phe Ala Lys Thr Gly Asp  
 435 440 445

Pro Asn Gly Asn Leu Asp Ile Glu Trp Lys Lys Tyr Asp Ser Lys Ser  
 450 455 460

Arg Thr Thr Phe Val Phe Asp Glu Glu Asn Lys Val Glu Asn Asn Pro  
 465 470 475 480

Ala Lys Asp Ile Tyr Glu Thr Trp Arg Asp Ile Lys Leu Tyr Thr Asp  
 485 490 495

Ile

ES 2 368 943 T3

- 5 <210> 25  
 <211> 489  
 <212> PRT  
 <213> artificial  
 <220>  
 <223> proteína de origen desconocido, registro en la base de datos gi 7546320  
 <400> 25

```

Met Thr His Gln Ile Val Thr Thr Gln Tyr Gly Lys Val Lys Gly Thr
1          5          10          15

Thr Glu Asn Gly Val His Lys Trp Lys Gly Ile Pro Tyr Ala Lys Pro
          20          25          30

Pro Val Gly Gln Trp Arg Phe Lys Ala Pro Glu Pro Pro Glu Val Trp
          35          40          45

Glu Asp Val Leu Asp Ala Thr Val Tyr Gly Pro Val Cys Pro Gln Pro
          50          55          60

Ser Asp Leu Leu Ser Leu Ser Tyr Lys Glu Leu Pro Arg Gln Ser Glu
65          70          75          80

Asp Cys Leu Tyr Val Asn Val Phe Ala Pro Asp Thr Pro Ser Gln Asn
          85          90          95

Leu Pro Val Met Val Trp Ile His Gly Gly Ala Phe Tyr Leu Gly Ala
          100          105          110

Gly Ser Glu Pro Leu Tyr Asp Gly Ser Lys Leu Ala Ala Gln Gly Glu
          115          120          125

Val Ile Val Val Thr Leu Asn Tyr Arg Leu Gly Pro Phe Gly Phe Met
130          135          140

His Leu Ser Ser Phe Asp Glu Ala Tyr Ser Asp Asn Leu Gly Leu Leu
145          150          155          160

Asp Gln Ala Ala Ala Leu Lys Trp Val Arg Glu Asn Ile Ser Ala Phe
          165          170          175

Gly Gly Asp Pro Asp Asn Val Thr Val Phe Gly Glu Ser Ala Gly Gly
          180          185          190

Met Ser Ile Ala Ala Leu Leu Ala Met Pro Ala Ala Lys Gly Leu Phe
          195          200          205
  
```

ES 2 368 943 T3

Gln Lys Ala Ile Met Glu Ser Gly Ala Ser Arg Thr Met Thr Lys Glu  
 210 215 220

Gln Ala Ala Ser Thr Ala Ala Ala Phe Leu Gln Val Leu Gly Ile Asn  
 225 230 235 240

Glu Ser Gln Leu Asp Arg Leu His Thr Val Ala Ala Glu Asp Leu Leu  
 245 250 255

Lys Ala Ala Asp Gln Leu Arg Ile Ala Glu Lys Glu Asn Ile Phe Gln  
 260 265 270

Leu Phe Phe Gln Pro Ala Leu Asp Pro Lys Thr Leu Pro Glu Glu Pro  
 275 280 285

Glu Lys Ser Ile Ala Glu Gly Ala Ala Ser Gly Ile Pro Leu Leu Ile  
 290 295 300

Gly Thr Thr Arg Asp Glu Gly Tyr Phe Phe Phe Thr Pro Asp Ser Asp  
 305 310 315 320

Val Tyr Ser Gln Glu Thr Leu Asp Ala Ala Leu Glu Tyr Leu Leu Gly  
 325 330 335

Lys Pro Leu Ala Glu Lys Val Ala Asp Leu Tyr Pro Arg Ser Leu Glu  
 340 345 350

Ser Gln Ile His Met Val Thr Asp Leu Leu Phe Trp Arg Pro Ala Val  
 355 360 365

Ala Phe Ala Ser Ala Gln Ser His Tyr Ala Pro Val Trp Met Tyr Arg  
 370 375 380

Phe Asp Trp His Pro Glu Lys Pro Pro Tyr Asn Lys Ala Phe His Thr  
 385 390 395 400

Leu Glu Leu Pro Phe Val Phe Gly Asn Leu Asp Glu Leu Glu Arg Met  
 405 410 415

Ala Lys Ala Glu Ile Thr Asp Glu Val Lys Gln Leu Ser His Thr Ile  
 420 425 430

Gln Ser Ala Trp Thr Thr Phe Ala Lys Thr Gly Asn Pro Ser Thr Glu  
 435 440 445

Ala Val Asn Trp Pro Ala Tyr His Glu Glu Ser Arg Glu Thr Val Ile  
 450 455 460

ES 2 368 943 T3

Leu Asp Ser Glu Ile Thr Ile Glu Asn Asp Pro Glu Ser Glu Lys Arg  
 465 470 475 480

Gln Lys Leu Phe Pro Ser Lys Gly Glu  
 485

<210> 26

<211> 320

<212> PRT

5 <213> burkholderia cepacia

<400> 26

Ala Asp Asn Tyr Ala Ala Thr Arg Tyr Pro Ile Ile Leu Val His Gly  
 1 5 10 15

Leu Thr Gly Thr Asp Lys Tyr Ala Gly Val Leu Glu Tyr Trp Tyr Gly  
 20 25 30

Ile Gln Glu Asp Leu Gln Gln Arg Gly Ala Thr Val Tyr Val Ala Asn  
 35 40 45

Leu Ser Gly Phe Gln Ser Asp Asp Gly Pro Asn Gly Arg Gly Glu Gln  
 50 55 60

Leu Leu Ala Tyr Val Lys Thr Val Leu Ala Ala Thr Gly Ala Thr Lys  
 65 70 75 80

Val Asn Leu Val Gly His Ser Gln Gly Gly Leu Thr Ser Arg Tyr Val  
 85 90 95

Ala Ala Val Ala Pro Asp Leu Val Ala Ser Val Thr Thr Ile Gly Thr  
 100 105 110

Pro His Arg Gly Ser Glu Phe Ala Asp Phe Val Gln Gly Val Leu Ala  
 115 120 125

Tyr Asp Pro Thr Gly Leu Ser Ser Thr Val Ile Ala Ala Phe Val Asn  
 130 135 140

Val Phe Gly Ile Leu Thr Ser Ser Ser Asn Asn Thr Asn Gln Asp Ala  
 145 150 155 160

Leu Ala Ala Leu Lys Thr Leu Thr Thr Ala Gln Ala Ala Thr Tyr Asn  
 165 170 175

Gln Asn Tyr Pro Ser Ala Gly Leu Gly Ala Pro Gly Ser Cys Gln Thr  
 180 185 190

ES 2 368 943 T3

Gly Ala Pro Thr Glu Thr Val Gly Gly Asn Thr His Leu Leu Tyr Ser  
 195 200 205

Trp Ala Gly Thr Ala Ile Gln Pro Thr Ile Ser Val Phe Gly Val Thr  
 210 215 220

Gly Ala Thr Asp Thr Ser Thr Ile Pro Leu Val Asp Pro Ala Asn Ala  
 225 230 235 240

Leu Asp Pro Ser Thr Leu Ala Leu Phe Gly Thr Gly Thr Val Met Val  
 245 250 255

Asn Arg Gly Ser Gly Gln Asn Asp Gly Val Val Ser Lys Cys Ser Ala  
 260 265 270

Leu Tyr Gly Gln Val Leu Ser Thr Ser Tyr Lys Trp Asn His Leu Asp  
 275 280 285

Glu Ile Asn Gln Leu Leu Gly Val Arg Gly Ala Asn Ala Glu Asp Pro  
 290 295 300

Val Ala Val Ile Arg Thr His Ala Asn Arg Leu Lys Leu Ala Gly Val  
 305 310 315 320

<210> 27

<211> 1473

<212> ADN

5 <213> Bacillus licheniformis

<400> 27

```

atgtatgata caactgtcga aacacgcttc ggaaagctga aaggcagagc ggaaaacgga      60
gtccgatatct ttaaaggcgt tccatacgca aaacctcccg tcggcgacct aaggtttcgg      120
gaaccgcagc gaatggaggc ctgggaaggt gagctggatg cttttcaatt tggcccggtt      180
tgtccgcagc ctgatggggt attgcctgag tcagcggggg ttcaaaagtc tgaggattgc      240
ctttatttaa atgtgtacgc accogaagag gcggacgggg atctgcctgt tatgggtgtg      300
atcatgaggg gcgcttttta tcgggcgcc ggaagtgaac cgctctatga cgggactcag      360
cttgcaaagc agggaaaggt gatcgtggtc accatcaatt atcgcctcgg tccgttcgg      420
tttttgcac taccctcaat tgatgattcc tacagcagca atcttggcct gctggatcaa      480
atcgcggctc tcgagtgggt gaaagacaat atcgctttct ttggcggaga ccgtcatcac      540
    
```

# ES 2 368 943 T3

```

attacggttt ttggagagtc ggcgggatcg atgagcatcg cttcgctttt ggcgatgccg      600
aaagcaaagg ggctttttca acaggccatt atggaaagcg gggcttccgc aactatgtcc      660
gataagcttg cgaaagctgc agcagaaaga ttcttaagga ttctcgatat tgatcatcat      720
catctggagc gccttcatga tgtatctgat caagaacttc ttgaagccgc cgatcagctg      780
cgcactttta tgggagaaaa tatttttgaa ttgatttttc tgctgcgct tgacgaaaaa      840
accttgccgc tgaagccgga ggtcgccgtc gcaaaaggcg cggcaaaaga gatcaatcta      900
ttaatcggaa caaacctgta tgaaggcgtc ttgttttttc cctctgatte ggatcttttg      960
cctgagagca agatcaacga gattttagaa gaatacatgg gtaaagaggc cgccgaagcc     1020
gcctcctctc tgtatccgag gtcattggaa ggccatgttg atatgatgac agatctgac     1080
ttttggcatc cgtctgttgt gttcgcttcg gctcaatcac gatatgcatc tgtctttatg     1140
taccggtttg actggcatgc ggattcagag cagccgccgt tcaacaaage tgcgcacggc     1200
ttagagattc cgtttgatt tggaaatatg gacattttgg aacagctgac aggtacgaag     1260
gccggtgaag aagcgcagct gcttgctgaa cagatccagg ctgcctgggt gtcttttgcc     1320
cgatccggaa atccgagcac cgatgatgtc agctggcctg attatgatga agattcacgg     1380
aaaacgctga tttttgatca agaggtcgca gttgaaagcg atccttattc agataagaga     1440
aagatgttga cagccccgaa cccgcagatt tag                                     1473

```

## REIVINDICACIONES

1. Detergente o producto de limpieza, **caracterizado porque** lleva para-nitrobencilesterasas (PNB-esterasas).
- 5 2. Producto según la reivindicación 1, **caracterizado porque** la esterasa está escogida entre las esterasas con una secuencia aminoácida idéntica a una de las indicadas en las SEQ ID NO. 1, 2, 4, 6 u 11-26, preferiblemente 1,2,5, 6 o 12, en al menos un 50%, preferiblemente 60%, especialmente 70%, preferentemente en al menos un 80%, preferiblemente 90%, especialmente 95% y sobre todo en un 100%, u homóloga de las mismas en al menos un 80%, preferiblemente 90%, con especial preferencia 95% y sobre todo en un 100%.
- 10 3. Producto según la reivindicación 1 o 2, **caracterizado porque** las esterasas muestran a 30°C una actividad específica frente al sustrato bis-(p-metilbenzoato) de etilenglicol de 0,1 hasta 30, preferiblemente de 0,6 hasta 20, especialmente de 0,7 hasta 15, con especial preferencia de 0,9 hasta 10, con mayor preferencia de 1 hasta 5, particularmente de 1,1 hasta 4, sobre todo de 1,5 hasta 3  $\mu$ moles de ácido liberado/min-mg de enzima.
- 15 4. Producto según una de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado porque** las esterasas provienen de microorganismos, sobre todo de microorganismos del género Bacillus.
- 20 5. Producto según una de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado porque** al menos contiene uno o varios tensioactivos.
- 25 6. Producto según una de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado porque** además contiene otros enzimas, sobre todo proteasas amilasas, celulasas, hemicelulasas, óxidorreductasas y/o lipasas.
- 30 7. Producto según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** contiene una o varias para-nitrobencil-esterasas en una cantidad de 0,0001  $\mu$ g hasta 480 mg, preferiblemente de 0,005  $\mu$ g hasta 420 mg, con especial preferencia de 0,02  $\mu$ g hasta 360 mg, sobre todo de 0,050  $\mu$ g hasta 240 mg por g de producto.
- 35 8. Uso de una para-nitrobencil-esterasa o de un producto según una de las reivindicaciones 1 a 7 para acabado de tejidos.
- 40 9. Uso de una para-nitrobencil-esterasa o de un producto según una de las reivindicaciones 1 a 7 para proteger fibras, especialmente fibras sintéticas, o para disminuir el "pilling" sobre las mismas.
- 45 10. Uso de una para-nitrobencil-esterasa o de un producto según una de las reivindicaciones 1 a 7 para humectar tejidos antes de teñirlos.
- 50 11. Uso de una para-nitrobencil-esterasa o de un producto según una de las reivindicaciones 1 a 7 para disociar o degradar plásticos, sobre todo poliésteres y/o plastificantes.
- 55 12. Uso de una para-nitrobencil-esterasa o de un producto según una de las reivindicaciones 1 a 7 en la síntesis química de polímeros, sobre todo de poliésteres, especialmente de polialquilentereftalatos.
- 60 13. Uso de una para-nitrobencil-esterasa o de un producto según una de las reivindicaciones 1 a 7 para limpiar tejidos o superficies duras, especialmente en una cantidad de 0,04  $\mu$ g hasta 96 g, preferiblemente de 0,05  $\mu$ g hasta 72 g, con especial preferencia de 1  $\mu$ g hasta 48 g y sobre todo de 2  $\mu$ g hasta 24 g por aplicación.
14. Uso de una para-nitrobencil-esterasa o de un producto según una de las reivindicaciones 1 a 7 para obtener o tratar materias primas o productos intermedios en la producción textil, sobre todo para eliminar capas protectoras de los tejidos.
15. Uso de una para-nitrobencil-esterasa o de un producto según una de las reivindicaciones 1 a 7 para tratar materias primas textiles o cuidar tejidos, sobre todo para tratar fibras sintéticas o tejidos mixtos que llevan fibras sintéticas, especialmente de poliéster.
16. Proceso para el lavado automático de tejidos o superficies duras, **caracterizado porque** al menos en una de las etapas se activa una para-nitrobencil-esterasa y/o un producto según una de las reivindicaciones 1 a 7, especialmente en una cantidad de 0,01  $\mu$ g hasta 96 g, preferiblemente de 0,05  $\mu$ g hasta 72 g, con especial preferencia de 0,1  $\mu$ g hasta 48 g y sobre todo de 0,5  $\mu$ g hasta 24 g por aplicación.
17. Proceso para tratar materias primas textiles o cuidar tejidos, **caracterizado porque** al menos en una de las etapas se activa una para-nitrobencil-esterasa y/o un producto según una de las reivindicaciones 1 a 7, sobre todo para materias primas textiles, fibras o tejidos con componentes sintéticos y con especial preferencia para aquellos que llevan fibras sintéticas, especialmente de poliéster.

Fig. 1:

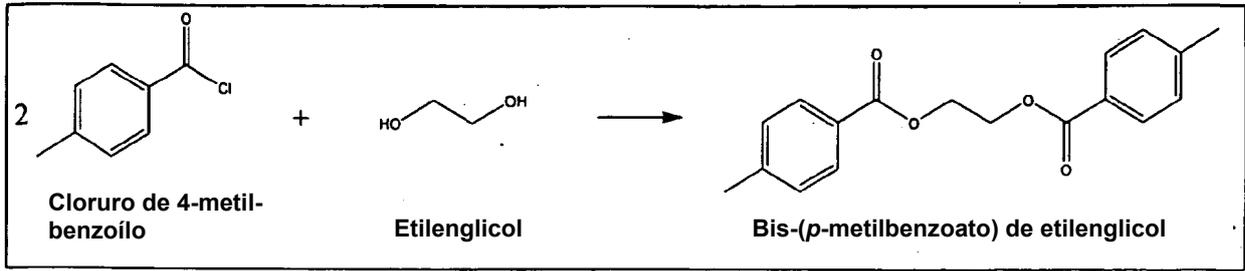


Fig. 2:

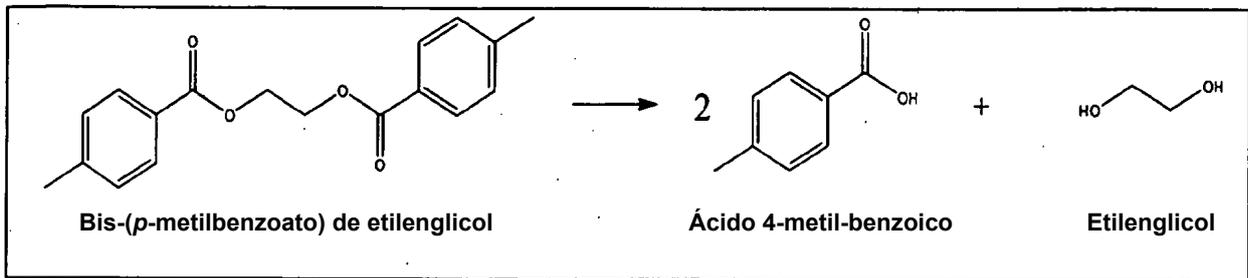


Fig. 3:

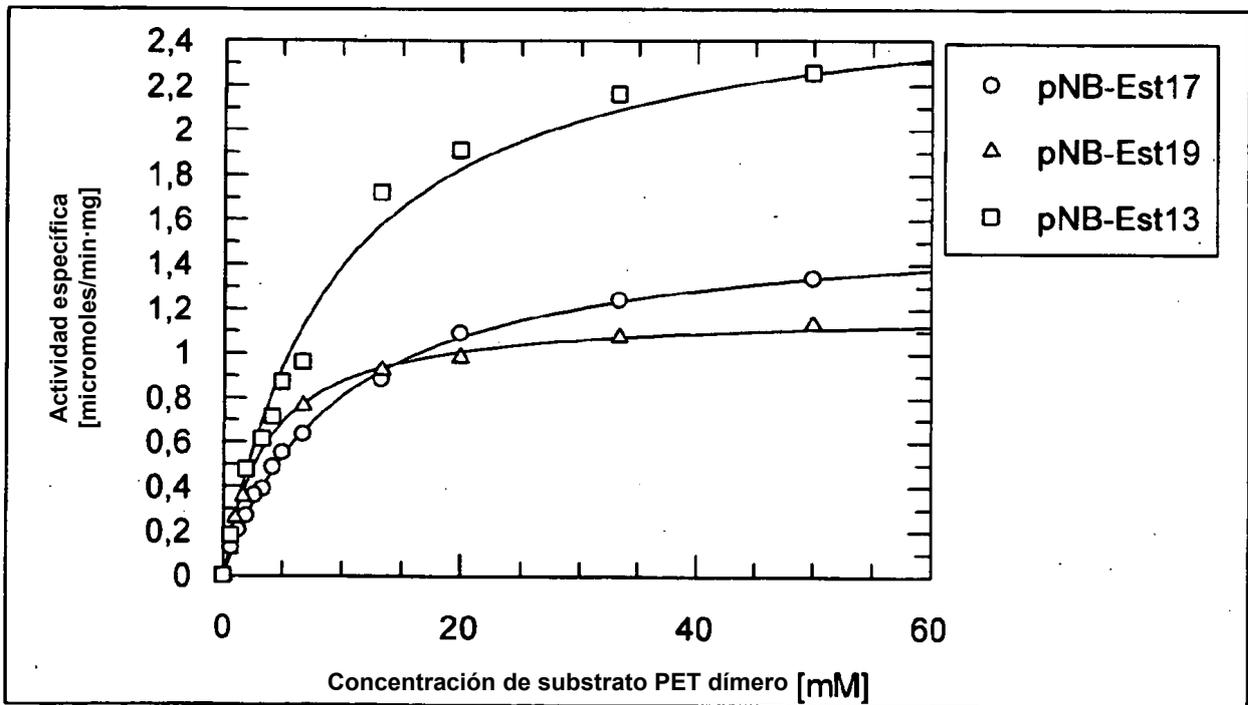


Fig. 4:

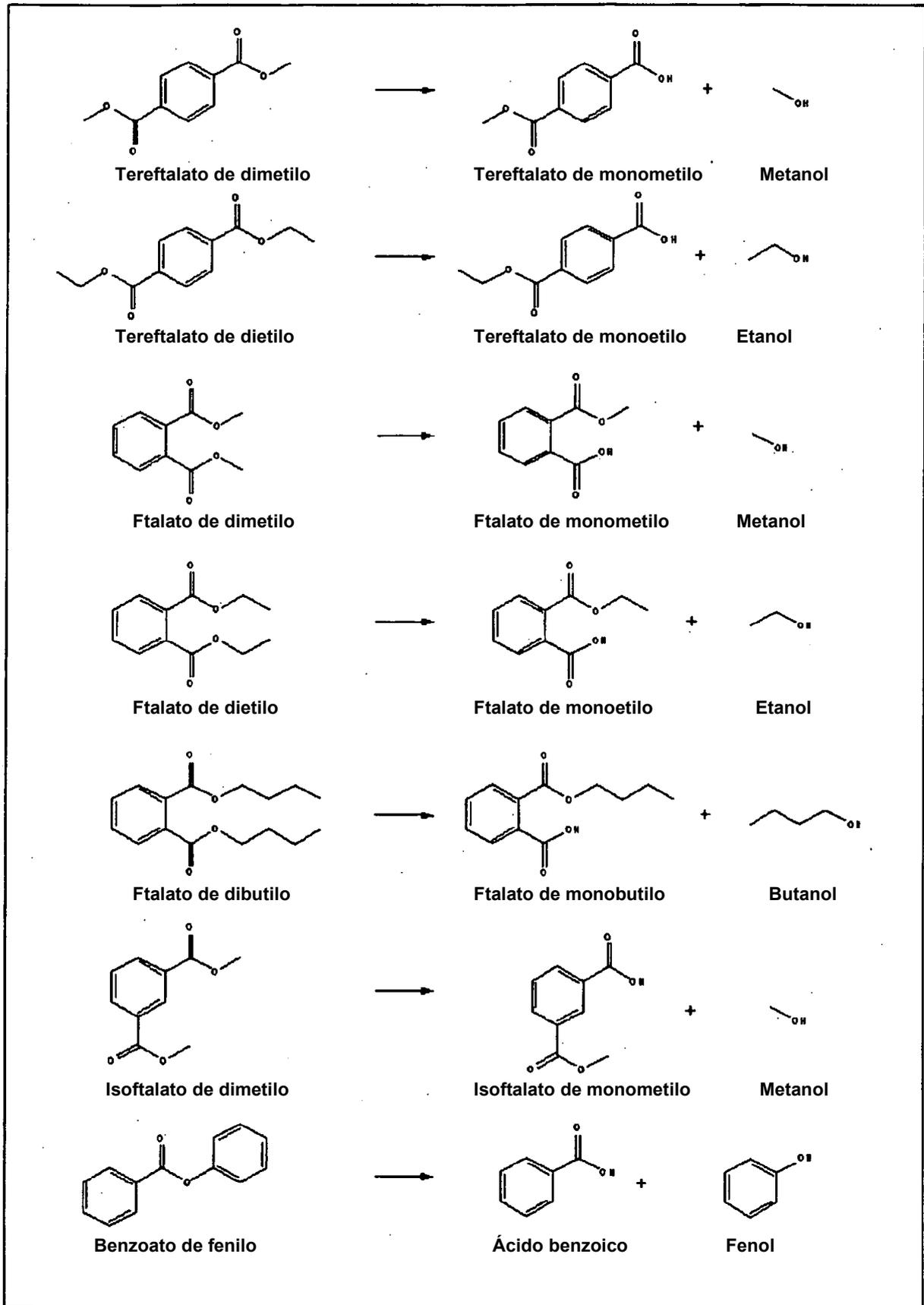


Fig. 5 (a):

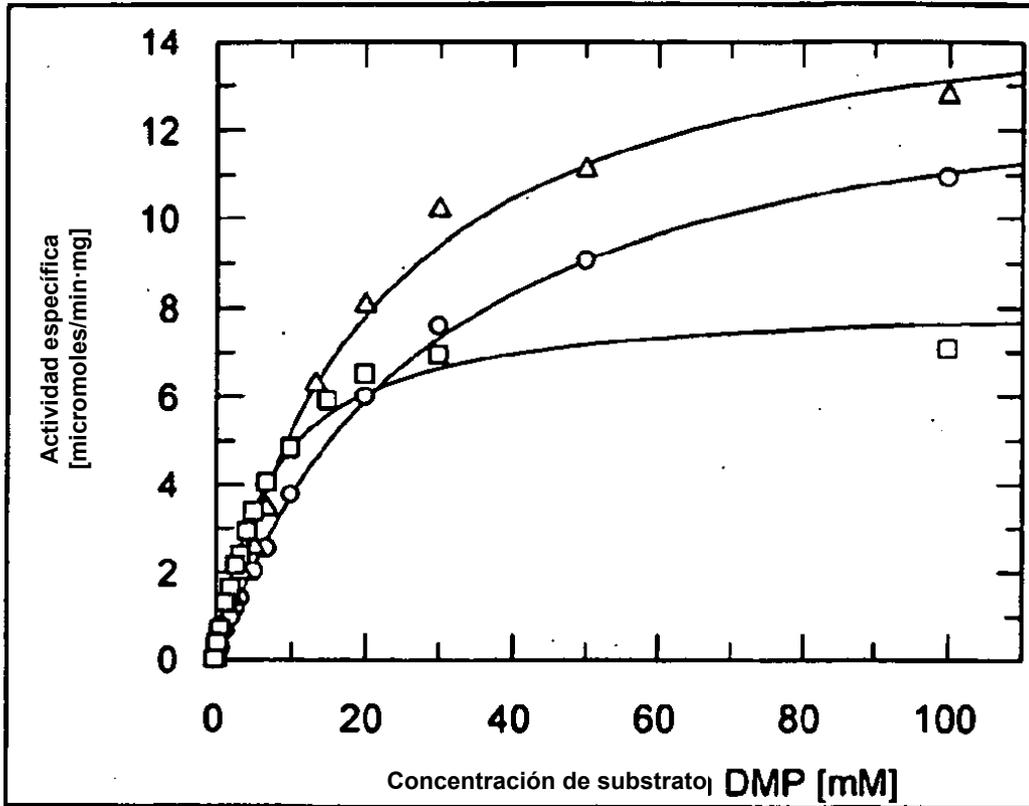


Fig. 5 (b):

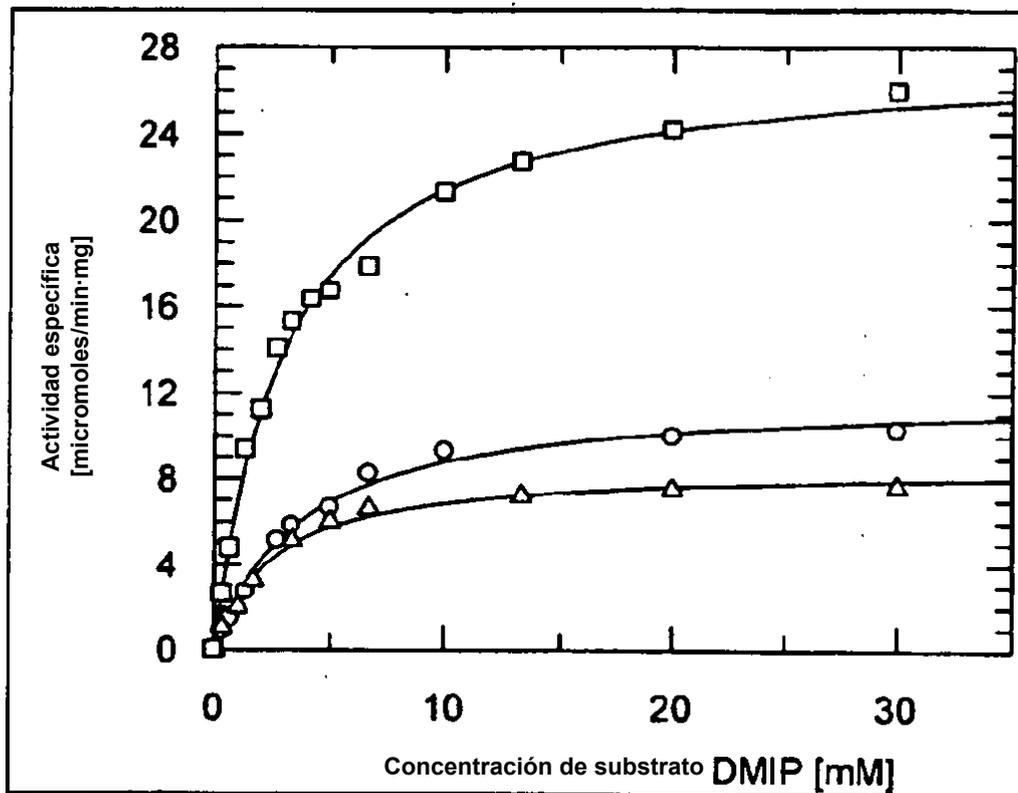


Fig. 5 (c):

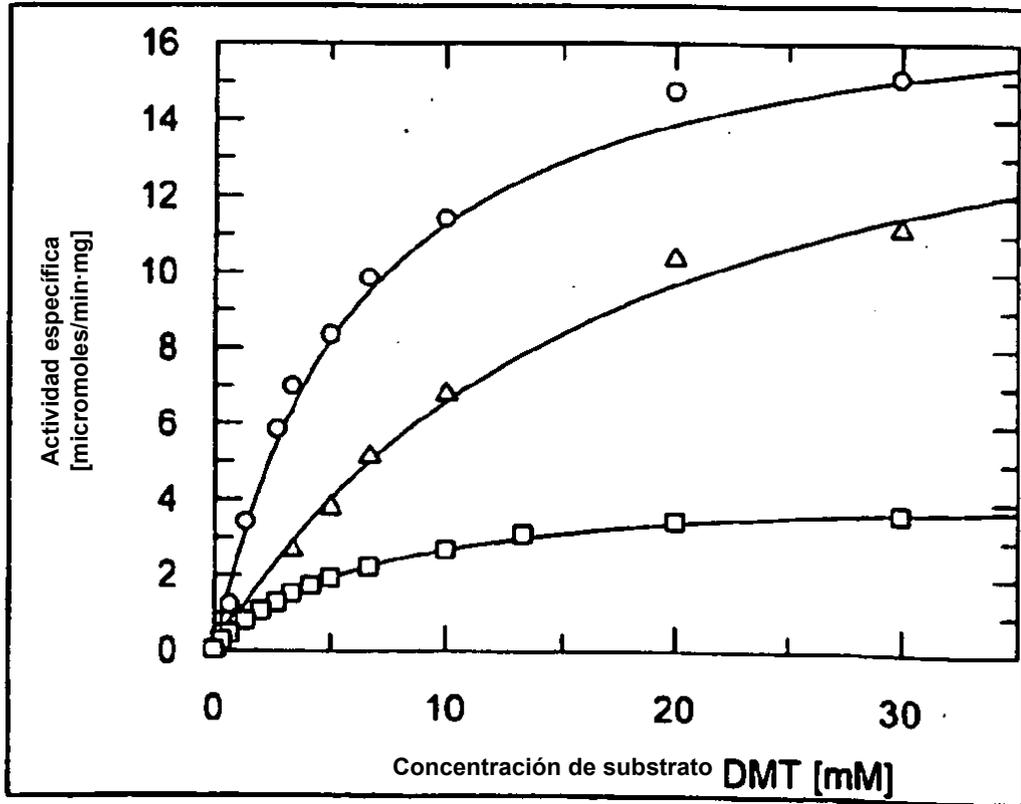


Fig. 6 (a):

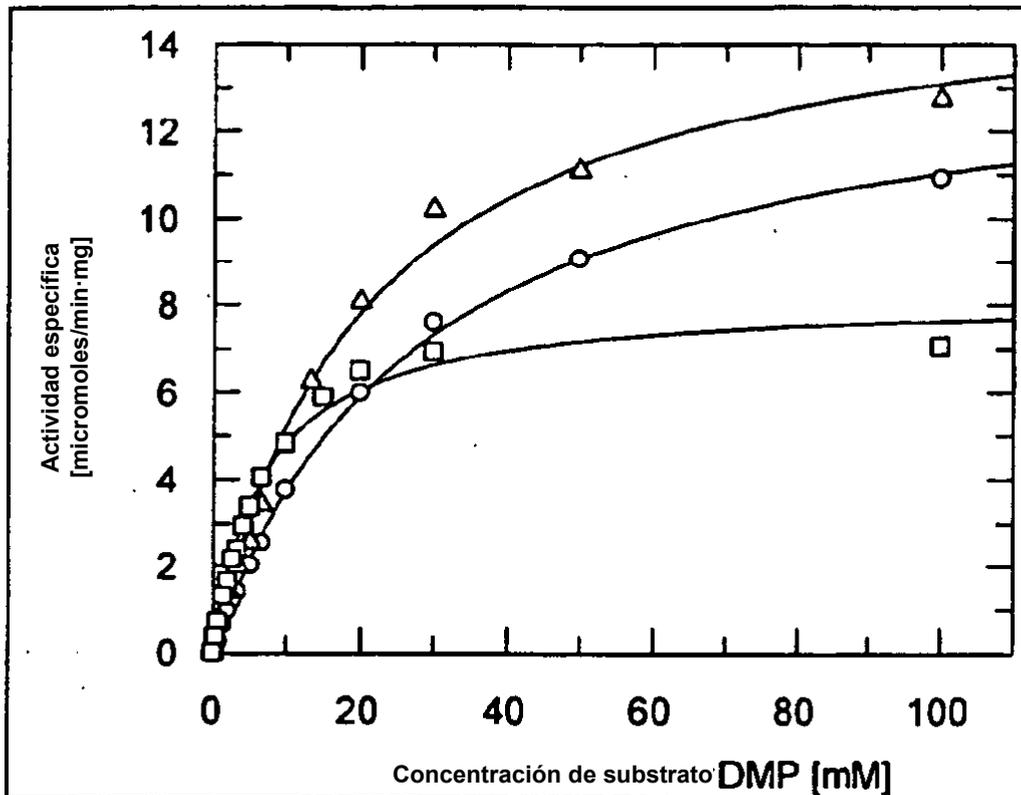


Fig. 6 (b):

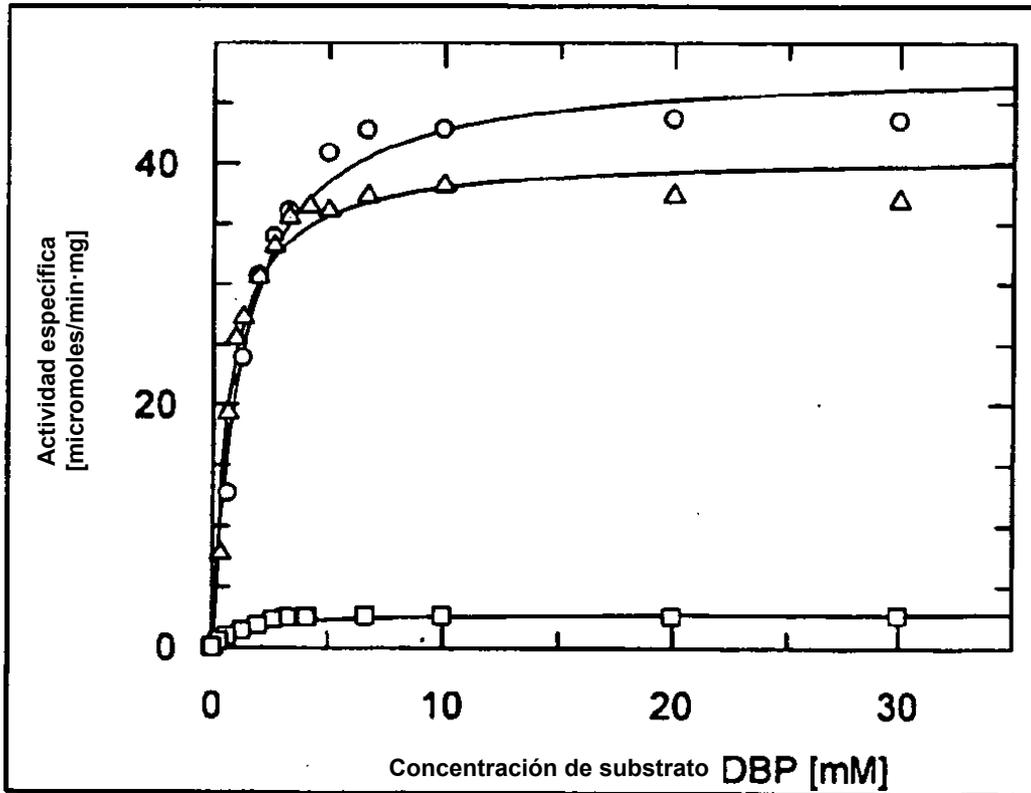


Fig. 6 (c):

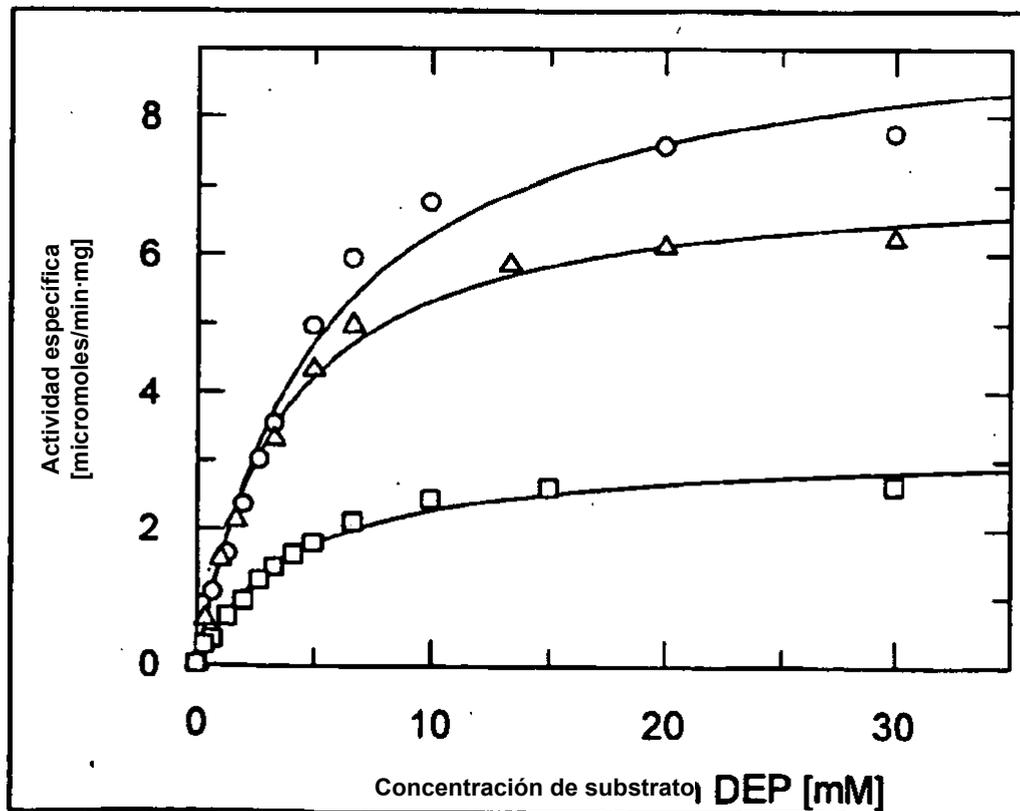


Fig. 7 (a):

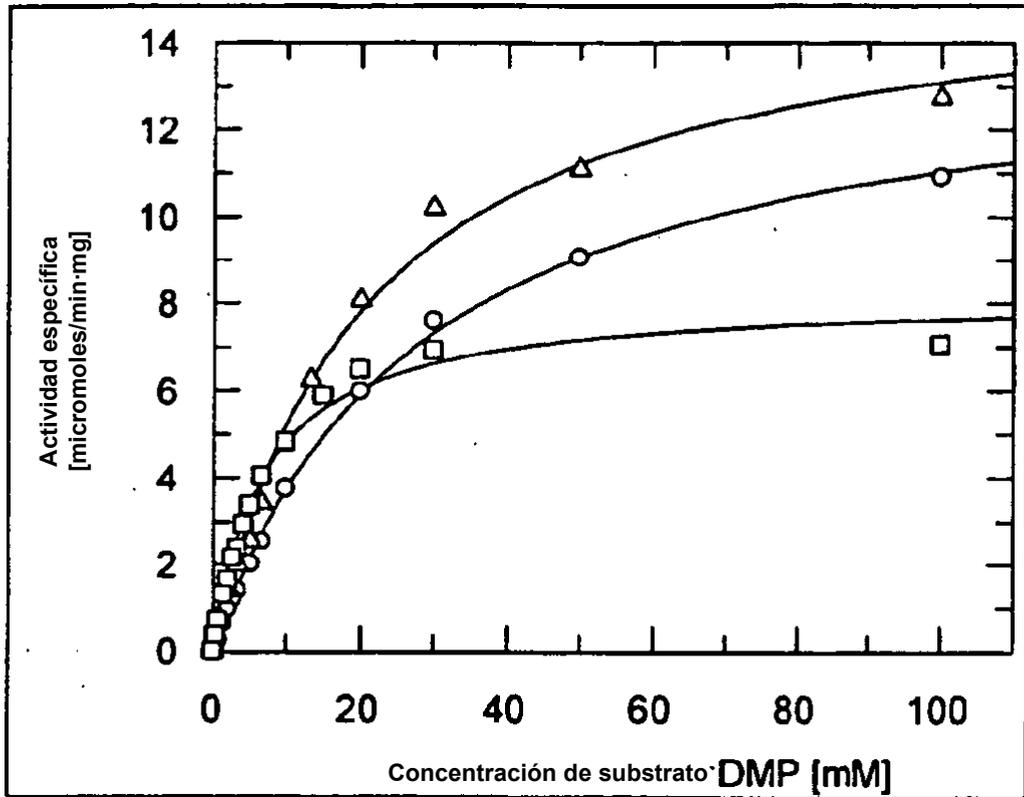


Fig. 7 (b):

