

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 409 890**

51 Int. Cl.:

C12N 15/80 (2006.01)

C07K 14/37 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.04.2010** **E 10717135 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.03.2013** **EP 2424992**

54 Título: **Nueva proteasa fúngica y utilización de la misma**

30 Prioridad:

30.04.2009 FI 20095497

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.06.2013

73 Titular/es:

**AB ENZYMES OY (100.0%)
Tykkimäentie 15
05200 Rajamäki, FI**

72 Inventor/es:

**VALTAKARI, LEENA;
JUNTUNEN, KARI;
MÄKINEN, SUSANNA;
KALLIO, JARNO;
VEHMAANPERÄ, JARI;
OJAPALO, PENTTI y
PALOHEIMO, MARJA**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 409 890 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

Nueva proteasa fúngica y utilización de la misma.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a una enzima serina proteasa fúngica útil en diversas aplicaciones, en particular en detergentes de lavandería y lavavajillas. La invención se refiere a una molécula de ácido nucleico que codifica dicha enzima, a un vector recombinante, a una célula anfitriona para la producción de dicha enzima, a una composición enzimática que comprende dicha enzima, así como a un procedimiento para la preparación de dicha composición. Esta invención se refiere también a diversas utilidades de dicha enzima o a las composiciones que comprenden dicha enzima.

15 **Antecedentes**

Las proteasas microbianas están entre las enzimas hidrolíticas más importantes y encuentran aplicaciones en diversos sectores industriales, tales como detergentes, alimentos, piel, productos farmacéuticos, de diagnóstico, gestión de residuos y la recuperación de la plata. Las proteasas microbianas extracelulares representan una parte importante, más de un tercio de las ventas totales de enzimas industriales en todo el mundo (Cherry y Fidantsef, 2003). Aproximadamente el 90% de las proteasas comerciales son enzimas detergentes (Gupta *et al.*, 2002). La mayoría de las proteasas comerciales, principalmente neutras y alcalinas son producidos por organismos que pertenecen al género *Bacillus*.

Las serina proteasas de la familia subtilisina o subtilisinas producidas por la especie *Bacillus* forman el subgrupo más grande de proteasas industriales. Estas enzimas son comercialmente importantes como componentes degradadores de proteínas o aditivos de detergentes para el lavado. Los preparados comerciales de detergente que se utilizan actualmente comprenden las serina proteasas alcalinas de origen natural provenientes de la especie *Bacillus* o que son preparados de proteasas recombinantes (Maurer, 2004). Las variantes de las enzimas naturales con mejora de la eficiencia catalítica y/o una mayor estabilidad frente a la temperatura, los agentes oxidantes y el cambio de las condiciones de lavado se han desarrollado por mutagenia dirigida y/o al azar. Ejemplos de proteasas comerciales son por ejemplo subtilisina Carlsberg (Alcalase[®], Novozymes, DK), subtilisina 309 (Savinase[®], Novozymes, DK), subtilisina 147 (Esperase[®], Novozymes, DK), Kannase[®] (Novozymes, DK), Purafect[®] (Genencor Inc., USA), Purafect Ox[®], Properase[®] (Genencor Inc., USA) y la BLAP de las series S y X (Henkel, DE).

Se han aislado también varias serina proteasas alcalinas (EC 3.4.21) y los genes que codifican estas enzimas a partir de organismos eucariotas, incluyendo levaduras y hongos filamentosos. La patente US n° 3.652.399 y EP 519229 (Takeda Chemical Industries, Ltd., JP) dan a conocer una proteasa alcalina del género *Fusarium* (estado asexual, teleomorfo) o *Gibberella*, (estado sexual, anamorfo) en particular procedente de *Fusarium* sp. S-19-5 (ATCC 20192, IFO 8884), *F. oxysporum* f. sp. *lini* (IFO 5880) o *G. saubineti* (ATCC 20193, IFO 6608), útil en la formulación de detergentes y otras composiciones limpiadoras. Los documentos WO 88/03946 y WO 89/04361 (Novo Industri A/S, DK) dan a conocer un aditivo de detergente enzimático y una composición detergente que comprende una proteasa y una lipasa, en el que la proteasa fúngica procede de *Fusarium*, específicamente de *F. oxysporum* y *F. solani*. Un aditivo para detergente que comprende la proteasa con especificidad para enlaces peptídicos adyacentes para sólo uno o dos aminoácidos específicos se da a conocer en el documento WO 89/06270. El documento WO 1994025583 (NovoNordisk A/S, DK) da a conocer una enzima proteasa activa tripsinoide procedente de una especie *Fusarium*, en particular una cepa de *F. oxysporum* (DSM 2672), y la secuencia de ADN que codifica la misma. La secuencia de aminoácidos de una nueva proteasa procedente de *Fusarium* sp. BLB (FERM BP-10493) se da a conocer en el documento WO 2006101140 (SODX Co. Ltd, Nakamura). Además, se han descrito proteasas alcalinas procedentes de especies fúngicas tales como *Tritirachium* y *Conidiobolus* (revisado en Anwar y Saleemuddin, 1998).

La utilización de serina proteasas fúngicas en diferentes aplicaciones también se conoce a partir de varias solicitudes de patente. Por ejemplo, una combinación de una celulasa y una proteasa, en particular, una proteasa tripsinoide de *Fusarium* sp. DSM 2672 como aditivo o composición detergente se da a conocer en el documento WO 1992018599 (NovoNordisk A/S). Dichas composiciones detergentes pueden comprender además inhibidores de proteasa reversibles para la estabilización de la(s) enzima(s) como se da a conocer en el documento WO 1992003529 y WO 1992005239 (Novo Nordisk A/S). El procedimiento para la eliminación o blanqueamiento de la suciedad o manchas de tejidos celulósicos con un híbrido enzimático que comprende una secuencia de aminoácidos catalíticamente activa, dicha proteasa unida a una secuencia de aminoácidos que comprende un dominio de unión a celulosa se da a conocer en el documento WO 1997028243 (Novo Nordisk A/S). El documento WO 1997002753 (Novo Nordisk A/S) da a conocer un procedimiento para la limpieza delicada de equipos de proceso sucios utilizando una lipasa y una proteasa que es preferentemente una serina proteasa que puede obtenerse a partir de *Fusarium*. La utilización de *F. equiseti* y otros hongos en la reducción de la materia orgánica en las aguas residuales se da a conocer en la solicitud de patente EP 1464626 (Biovitis SA, FR).

Los retos socioeconómicos y las regulaciones gubernamentales han obligado a la industria de detergentes a tomar

en consideración muchos aspectos ambientales, incluyendo no sólo la utilización de productos químicos más tolerantes que pueden utilizarse en cantidades menores y por lo tanto dejan menos rastros de residuos ambientales, sino también la necesidad de ahorro de energía. Las enzimas detergentes, en particular las proteasas, son ingredientes importantes en composiciones detergentes. La necesidad de ahorrar energía por disminución de las temperaturas de lavado y el mayor uso de fibras sintéticas que no pueden tolerar altas temperaturas y el estilo de vida actual han cambiado los hábitos de los clientes hacia las bajas temperaturas de lavado y ha creado una demanda de nuevas enzimas, que son eficaces a bajas temperaturas.

A pesar del hecho de que se han publicado numerosas publicaciones de patente, revistas y artículos, en los que las serina proteasas de varios microorganismos, por ejemplo, se describen las proteasas alcalinas a baja temperatura de actinomicetos (*Nocardopsis dassonvillei*) y microorganismos fúngicos (*Paecilomyces marquandii*), por ejemplo, en los documentos EP 0 290 567 y EP 0 290 569 (Novo Nordisk A/S, DK), existe todavía una gran necesidad de serina proteasas alternativas, que son adecuadas y eficaces en la modificación, degradación y eliminación de materiales proteicos particularmente en intervalos de temperaturas bajas o moderadas y que son estables en presencia de detergentes con propiedades muy variables.

La industria de detergentes está haciendo grandes avances en la adaptación de sus nuevos productos a las costumbres y necesidades de los clientes, a las propiedades de nuevos productos textiles y nuevas lavadoras. Es evidente que el desarrollo de nuevos detergentes, particularmente composiciones para lavandería y lavavajillas, tienen que satisfacerse una amplia gama de diferentes demandas y que cambian rápidamente. Para el cumplimiento de todas las diferentes demandas de la industria de detergentes y de las normas gubernamentales, los nuevos ingredientes de la serina proteasa para composiciones detergentes no sólo deben ser capaces de cumplir con sus tareas en amplios intervalos de pH y temperatura y mantenerse estables en variedad de condiciones, incluyendo intervenciones mecánicas y químicas en combinación con una variedad de diferentes detergentes, también es deseable que la serina proteasa pueda producirse en grandes cantidades, que pueda procesarse de forma rentable corriente abajo, por la fácil separación del caldo de fermentación y los micelios.

Sumario de la invención

El objetivo de la presente invención es proporcionar una serina proteasa de origen fúngico que presenta amplia especificidad de sustrato, es activa en amplios intervalos de pH y tiene una amplia temperatura óptima, es decir, funciona tanto a temperaturas bajas como moderadas. Las serina proteasas para detergentes de lavandería y lavavajillas tienen que ser estables también en presencia de detergentes o ser compatibles con detergentes. En particular, el objetivo de la invención es proporcionar una serina proteasa, que es capaz de eliminar material proteico, incluyendo manchas en la colada y la vajilla, a temperaturas más bajas que los actuales preparados enzimáticos comerciales, con el consiguiente ahorro de energía. La serina proteasa fúngica puede producirse en anfitriones fúngicos de alto rendimiento de hongos y su tratamiento corriente abajo, por ejemplo, la separación del caldo de fermentación y micelios es fácil de realizar.

La presente invención se refiere a una enzima serina proteasa fúngica, que tiene actividad de serina proteasa y comprende una secuencia de aminoácidos de la enzima Fe_RF6318 madura tal como se define en la SEC. ID. nº:15 o una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 86% de identidad con la secuencia de aminoácidos de la enzima Fe_RF6318 madura definida en la SEC. ID. nº:15.

La enzima de la invención puede obtenerse a partir de *Fusarium equiseti*, más preferentemente de la cepa depositada CBS 119568.

La enzima tiene una masa molecular entre 25 y 35 kDa. La enzima tiene una temperatura óptima en el intervalo de 30°C a 70°C a pH 9. Dicha enzima tiene un pH óptimo en el intervalo de pH de por lo menos pH 6 a pH 11 a 50°C. La temperatura y pH óptimos se determinaron utilizando un tiempo de reacción 15 min y caseína como sustrato. La serina proteasa de la invención es capaz de degradar o eliminar manchas proteínicas en presencia de detergente entre 10°C y 60°C.

La enzima serina proteasa fúngica de la invención es codificada por una secuencia polinucleotídica aislada, que se hibrida en condiciones severas con una secuencia polinucleotídica incluida en el plásmido pALK2521 que comprende la secuencia nucleotídica SEC. ID. nº:9 depositada en *E. coli* RF7664 con el número de registro DSM 22171.

Dicha enzima es codificada por una secuencia polinucleotídica aislada, que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos del polipéptido de la enzima Fe_RF6318 madura tal como se define en la SEC. ID. nº:15 o una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 86% de identidad con la secuencia de aminoácidos de la Fe_RF6318 madura definida en la SEC. ID. nº:15. Preferentemente, dicha enzima es codificada por una molécula de ácido nucleico aislada que comprende la secuencia nucleotídica SEC. ID. nº:14.

La enzima serina proteasa fúngica completa de la invención es codificada por la secuencia polinucleotídica incluida en pALK2529 depositado en *Escherichia coli* RF7800 con el número de registro DSM 22172.

La enzima serina proteasa fúngica se produce a partir de un vector de expresión recombinante que comprende la molécula de ácido nucleico que codifica una serina proteasa fúngica de la invención operativamente unida a secuencias reguladoras capaces de dirigir la expresión del gen que codifica la serina proteasa en un anfitrión adecuado. Los anfitriones adecuados incluyen anfitriones heterólogos, preferentemente anfitriones microbianos del género *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Humicola*, *Chrysosporium*, *Neurospora*, *Rhizopus*, *Penicillium* y *Mortierella*.

Preferentemente, dicha enzima se produce en *Trichoderma* o *Aspergillus*, aún más preferentemente en *T. reesei*.

La presente invención se refiere también a una molécula de ácido nucleico aislada que codifica una enzima serina proteasa fúngica seleccionada de entre el grupo que consiste en:

- (a) una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad de serina proteasa y que comprende la secuencia de aminoácidos representada en la SEC. ID. n°:15;
- (b) una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad de serina proteasa y por lo menos 86% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. n°:15;
- (c) una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de codificación de la secuencia nucleotídica representada en la SEC. ID. n°:10;
- (d) una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de codificación de la secuencia polinucleotídica contenida en DSM 22171 o DSM 22172;
- (e) una molécula de ácido nucleico cuya secuencia de codificación difiere de la secuencia de codificación de una molécula de ácido nucleico de una cualquiera de (c) a (d) debido a la degeneración del código genético; y
- (f) una molécula de ácido nucleico que se hibrida en condiciones severas con una molécula de ácido nucleico contenida en DSM 22171, y que codifica un polipéptido que tiene actividad de serina proteasa y una secuencia de aminoácidos que presenta por lo menos 86% de identidad con la secuencia de aminoácidos representada en la SEC. ID. n°:15.

La invención se refiere además a un vector de expresión recombinante que comprende la secuencia nucleotídica de la invención operativamente unida a secuencias reguladoras capaces de dirigir la expresión de dicho gen que codifica la serina proteasa en un anfitrión adecuado. Los anfitriones adecuados incluyen anfitriones heterólogos, anfitriones microbianos preferentemente del género *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Humicola*, *Chrysosporium*, *Neurospora*, *Rhizopus*, *Penicillium* y *Mortierella*. Preferentemente, dicha enzima se produce en *Trichoderma* o *Aspergillus*, aún más preferentemente en *T. reesei*.

La invención se refiere también a una célula anfitriona que comprende el vector de expresión recombinante como el descrito anteriormente. Preferentemente, la célula anfitriona es un anfitrión microbiano, tal como un hongo filamentoso. Los anfitriones preferidos son de un género *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Humicola*, *Chrysosporium*, *Neurospora*, *Rhizopus*, *Penicillium* y *Mortierella*. Más preferentemente, el anfitrión es *Trichoderma* o *Aspergillus*, más preferentemente un hongo filamentoso *T. reesei*.

La presente invención se refiere a un procedimiento de producción de un polipéptido que tiene actividad de serina proteasa, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de cultivo de la célula anfitriona de la invención y de recuperación del polipéptido. También dentro de la invención está un polipéptido que tiene actividad de serina proteasa codificado por la secuencia de ácido nucleico de la invención y que puede obtenerse por el procedimiento descrito anteriormente.

La invención se refiere a un procedimiento para la obtención de un preparado enzimático que comprende las etapas de cultivo de una célula anfitriona de la invención y, o bien la recuperación del polipéptido a partir de las células o la separación de las células del medio de cultivo y obtención del sobrenadante. Dentro de la invención existe también un preparado enzimático que puede obtenerse por el procedimiento descrito anteriormente.

La invención se refiere a un preparado enzimático, que comprende la enzima serina proteasa de la invención.

El preparado enzimático de la invención puede comprender, además, otras enzimas seleccionadas del grupo de proteasa, amilasa, celulasa, lipasa, xilanasa, mananasa, cutinasa, pectinasa u oxidasa con o sin un mediador, así como aditivos adecuados seleccionados del grupo de los estabilizadores, tampones, tensioactivos, agentes blanqueadores, mediadores, agentes anticorrosivos, constructores, agentes contra la reprecipitación, abrillantadores ópticos, colorantes, pigmentos, productos cáusticos, abrasivos y conservantes, etc.

El medio de cultivo gastado del anfitrión de producción puede utilizarse como tal, o las células anfitrionas pueden

eliminarse, y/o pueden concentrarse, filtrarse o fraccionarse. También pueden secarse. El preparado enzimático de la invención puede estar en la forma líquido, polvo o granulado.

También está comprendida dentro de la invención la utilización de la enzima serina proteasa o el preparado enzimático de la invención para detergentes, para el tratamiento de fibras, para el tratamiento de lana, para el tratamiento del cabello, para el tratamiento del cuero, para el tratamiento de alimentos o piensos o para algunas aplicaciones que implican modificación, degradación o eliminación de material proteico. En particular, la enzima o el preparado enzimático es útil como aditivo detergente en detergentes líquidos y detergentes en polvo.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 presenta la secuencia nucleotídica del gen *Fe prtS8A* de *Fusarium equiseti* RF6318 y la secuencia de aminoácidos deducida. El supuesto péptido señal, analizado por el programa SignalP V3.0 está en letras minúsculas y subrayado. La secuencia pro y los aminoácidos deducidos de la secuencia pro están en letras minúsculas. Las secuencias nucleotídicas y peptídicas maduras están en mayúsculas (secuencia del terminal N determinada a partir de la proteína natural Fe_RF6318 purificada). La posición de la supuesta secuencia de intrón es en minúsculas, cursiva y marcada por una línea de puntos bajo la secuencia nucleotídica. El codón de terminación se muestra con un asterisco bajo la secuencia. Las secuencia en el terminal N y las secuencias peptídicas obtenidas a partir de la proteína natural Fe_RF6318 se destacan en fondo gris.

La figura 1A presenta la secuencia nucleotídica del gen *Fe prt8A* desde el codón de iniciación ATG hasta el codón CCT (nucleótidos 898 a 900), la región de la secuencia que codifica la secuencia de aminoácidos desde Met 1 a Val278 de la proteína Fe_RF6318.

La figura 1B presenta la secuencia nucleotídica del gen *Fe prt8A* desde el codón CTC (nucleótidos 901 a 903) hasta el codón de terminación TAA, la región de la secuencia que codifica la secuencia de aminoácidos desde Leu279 hasta Ala412 de la proteína Fe_RF6318.

La figura 2 presenta esquemáticamente la casete utilizada para expresar el gen *Fe prtS8A* en *Trichoderma reesei*.

La figura 3 presenta la proteína Fe_RF6318 parcialmente purificada recombinante analizada en gel de SDS-PAGE al 12%. Banda 1. Muestra de la Fe_RF6318 parcialmente purificada, Lane 2. Marcador MW (Bench Mark Global Protein, Invitrogen).

La figura 4A describe el perfil de temperatura de la proteína Fe_RF6318 recombinante ensayada a pH 9 utilizando 15 min. de tiempo de reacción y caseína como sustrato. Los puntos de datos son promedios de tres mediciones independientes.

La figura 4B describe el efecto del pH sobre la actividad de la proteína Fe_RF6318 recombinante. El tampón utilizado fue tampón Britton-Robinson 40 mM, la caseína se utilizó como sustrato, el tiempo de reacción fue de 15 min y la temperatura de reacción fue de 50°C. Los puntos de datos son promedios de tres mediciones independientes.

La figura 5 describe la eficacia de la proteína Fe_RF6318 recombinante con manchas de sangre/leche/tinta (Art. 116, EMPA) a 30°C, pH 9, 60 min. Se utilizaron para comparación los preparados comerciales Savinase Ultra[®] 16L (Novozymes A/S, DK) y Purafect[®] 4000L (Genencor Inc., USA). ΔL^* (delta L*) = valor L* de luminosidad del tejido tratado con enzima - valor L* de luminosidad del tejido tratado solo con tampón (blanco enzimático).

La figura 6 describe la eficacia de la proteína Fe_RF6318 recombinante con manchas de sangre/leche/tinta (Art. 116, EMPA) a 50°C, pH 9, 60 min. Se utilizaron para comparación los preparados comerciales Savinase[®] Ultra 16L y Purafect[®] 4000L. ΔL^* (delta L*) = valor L* de luminosidad del tejido tratado con enzima - valor L* de luminosidad del tejido tratado solo con tampón (blanco enzimático).

La figura 7A describe la eficacia de la proteína Fe_RF6318 recombinante con manchas de sangre/leche/tinta (Art. 117, EMPA) a 40°C, aproximadamente a pH 10, 60 min en presencia de detergente en polvo (Art. 601, EMPA). Se utilizó preparado comercial Purafect[®] 4000L para comparación. ΔL^* (delta L*) = valor L* de luminosidad del tejido tratado con enzima - valor L* de luminosidad del tejido tratado solo con tampón (blanco enzimático).

La figura 7B describe la eficacia de la proteína Fe_RF6318 recombinante con manchas de sangre/leche/tinta (Art. 117, EMPA) a 40°C, aproximadamente a pH 10, 60 minutos en presencia de detergente en polvo y agentes de blanqueo (Art. 604 y 606, EMPA). Se utilizó preparado comercial Purafect[®] 4000L para comparación. ΔL^* (delta L*) = valor L* de luminosidad del tejido tratado con enzima - valor L* de luminosidad del tejido tratado solo con tampón (blanco enzimático).

La figura 8A describe la eficacia de la proteína Fe_RF6318 recombinante con manchas de sangre/leche/tinta (Art. 117, EMPA) a 50°C, aproximadamente a pH 10, 60 minutos en presencia de detergente en polvo (Art. 601, EMPA).

Se utilizó preparado comercial Purafect® 4000L para comparación. ΔL^* (delta L^*) = valor L^* de luminosidad del tejido tratado con enzima - valor L^* de luminosidad del tejido tratado solo con tampón (blanco enzimático).

La figura 8B describe la eficacia de la proteína Fe_RF6318 recombinante con manchas de sangre/leche/tinta (Art 117, EMPA) a 50°C, aproximadamente a pH 10, 60 minutos en presencia de detergente en polvo y agentes de blanqueo (Art. 604 y 606, EMPA). Se utilizó preparado comercial Purafect® 4000L para comparación. ΔL^* (delta L^*) = valor L^* de luminosidad del tejido tratado con enzima - valor L^* de luminosidad del tejido tratado solo con tampón (blanco enzimático).

La figura 9 presenta la eficacia de la proteína Fe_RF6318 recombinante con manchas de sangre/leche/tinta (Art. 117, EMPA) y detergente líquido Ariel Sensitive a 40°C, aproximadamente a pH 7,9, 60 min. Se utilizaron para comparación los preparados comerciales Savinase® Ultra 16L y Purafect® 4000L. En el eje x se muestra la dosis de enzima (unidades de actividad/ml), en el eje y ΔL^* (delta L^*) = valor L^* de luminosidad del tejido tratado con enzima - valor L^* de luminosidad del tejido tratado solo con tampón (blanco enzimático).

La figura 10 presenta la eficacia de la proteína Fe_RF6318 recombinante con manchas de sangre/leche/tinta (Art 117, EMPA) con diferentes concentraciones de detergente líquido principal para tejidos de colores a 30°C. Se utilizaron para comparación los preparados comerciales Purafect® 4000L y Savinase® Ultra 16L. ΔL^* (delta L^*) = valor L^* de luminosidad del tejido tratado con enzima - valor L^* de luminosidad del tejido tratado solo con tampón (blanco enzimático).

La figura 10A presenta la eficacia con la concentración de detergente de 5 g/l y pH 7,5.

La figura 10B presenta la eficacia con la concentración de detergente de 5 g/l (dosis de enzima calculada como proteína).

La figura 10C presenta la eficacia con la concentración de detergente de 3,3 g/l y pH 7,4.

La figura 10D presenta la eficacia con la concentración de detergente de 1 g/l y pH 7,3.

La figura 11 presenta la eficacia de la proteína Fe_RF6318 recombinante con manchas de sangre/leche/tinta (Art 117, EMPA) con diferentes concentraciones de Ariel Sensitive (sin enzimas) en los tejidos a 30°C. Se utilizaron para comparación los preparados comerciales Purafect® 4000L y Savinase® Ultra 16L. ΔL^* (delta L^*) = valor L^* de luminosidad del tejido tratado con enzima - valor L^* de luminosidad del tejido tratado solo con tampón (blanco enzimático).

La figura 11A presenta la eficacia con la concentración de detergente de 5 g/l y pH 8.

La figura 11B presenta la eficacia con la concentración de detergente de 5 g/l (dosis de enzima calculada como proteína).

La figura 11C presenta la eficacia con la concentración de detergente de 3,3 g/l y pH 7,9

La figura 11D presenta la eficacia con la concentración de detergente de 1 g/l y pH 7,6.

La figura 12 presenta la eficacia de la proteína Fe_RF6318 recombinante en diferentes manchas en las pruebas en Launder Ometer con detergente líquido Ariel Sensitive (sin enzimas) a 30°C. Se utilizó para comparación preparado comercial Savinase 16L Ultra. ΔL^* (delta L^*) = valor L^* de luminosidad del tejido tratado con enzima - valor L^* de luminosidad del tejido tratado solo con tampón (blanco enzimático).

La figura 12A presenta la eficacia en PE-algodón con manchas de sangre/leche/tinta (Art. 117, EMPA).

La figura 12B presenta la eficacia en algodón con manchas de sangre/leche/tinta (Art. 116, EMPA)

La figura 12C presenta la eficacia en manchas de hierba (Art. 164, EMPA).

La figura 13 presenta la eficacia de la proteína Fe_RF6318 recombinante en diferentes manchas en las pruebas Launder Ometer con detergente líquido principal para tejidos de color a 30°C. Se utilizaron para comparación los preparados comerciales Savinase® Ultra 16L y Purafect® 4000 L. ΔL^* (delta L^*) = valor L^* de luminosidad del tejido tratado con enzima - valor L^* de luminosidad del tejido tratado solo con tampón (blanco enzimático).

La figura 13A presenta la eficacia en PE-algodón con manchas de sangre/leche/tinta (Art. 117, EMPA).

La figura 13, presenta la eficacia en algodón con manchas de sangre/leche/tinta (Art. 116, EMPA).

La figura 13C presenta la eficacia en manchas de hierba (Art. 164, EMPA).

La figura 13D presenta la eficacia en manchas de cacao (Art. 112, EMPA).

La figura 14 describe la eficiencia de eliminación de todas las manchas (delta% SR) del preparado enzimático Fe_RF6318 en ocho manchas diferentes sensibles a proteasas (Tabla 5) en pruebas de lavado a gran escala. Se utilizaron para comparación los preparados comerciales Savinase® Ultra 16L y Purafect® 4000L.

La figura 14A describe la eficiencia de la eliminación de todas las manchas cuando los preparados de proteasa se administraban dosis en función de la actividad.

La figura 14B describe la eficiencia total de la eliminación de todas las manchas cuando los preparados de proteasa se administraban dosis en función de la cantidad de proteína.

La figura 15 describe el efecto de eliminación de manchas con detergente líquido principal para tejidos de color en la prueba a gran escala a 30 °C.

La figura 15A describe la eliminación de manchas de sangre/leche/tinta en algodón (C-05-014/CFT).

La figura 15B describe la eliminación de manchas de sangre/leche/tinta en PE-Cotton (C-05-014/CFT).

La figura 15C describe la eliminación de manchas de chocolate con leche/pigmento en algodón (C-03-030/CFT).

La figura 15D describe la eliminación de manchas de aceite de cacahuete/leche en algodón (C-05-014/CFT).

La figura 15E describe la eliminación de manchas de yema de huevo/pigmento en algodón (CS-38-010/CFT).

La figura 16 describe la eficacia de la proteína Fe_RF6318 recombinante con manchas de sangre/leche/tinta (Art 117, EMPA) a temperaturas de 10 °C a 60 °C, pH 9, 60 min. Se utilizaron para comparación los preparados comerciales Savinase® Ultra 16L (Novozymes A/S, DK), Purafect® 4000L (Genencor Inc., USA) y Properase® 4000E (Genencor Inc., USA). ΔL^* (delta L*) = valor L* de luminosidad del tejido tratado con enzima - valor L* de luminosidad del tejido tratado solo con tampón (blanco enzimático).

La figura 16A presenta la eficacia de la proteína Fe_RF6318 recombinante y preparados comerciales de proteasas a 10 °C.

La figura 16B presenta la eficacia de la proteína Fe_RF6318 recombinante y preparados comerciales de proteasas a 20 °C.

La figura 16C presenta la eficacia de la proteína Fe_RF6318 recombinante y preparados comerciales de proteasas a 30 °C.

La figura 16D presenta la eficacia de la proteína Fe_RF6318 recombinante y preparados comerciales de proteasas a 40 °C.

La figura 16E presenta la eficacia de la proteína Fe_RF6318 recombinante y preparados comerciales de proteasas a 50 °C.

La figura 16F presenta la eficacia de la proteína Fe_RF6318 recombinante y preparados comerciales de proteasas a 60 °C.

La figura 17 presenta la eficacia de la proteína Fe_RF6318 recombinante con manchas de sangre/leche/tinta (Art 117, EMPA) y la concentración de base líquida de 3,3 g/l a 10 °C y 20 °C. Se utilizaron para la comparación los preparados comerciales Savinase® Ultra 16L, Purafect® 4000L y Properase® 4000 E. ΔL^* (delta L*) = valor L* de luminosidad del tejido tratado con enzima - valor L* de luminosidad del tejido tratado solo con tampón (blanco enzimático).

La figura 17A presenta la eficacia a 10 °C.

La figura 17B presenta la eficacia a 20 °C.

LISTADO DE SECUENCIAS

SEC. ID. nº:1 Secuencia de un péptido aminoterminal nº 3792 de la proteasa RF6318 de *Fusarium equiseti*.

SEC. ID. nº:2 Secuencia de un péptido triptico 1246.673 de la proteasa RF6318 de *Fusarium equiseti*.

SEC. ID. nº:3 Secuencia de un péptido tríptico 3341.633 de la proteasa RF6318 de *Fusarium equiseti*.

SEC. ID. nº:4 Secuencia de un péptido tríptico 1503.799 de la proteasa RF6318 de *Fusarium equiseti*.

5 SEC. ID. nº:5 Secuencia del cebador oligonucleotídico PRO87 procedente de la SEC. ID. nº:1 del péptido aminoterminal.

SEC. ID. nº:6 Secuencia del cebador oligonucleotídico PRO88 procedente de la SEC. ID. nº:1 del péptido aminoterminal.

10 SEC. ID. nº:7 Secuencia del cebador oligonucleotídico PRO89 procedente de la SEC. ID. nº:4 peptídica.

SEC. ID. nº:8 Secuencia del cebador oligonucleotídico PRO90 procedente de la SEC. ID. nº:4 peptídica.

15 SEC. ID. nº:9 Secuencia del fragmento de RCP obtenida utilizando los cebadores PRO88 (SEC. ID. nº:6) y PRO89 (SEC. ID. nº:7) y ADN genómico de RF6318 de *Fusarium equiseti* como plantilla.

SEC. ID. nº:10 Secuencia nucleotídica del gen (*Fe prtS8A*) de la proteasa RF6318 completa de *Fusarium equiseti*.

20 SEC. ID. nº:11 Secuencia de aminoácidos deducida de la proteasa RF6318 completa de *Fusarium equiseti* (Fe_RF6318) incluyendo los aminoácidos desde Met1 hasta Ala412.

SEC. ID. nº:12 Secuencia nucleotídica que codifica la secuencia de aminoácidos de la forma de proenzima de la proteasa RF6318 de *Fusarium equiseti*.

25 SEC. ID. nº:13 Secuencia de amino ácidos de la forma proenzimática de proteasa RF6318 de *Fusarium equiseti* que incluye los aminoácidos Ala21 a Ala 412 de la proteasa completa.

30 SEC. ID. nº:14 Secuencia nucleotídica que codifica la secuencia de aminoácidos de la forma madura de la proteasa RF6318 de *Fusarium equiseti*.

SEC. ID. nº:15 Secuencia de aminoácidos de la forma madura de la proteasa RF6318 de *Fusarium equiseti* que incluye los aminoácidos Ala124 a Ala412 de la enzima completa.

35 Depósitos

RF6318 de *Fusarium equiseti* se depositó en la Centraalbureau Voor Schimmelcultures und Uppsalalaan 8, 3508 AD, Utrecht, Holanda el 7 de abril 2006 y se asignó el número de registro CBS 119.568.

40 La cepa RF7664 de *E. coli* que incluye el plásmido pALK2521 se depositó en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Inhoffenstrasse 7 b, D-38124 Braunschweig, Alemania el 14 de enero de 2009 y se le asignó el número de registro DSM 22171.

45 La cepa RF7800 de *E. coli* que incluye el plásmido pALK2529 se depositó en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Inhoffenstrasse 7 b, D-38124 Braunschweig, Alemania el 14 de enero de 2009 y se le asignó el número de registro DSM 22172.

Descripción detallada

50 La presente invención proporciona una serina proteasa de origen fúngico, que presenta amplia especificidad de sustrato, es estable a grandes intervalos de pH y tiene una amplia temperatura óptima, es decir, un buen comportamiento tanto a temperaturas bajas como moderadas. La enzima es ideal para aplicaciones en detergentes, resistir a los agentes oxidantes y quelantes y ser eficaz a bajas concentraciones de enzimas en soluciones detergentes. En particular, la serina proteasa es activa a temperaturas tan bajas como 10 °C, siendo el intervalo preferido de 10 °C a 60 °C. Por lo tanto, la presente invención proporciona una serina proteasa alternativa para su utilización en detergentes y otras aplicaciones. La serina proteasa fúngica puede producirse en anfitriones fúngicos de alto rendimiento y su tratamiento corriente abajo, por ejemplo, la separación de caldo de fermentación y los micelios es fácil de realizar.

60 Por "serina proteasa" o "serina endopeptidasa" o "serina endoproteinasa" está en relación con esta invención se entiende una enzima clasificada como EC 3.4.21 por la Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular. Las serina proteasas se encuentran tanto en organismos unicelulares como complejos. Basándose en sus similitudes estructurales, las serina proteasas se han agrupado en por lo menos seis clanes (SA, SB, SC, SE, SF y SG; S indica serina proteasa), que se han subagrupado además en familias con secuencias de aminoácidos similares y tres estructuras tridimensionales (véase, por ejemplo, la página principal de la serina proteasa en <http://www.biochem.wustl.edu/~protease/>, del Department of Biochemistry and Molecular Biophysics de

la University of Medicine Washington, St. Louis, Missouri, USA). Estas enzimas que hidrolizan o degradan proteínas se caracterizan por la presencia de un grupo nucleófilo serina en su sitio activo, y las proteasas del clan SA y del clan SB se distinguen también por tener restos esenciales de aspartato y de histidina, que junto con la serina, forman un trío catalítico.

Los clanes principales incluyen el "quimotripsinoide", que incluye la quimotripsina, tripsina y elastasa (clan SA) y serina proteasas "subtilisinoides" (clan SB). Las enzimas se dirigen a diferentes regiones de la cadena polipeptídica, en base a las cadenas laterales de los restos de aminoácidos que rodean el sitio de escisión. La serina proteasa de la presente invención pertenece al clan SB.

Las "serina proteasas subtilisinoides" caracterizadas o "subtilasas" son generalmente de origen bacteriano. Esta clase de proteasas, representada por varios *Bacillus*, como *B. amyloliquifaciens*, *B. licheniformis* y *B. subtilis* (Rao *et al.*, 1998), es específica para restos aromáticos o hidrófobos, tales como tirosina, fenilalanina y leucina.

Por el término "actividad de la serina proteasa" tal como se utiliza en la invención se entiende la actividad hidrolítica sobre sustratos que contienen proteínas, por ejemplo, caseína, hemoglobina, queratina y BSA. Los métodos para analizar la actividad proteolítica son bien conocidos en la bibliografía y se citan por ejemplo, en Gupta *et al.* (2002).

Las proteasas se pueden clasificar utilizando inhibidores específicos de grupo. El grupo diverso de "inhibidores de serina proteasa", incluye inhibidores químicos sintéticos e inhibidores proteicos naturales. Un grupo de los inhibidores naturales son las serpinas (abreviado a partir de inhibidores de serina proteasa), tales como la antitrombina y alfa 1-antitripsina. Los inhibidores sintéticos artificiales incluyen 3,4-dicloroisocumarina (3,4-DCI), fluorofosfato de diisopropilo (DFP), fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) y tosil-L-lisina clorometilcetona (TLCK). Algunas de las serina proteasas son inhibidas por reactivos tiol tales como p-cloromercuribenzoato (PCMB) debido a la presencia de un resto de cisteína cerca del sitio activo. Por lo tanto, la actividad de la serina proteasa se puede determinar en un ensayo basado en la escisión de un sustrato específico o en un ensayo que utiliza cualquier sustrato que contiene proteínas con o sin un inhibidor específico de las serina proteasas en condiciones adecuadas.

Las serina-proteasas son generalmente activas a pH neutro o alcalino, con un óptimo entre pH 7 y 11, y tienen una amplia especificidad de sustrato. Las "serina proteasas alcalinas" significa las enzimas que son activas y estables a pH 9 a pH 11 o incluso a un pH de 10 a 12,5 (Shimogaki *et al.*, 1991) y tienen punto isoeléctrico de aproximadamente pH 9. Aquellos representan el mayor subgrupo de serina proteasas comerciales. Las masas moleculares de las serina proteasas alcalinas oscilan entre 15 y 35 kDa. La temperatura óptima de las serina proteasas naturales son de aproximadamente 60°C. (Rao *et al.*, 1998).

Las cepas de microorganismos capaces de producir actividad de la proteasa pueden cribarse y puede determinarse la actividad en diferentes sustratos. Las cepas seleccionadas pueden ser cultivadas en un medio adecuado. Una vez que se ha producido una cantidad suficiente de una serina proteasa interesante, la enzima puede aislarse o purificarse y sus propiedades se pueden caracterizar más a fondo. Alternativamente, los genes que codifican serina proteasas en diversos organismos pueden aislarse y la secuencia de aminoácidos codificada por los genes puede compararse con las secuencias de aminoácidos de la serina proteasa aislada y caracterizada en los ejemplos de la presente memoria.

Las enzimas proteasas producidas, particularmente las serina proteasas se pueden purificar utilizando métodos convencionales de química enzimática, tales como la preparación salina, ultrafiltración, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, filtración en gel y cromatografía de interacción hidrófoba. La purificación puede seguirse por determinación de proteínas, ensayos de actividad enzimática y por electroforesis en gel de poliacrilamida SDS. Pueden determinarse la actividad enzimática y la estabilidad de la enzima purificada a varias temperaturas y valores de pH, así como la masa molecular y el punto isoeléctrico.

En el ejemplo 1b se ha demostrado la purificación de una serina proteasa preferida de la presente invención. Se aplicó el sobrenadante de cultivo filtrado a una columna Q Sepharose FF. La fracción de flujo a través se aplicó a la columna de fenil Sepharose HP y las proteínas se eluyeron con un gradiente salino lineal decreciente. Las fracciones que presentan actividad de la proteasa se reunieron, se concentraron y se aplicaron a una columna Superdex 75 10/300 GL. La purificación fue seguida por ensayos de actividad en caseína marcada con resorufina como se describe en el ejemplo 1b. Naturalmente, es posible separar la enzima de la presente invención mediante la utilización de otros métodos de purificación conocidos en lugar, o además de los métodos descritos en la presente memoria. La serina proteasa recombinante se purificó como se describe en el ejemplo 5 y se utilizó para la caracterización de perfiles de pH y temperatura.

La masa molecular de la serina proteasa purificada puede determinarse por espectrometría de masas o en SDS-PAGE según Laemmli (1970). La masa molecular también se puede predecir a partir de la secuencia de aminoácidos de la enzima. La serina proteasa madura o la enzima serina proteasa madura normalmente tiene una masa molecular entre 20 a 35 kDa, normalmente alrededor de 25 a 30 kDa (Rao *et al.*, 1998).

Las serina proteasas se sintetizan como "precursores cimogénicos" inactivos o "cimógenos" en forma de una

preproenzima, que se activan por la eliminación de la secuencia señal (péptido o prepéptido señal de secreción) y la prosequencia (propéptido) para producir una forma madura activa de la enzima (Chen e Inouye, 2008). Este proceso de activación implica la acción de las proteasas y puede ser producido por el tratamiento autodigestivo o autocatalítico de la serina proteasa. La prosequencia puede escindirse, por ejemplo, durante las fases tras la traducción de la producción o en el medio de cultivo gastado o durante el almacenamiento del medio de cultivo o del preparado enzimático. La activación de la proenzima se puede conseguir también añadiendo una enzima proteolítica capaz de convertir la proenzima inactiva en la enzima madura activa en el medio de cultivo en el que se cultiva el organismo anfitrión se cultiva o añadiendo la enzima proteolítica al sobrenadante del cultivo después del proceso de cultivo. El acortamiento de la enzima también se puede conseguir por ejemplo truncando el gen que codifica el polipéptido antes de transformarlo en el anfitrión de producción.

El término "maduro" se refiere a la forma de enzima que tras la eliminación de la secuencia señal y el propéptido comprende los aminoácidos esenciales para la actividad enzimática o catalítica. En los hongos filamentosos es la forma natural segregada en el medio de cultivo.

La temperatura óptima de la serina proteasa se puede determinar en un tampón adecuado a diferentes temperaturas utilizando caseína como sustrato como se describe en los ejemplos 1c, 5 o 14, o utilizando otros sustratos y sistemas tampón descritos en la bibliografía (Gupta *et al.*, 2002). La determinación del pH óptimo se puede llevar a cabo en un tampón adecuado a diferentes valores de pH siguiendo la actividad en un sustrato de proteína.

La actividad de proteasa se basa generalmente en la degradación de sustratos solubles. En la aplicación detergente las proteasas tienen que actuar sobre las sustancias que son por lo menos parcialmente insoluble. Por lo tanto un parámetro importante para una proteasa detergente es la capacidad para adsorber e hidrolizar estos fragmentos insolubles.

Otro parámetro importante para la selección de las proteasas de detergentes es su punto isoelectrico o valor pI. Las proteasas detergentes se comportan mejor cuando el valor de pH de la solución de detergente en la que actúa es aproximadamente el mismo que el valor pI para la enzima. El pI puede determinarse por enfoque isoelectrico en un gel inmovilizado en gradiente de pH compuesto de poliácridamida, almidón o agarosa o por estimación del pI de la secuencia de aminoácidos, por ejemplo utilizando de la herramienta de pI/MW en el servidor ExPASy (http://expasy.org/tools/pi_tool.html; Gasteiger *et al.*, 2003).

El terminal N de la proteasa purificada, así como los péptidos internos se pueden secuenciar según la de degradación de Edman (Edman y Begg, 1967) según se describe en el ejemplo 2 o por otros métodos descritos en la bibliografía.

La enzima serina proteasa de la invención puede proceder de cualquier organismo, incluidas las bacterias, arqueas, hongos, levaduras e incluso eucariotas superiores, tales como vegetales. Preferentemente dicha enzima se origina a partir de un hongo, incluyendo los hongos filamentosos y levaduras, por ejemplo, de un género seleccionado de entre el grupo que comprende *Fusarium*. Las proteasas alcalinas fúngicas presentan ventajas con respecto a las proteasas bacterianas debido a la facilidad de tratamiento corriente abajo para producir un enzima o composición enzimática exenta de microbios. El micelio se puede eliminar fácilmente mediante técnicas de filtración antes de la purificación de la enzima.

La presente invención se refiere a serina proteasa fúngica, que tiene un buen comportamiento en presencia de detergentes con propiedades muy variables, a grandes rasgos, es decir, de intervalos de temperaturas bajas a moderadas, tales como 10 °C a 60 °C.

En la presente invención un buen rendimiento en presencia de detergente significa que la enzima, en este caso la serina proteasa fúngica de la invención, funciona en intervalos de temperaturas más bajas que muchas subtilisinas comerciales actualmente a la venta. En otras palabras, un buen comportamiento significa que la enzima es capaz de degradar o eliminar manchas o material proteínicos en intervalos de temperaturas bajas a moderadas, pero especialmente en intervalos de temperaturas más bajas que los productos comerciales actuales, por ejemplo, el producto enzimático comercial Purafect® 4000L (Genencor Inc., USA).

La serina proteasa fúngica de la invención funciona en intervalos de temperaturas bajas. Por ejemplo, modificando el pH, seleccionando detergentes con propiedades adecuadas, incluyendo agentes protectores enzimáticos y controlando las condiciones de lavado la actividad de la serina proteasa de la invención puede mantenerse a temperaturas tan bajas como 10 °C. Por lo tanto, la serina proteasa de la invención, dependiendo de las condiciones de lavado y los ingredientes auxiliares y aditivos en los detergentes es útil particularmente a temperaturas de o inferiores a 50 °C. La enzima funciona también a temperaturas iguales o inferiores a 45 °C, igual o inferior a 40 °C., igual o inferior a 35 °C o igual o inferior a 30 °C.

En la presencia de un detergente, la serina proteasa fúngica de la invención funciona como se ha definido anteriormente entre 10 °C y 60 °C. En los ejemplos 6 a 13, se describen experimentos comparativos, y en las figuras 7 a 17 es evidente que la eficacia de la serina proteasa fúngica Fe_RF6318 en distintas condiciones y expuesta a

distintos tratamientos, en multitud de diferentes manchas en distintos materiales textiles, medidos como delta L* o delta% SR, es, con mucho, mejor que la eficacia de los productos comerciales, Savinase® Ultra 16L (Novozymes A/S, Dinamarca), Purafect® 4000L (Genencor Inc, USA) y Properase® 4000E (Genencor Inc., USA). En particular, el efecto de la eliminación de manchas de dicha serina proteasa fúngica Fe_RF6318 en intervalos de temperaturas bajas a moderadas tales como de 10°C a 60°C es notablemente mayor que con Savinase® Ultra 16L y Purafect® 4000L. También tiene mayor capacidad de eliminación de manchas en un intervalo de 30°C a 60°C. en comparación con Properase® 4000E.

A partir de dichos resultados experimentales se puede concluir que la serina proteasa fúngica de la invención es capaz de satisfacer en gran medida las diversas demandas de los consumidores de detergentes, de la industria de detergentes y de la industria proveedora de maquinaria de lavado y se adapta bien a los requisitos de las reglamentaciones futuras y a las costumbres de los consumidores.

Según una forma de realización preferida de la invención la enzima serina proteasa fúngica es un polipéptido que tiene actividad de serina proteasa y que comprende la enzima Fe_RF6318 madura que tiene la secuencia de aminoácidos SEC. ID. nº:15 o una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos el 86% de identidad con la secuencia de aminoácidos SEC. ID. nº:15 o por lo menos 86% con la secuencia de aminoácidos SEC. ID. nº:11. Las enzimas preferidas muestran por lo menos el 86%, preferentemente por lo menos el 87%, más preferentemente por lo menos el 88%, aún más preferentemente por lo menos el 90% de identidad. Aún más preferentemente las secuencias de aminoácidos muestran por lo menos el 92% o por lo menos el 94% o 96%, más preferentemente por lo menos el 98%, más preferentemente 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos SEC. ID. nº:15. Las identidades de las dos enzimas se comparan dentro de las regiones de secuencias correspondientes, por ejemplo, dentro de la región madura o completa de la serina proteasa.

La serina proteasa de la presente invención es la Fe_RF6318 marcada, una serina proteasa aislada procedente de *Fusarium equiseti* y es un miembro del clan SB, familia 8 de las serina endoproteinasas.

Por el término "identidad" se entiende en la presente memoria la identidad entre dos secuencias de aminoácidos comparadas entre sí dentro de la región de la secuencia correspondiente que tiene aproximadamente la misma cantidad de aminoácidos. Por ejemplo, puede compararse la identidad de una secuencia completa o de una madura de las dos secuencias de aminoácidos. Las secuencias de aminoácidos de las dos moléculas que van a compararse pueden diferir en una o más posiciones, lo que sin embargo no altera la función biológica o la estructura de las moléculas. Dicha variación puede ocurrir de forma natural debido a los diferentes organismos anfitriones o mutaciones en la secuencia de aminoácidos o que puede conseguirse por mutagenia específica. La variación puede resultar de la eliminación, sustitución, inserción, adición o combinación de una o más posiciones en la secuencia de aminoácidos. La identidad de las secuencias se mide utilizando la alineación ClustalW (por ejemplo, en www.ebi.ac.uk/Tools/Clustalw). La matriz utilizada es la siguiente: BLOSUM, Gap abierta: 10, extensión del hueco: 0,5.

Preferentemente, la serina proteasa fúngica puede obtenerse a partir de *Fusarium*, más preferentemente de *Fusarium equiseti*. Según la forma de realización más preferida, la serina proteasa de la invención puede obtenerse a partir de la cepa depositada en el Centraalbureau voor Schimmelcultures con el número de registro CBS 119568.

Una forma de realización preferida de la invención es una enzima serina proteasa fúngica con actividad de serina proteasa y una secuencia de aminoácidos de la enzima Fe_RF6318 madura tal como se define en la SEC. ID. nº:15. La enzima madura carece de la secuencia señal o prepéptido y de la prosequencia o propéptido. La serina proteasa madura de la invención incluye los aminoácidos Ala124 a Ala412 de la proteasa completa caracterizada en la SEC. ID. nº:11. Por lo tanto, dentro del alcance de la invención está también la enzima Fe_RF6318 completa que tiene la SEC. ID. nº:11, que incluye la secuencia señal (prepéptido) y el propéptido y la enzima madura, así como la forma de proenzima que carece de la secuencia señal (prepéptido) por lo tanto con la SEC. ID. nº:13.

La presente invención se refiere a una enzima serina proteasa fúngica, cuya forma madura tiene una masa molecular o peso molecular entre 20 y 35 kDa, preferentemente entre 25 y 33 kDa, más preferentemente entre 28 y 30 kDa. El PM más preferido es la masa molecular predicha de Fe_RF6318 que es de 29 kDa para el polipéptido maduro obtenido al utilizar la herramienta Compute pI/MW en el servidor ExPASy (Gasteiger *et al.*, 2003).

La enzima de la invención es eficaz en la degradación del material proteínico en un amplio intervalo de temperatura. La temperatura óptima de la enzima es de 30°C a 70°C (alrededor de 20% de la actividad máxima), preferentemente de 40°C a 60°C (por lo menos aproximadamente 40% de la actividad máxima), y más preferentemente entre 50°C y 60°C (por lo menos 70% de la actividad máxima), aún más preferentemente a 60°C (actividad máxima, Fe_RF6318) cuando se mide a pH 9 utilizando 15 min tiempo de reacción y la caseína como un sustrato como se describe en el ejemplo 5.

Según una forma de realización preferida de la invención la enzima serina proteasa fúngica tiene un pH óptimo en un intervalo de pH de por lo menos pH 6 a pH 11, lo que evidencia más del 40% de la actividad máxima a pH 10 a 50°C utilizando el tiempo de reacción 15 min y la caseína como sustrato como se describe en el ejemplo 5. En

particular, el pH óptimo está entre pH 6 y pH 10 (aproximadamente el 60% de la actividad máxima), y más preferentemente entre pH 9 y pH 10 (de aproximadamente 80% de la actividad máxima) y aún más preferentemente a pH 10 a 50°C.

La serina proteasa fúngica de la invención tiene "buen comportamiento en presencia de detergente", es decir, es capaz de degradar o eliminar manchas o material proteínico en presencia de detergente a intervalos de temperaturas bajas, específicamente a intervalos de temperaturas más bajas que los productos comerciales actuales, por ejemplo, el producto enzimático comercial Purafect® 4000L (Genencor Inc., USA). En presencia de un detergente la enzima de la invención funciona entre 10°C y 60°C, preferentemente igual o inferior a 50°C. La enzima Fe_RF6318 funciona también a temperaturas iguales o inferiores a 45°C, igual o inferior a 40°C, igual o inferior a 35°C, o igual o inferior a 30°C.

La enzima serina proteasa de la invención tiene un pI, que como se predijo a partir de la secuencia de aminoácidos deducida está entre pI 9 y pI 9,5, preferentemente entre pI 9,1 y pI 9,4. El pI predicho de la enzima Fe_RF6318 de la invención es pI 9,3.

Los oligonucleótidos sintetizados en la secuencia de aminoácidos de los péptidos del terminal N o trípticos de la enzima purificada o un producto de RCP obtenido utilizando los oligonucleótidos anteriores pueden utilizarse como sondas en el aislamiento de ADNc o un gen genómico que codifica la serina proteasa de la invención. La sonda puede diseñarse también sobre la base de las secuencias nucleotídicas o de aminoácidos conocidas de serina proteasas homólogas. Los clones de serina proteasa también se pueden detectar en base a la actividad en placas que contienen un sustrato específico para la enzima o mediante la utilización de anticuerpos específicos para una serina proteasa.

Según una forma de realización preferida de la invención la enzima serina proteasa fúngica está codificada por una secuencia polinucleotídica aislada que se hibrida en condiciones severas con un polinucleótido o secuencia de la sonda incluida en el plásmido pALK2521 que comprende la secuencia nucleotídica SEC. ID. nº:9 en *E. coli* RF7664, depositada en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) con el número de registro DSM 22171.

En la presente invención, el gen prt8A Fe se aisló con una sonda preparada por RCP utilizando hibridación severa como se describe en el ejemplo 3d. Los métodos normalizados de biología molecular se pueden utilizar en el aislamiento de ADNc o un ADN genómico del organismo anfitrión, por ejemplo, los métodos descritos en los manuales de biología molecular, tales como Sambrook y Russell, 2001.

La hibridación con una sonda de ADN, tal como, por ejemplo, la SEC. ID. nº:9 que consta de más de 100 a 200 nucleótidos, se realiza generalmente en condiciones de "alta severidad", es decir, hibridación a una temperatura, que es de 20-25°C inferior a la temperatura de fusión calculada (T_m) de un híbrido perfecto, la T_m calculada según Bolton y McCarthy (1962). Por lo general, la prehibridación y la hibridación se llevan a cabo por lo menos a 65°C en 6 x SSC (o 6 x SSPE), 5 x reactivo de Denhardt, 0,5% (p/v) de SDS, 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado, fragmentado. La adición de 50% de formamida reduce las temperaturas de prehibridación e hibridación a 42°C. Los lavados se realizaron en concentración baja de sal, por ejemplo, en 2 x SSC-SDS al 0,5% (p/v) durante 15 minutos a temperatura ambiente (T.A.), seguido en 2 x SSC-SDS al 0,1% (p/v) a temperatura ambiente, y finalmente en 0,1 x SSC-SDS al 0,1% (p/v) por lo menos a 65°C.

Según una forma de realización preferida, la enzima serina proteasa fúngica de la invención está codificada por una molécula de ácido nucleico aislada, que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos que se caracteriza en la SEC. ID. nº:15, o un polipéptido que tiene por lo menos 86% para la secuencia de aminoácidos SEC. ID. nº:15 o por lo menos 86% para la secuencia de aminoácidos SEC. ID. nº:11. Las enzimas preferidas presentan por lo menos 86%, preferentemente por lo menos 87%, más preferentemente por lo menos 88%, aún más preferentemente por lo menos el 90% de identidad. Aún más preferentemente las secuencias de aminoácidos muestran por lo menos 92% o por lo menos 94% o 96%, más preferentemente por lo menos 98%, aún más preferentemente 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. nº:15. Las identidades de las dos enzimas se comparan dentro de las regiones de secuencias correspondientes, por ejemplo, dentro de la región madura o completa de la serina proteasa.

Por lo tanto, dentro del alcance de la invención es una secuencia de polipéptido, que está codificada por una molécula de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de la serina proteasa completa de la invención, incluyendo el prepéptido (secuencia señal) y el propéptido además de la forma madura de la enzima, y la secuencia de aminoácidos que se caracteriza en la SEC. ID. nº:11.

Además, dentro del alcance de la invención es una secuencia de polipéptido, que está codificada por una molécula de ácido nucleico que codifica el propéptido de la enzima serina proteasa de la invención que incluye el propéptido, además de la forma madura de la enzima, y cuya secuencia de aminoácidos está caracterizada en la SEC. ID. nº:13.

Una forma de realización preferida de la invención es la enzima serina proteasa fúngica codificada por una molécula

de ácido nucleico aislada, que comprende la secuencia nucleotídica que codifica la forma madura de la serina proteasa Fe_RF6318 que tiene la SEC. ID. nº:15.

Según una forma de realización preferida, la enzima serina proteasa fúngica de la invención está codificada por una molécula de ácido nucleico aislada que comprende la secuencia nucleotídica SEC. ID. nº:14 que codifica la forma madura de la enzima Fe_RF6318 (SEC. ID. nº:15).

Por lo tanto, dentro del alcance de la invención está el polipéptido codificado por la molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia nucleotídica SEC. ID. nº:10 que comprende la "secuencia de codificación" para la enzima. La expresión "secuencia de codificación" significa la secuencia nucleotídica que se inicia en el codón de inicio de la traducción (ATG) y termina en el codón de terminación de la traducción (TAA, TAG o TGA). El polipéptido completo traducido comienza por lo general con metionina y comprende las regiones de intrones.

Además, dentro del alcance de la invención es una enzima serina proteasa fúngica codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia nucleotídica SEC. ID. nº:12, que codifica la forma de proenzima Fe_RF6318.

Según otra forma de realización preferida de la invención, la secuencia polinucleotídica incluida en el pALK2529 depositada en *E. coli* RF7800 con el número de registro DSM 22172 codifica la serina proteasa fúngica.

Una forma de realización de la invención es la enzima serina proteasa producida a partir de un vector de expresión recombinante que comprende la molécula de ácido nucleico, que codifica la enzima serina proteasa fúngica caracterizada anteriormente, unida operativamente a secuencias reguladoras capaces de dirigir la expresión de dicho gen que codifica la serina proteasa en un anfitrión adecuado. La construcción de dicho vector de expresión recombinante y la utilización de dicho vector se describe con mayor detalle en el ejemplo 4.

Los anfitriones adecuados para la producción de la enzima serina proteasa fúngica son los anfitriones homólogos o heterólogos, tales como los anfitriones microbianos, incluyendo bacterias, levaduras y hongos. Los hongos filamentosos, tales como *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Humicola*, *Neurospora*, *Chrysosporium*, *Rhizopus*, *Penicillium* y *Mortierella*, son los anfitriones de producción preferidos debido a la facilidad de tratamiento corriente abajo y la recuperación del producto enzimático. Los anfitriones adecuados incluyen especies tales como *T. reesei*, *A. niger*, *A. oryzae*, *A. sojae*, *A. awamori* o *A. japonicus* tipo de cepas, *F. venenatum* o *F. oxysporum*, *H. insolens* o *H. lanuginosa*, *N. crassa* y *C. lucknowense*, algunas de las cuales están en las listas como organismos anfitriones de producción de enzimas, por ejemplo en la lista AMFEP 2007 de enzimas comerciales (<http://www.amfep.org/list.html>). Más preferentemente, la enzima se produce en un anfitrión fúngico filamentoso del género *Trichoderma* o *Aspergillus*, tal como *T. reesei* o *A. niger*, *A. oryzae* o *A. awamori*. Según la forma de realización más preferida de la invención la enzima serina proteasa fúngica se produce en *T. reesei*.

La presente invención se refiere también a una molécula aislada de ácido nucleico que codifica la enzima fúngica serina proteasa seleccionada de entre el grupo que consiste en:

- (a) una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad de serina proteasa y que comprende la secuencia de aminoácidos representada en la SEC. ID. nº:15;
- (b) una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad de serina proteasa y por lo menos 86% con la SEC. ID. nº:15;
- (c) una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de codificación de la secuencia nucleotídica representada en la SEC. ID. nº:10;
- (d) una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de codificación de la secuencia polinucleotídica contenida en DSM 22171 o DSM 22172;
- (e) una molécula de ácido nucleico cuya secuencia de codificación difiere de la secuencia de codificación de una molécula de ácido nucleico de cualquiera de los puntos (c) a (d) debido a la degeneración del código genético; y
- (f) una molécula de ácido nucleico que se hibrida en condiciones severas con una molécula de ácido nucleico contenida en el DSM 22171, y que codifica un polipéptido que tiene actividad de serina proteasa y una secuencia de aminoácidos que presenta por lo menos 86% de identidad con la secuencia de aminoácidos representada en la SEC. ID. nº:15.

La molécula de ácido nucleico de la invención puede ser ARN o ADN, en la que el ADN puede estar constituido por el ADN genómico o ADNc.

Los métodos normalizados de biología molecular se pueden utilizar en tratamientos de aislamiento y enzimáticos de

la secuencia polinucleotídica que codifica la serina proteasa fúngica de la invención, incluyendo el aislamiento de ADN genómico y plásmido, la digestión de ADN para producir fragmentos de ADN, la secuenciación, las transformaciones de *E. coli*, etc. Los métodos básicos se describen en los manuales normalizados de biología molecular, por ejemplo, Sambrook y Russell, 2001.

El aislamiento del gen *Fe prtS8A* que codifica el polipéptido Fe_RF6318 se describe en el ejemplo 3. En resumen, el fragmento de RCP de 866 pb obtenido mediante la utilización de las secuencias de los cebadores de oligonucleótidos degenerados (SEC. ID. n°:6 y SEC. ID. n°:7) se utilizó para aislar el *Fe prt8A* de *Fusarium equiseti* RF6318 en pBluescript II KS + vector. El gen *Fe prtS8A* completo de *Fusarium equiseti* se incluyó en el plásmido pALK2529 depositado en *E. coli* para la colección de cultivos DSMZ con el número de registro DSM 22172. La secuencia de aminoácidos deducida de la serina proteasa se analizó a partir de la secuencia de ADN.

La secuencia nucleotídica de *Fe prtS8A* de serina proteasa de *Fusarium equiseti* (SEC. ID. n°:10) y la secuencia deducida (SEC. ID. n°:11) se presentan en la Fig. 1A-B. La longitud del gen es 1303 pb (incluyendo el codón de terminación). Se encontró un supuesto intrón que tiene la longitud de 64 pb. La secuencia de proteína deducida se compone de 412 aminoácidos incluyendo una secuencia señal prevista de 20 aminoácidos (SignalP V3.0; Nielsen *et al.*, 1997 y Nielsen y Krogh, 1998) y un propéptido de Ala21 a Arg123. Los péptidos purificados procedentes de Fe_RF6318 de tipo natural coincidían con la secuencia de aminoácidos deducida lo que indica que el gen clonado codifica la proteasa purificada procedente del anfitrión RF6318 de *Fusarium equiseti* depositado en la colección de cultivos CBS con el número de registro CBS 119568. La masa molecular predicha fue de 29 kDa para el polipéptido maduro y el pI predicho fue de 9,30. Estas predicciones se hicieron utilizando la herramienta Compute pI/MW en el servidor ExPASy (Gasteiger *et al.*, 2003). La secuencia de aminoácidos deducida contenía dos posibles sitios de N-glicosilación (Asn77 y Asn255), pero según CBS Server NetNGlyc V1.0 sólo un sitio, Asn77 (situado en la secuencia pro) es probable. Se buscaron las homologías con las secuencias de la proteasa publicadas utilizando el programa BLAST, versión 2.2.9 en el NCBI (National Center for Biotechnology Information) (Altschul *et al.*, 1990). Los valores de identidad de la secuencia de Fe_RF6318 madura con las regiones correspondientes de las secuencias homólogas se obtuvieron utilizando la alineación ClustalW (Matriz: BLOSUM, hueco abierto: 10, extensión del hueco: 0,5 (por ejemplo, en www.ebi.ac.uk/Tools/Clustalw) se muestran en la Tabla 3.

La serina proteasa Fe_RF6318 de la presente invención presentó la mayor homología con la proteína PH-1 hipotética de *Gibberella zeae*, etiqueta de locus FG03315.1 (EMBL n° de registro XP_383491, no publicado), con serina endopeptidasa CECT 2413 de *T. harzianum* (EMBL n° de registro CAL25508, Suárez *et al.*, 2007) y con el precursor de proteinasa alcalina S08.066 de *T. atroviride*, ALP (EMBL n° de registro M87516, Geremia *et al.* 1993), este último dado a conocer como una secuencia de aminoácidos SEQ ID N°: 313 en el documento US 60/818.910 (Catalyst Bioscience Inc.). La identidad con la proteína hipotética de *G. zeae* estaba en el 85% de toda la enzima. Cuando se alinearon los polipéptidos maduros que carecen de la secuencia señal y del propéptido, la identidad fue del 85%. La identidad con serina endopeptidasa CECT 2413 de *T. harzianum* fue del 70% (enzima completa) y 75% (enzima madura). La identidad con ALP de *T. atroviride* fue del 69% (enzima completa) y 74% (enzima madura).

Por lo tanto, dentro del alcance de la invención existe una secuencia polinucleotídica aislada o molécula de ácido nucleico aislada, que codifica una enzima serina proteasa fúngica o polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la forma madura de la enzima Fe_RF6318 caracterizada en la SEC. ID. n°:15, es decir, aminoácidos Ala124 a Ala412 de la serina proteasa completa de SEC. ID. n°:11.

Además, dentro del alcance de la presente invención existen moléculas de ácido nucleico que codifican un fragmento de un polipéptido de serina proteasa fúngica, en el que el fragmento tiene actividad de serina proteasa y tiene por lo menos 86% de identidad con la secuencia de aminoácidos SEQ ID n°: 15 o por lo menos 86% con la secuencia de aminoácidos SEC. ID. n°:11. Las enzimas preferidas presentan por lo menos 86%, preferentemente por lo menos 87%, más preferentemente por lo menos 88%, aún más preferentemente por lo menos 90% de identidad. Aún más preferentemente las secuencias de aminoácidos presentan por lo menos 92% o por lo menos 94% o 96%, más preferentemente por lo menos 98%, aún más preferentemente 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. n°:15. Las identidades de las dos enzimas se comparan dentro de las regiones de la secuencia correspondientes, por ejemplo, dentro de la región completa o madura de la serina proteasa.

La molécula de ácido nucleico es preferentemente una molécula que comprende la secuencia de codificación representada en la SEC. ID. n°:10, que codifica la forma completa de la enzima serina proteasa fúngica de la presente invención.

La molécula de ácido nucleico aislada de la invención puede ser una molécula que comprende la secuencia de codificación de la secuencia polinucleotídica contenida en DSM 22171 o DSM 22172. DSM 22171 lleva la secuencia nucleotídica del fragmento de RCP (SEC. ID. n°:9) utilizada en la clonación del gen *Fe prtS8A* completo. DSM 22172 lleva la secuencia nucleotídica del gen *Fe prtS8A* completo (SEC. ID. n°:10).

La molécula de ácido nucleico de la invención también puede ser un análogo de la secuencia nucleotídica caracterizado anteriormente. La "degeneración" significa análogos de la secuencia nucleotídica, que difieren en uno o más nucleótidos o codones, pero que codifican la proteasa recombinante de la invención.

La molécula de ácido nucleico también puede ser una molécula de ácido nucleico que se hibrida en condiciones severas con una sonda de RCP contenida en el plásmido pALK2521 depositado en *E. coli* con el número de registro DSM 22171 y que codifica un polipéptido que tiene actividad de serina proteasa y una secuencia de aminoácidos que dentro de la región de la secuencia correspondiente presenta por lo menos 86% de identidad con la secuencia de aminoácidos representada en la SEC. ID. nº:15. El ADN que se hibrida se puede originar a partir de un hongo que pertenece a la especie *Fusarium* o puede proceder de otras especies de hongos.

Por lo tanto, dentro del alcance de la invención existe una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia nucleotídica tal como se representa en SEC. ID. nº:10, SEC. ID. nº:12 o SEC. ID. nº:14 y análogos de las mismas.

La presente invención se refiere también a un vector de expresión recombinante o a un montaje de expresión recombinante, que puede utilizarse para propagar o expresar la secuencia de ácido nucleico o el gen que codifica la serina proteasa seleccionada en un anfitrión procariota o eucariota adecuado. El vector de expresión recombinante comprende secuencias de ADN o de ácido nucleico que facilitan la expresión directa y la secreción de la secuencia de codificación de la serina proteasa en un anfitrión adecuado, tales como activadores, potenciadores, terminadores (incluyendo señales de terminación de transcripción y traducción) y secuencias señal operativamente unidas a la secuencia polinucleotídica que codifica dicho serina proteasa. El vector de expresión puede comprender además genes marcadores para la selección de las cepas transformantes o el marcador de selección se puede introducir al anfitrión en otro montaje del vector por cotransformación. Dichas secuencias reguladoras pueden ser homólogas o heterólogas para el organismo de producción o pueden originarse a partir del organismo, del que se aísla el gen que codifica la serina proteasa.

Los ejemplos de activadores para la expresión de la serina proteasa de la invención en anfitriones filamentosos fúngicos son los activadores de TAKA amilasa de *A. oryzae*, proteasa alcalina ALP y triosa fosfato isomerasa, lipasa de *Rhizopus miehei*, glucoamilasa de *Aspergillus niger* o *A. awamori* (*glaA*), proteasa tripsinoide de *Fusarium oxysporum*, activador de celobiohidrolasa I de *Chrysosporium lucknowense*, celobiohidrolasa I de *Trichoderma reesei* (Cel7A), etc.

En levadura, se pueden utilizar por ejemplo, activadores de enolasa de *S. cerevisiae* (ENO-1), galactocinasa (GAL1), alcohol deshidrogenasa (ADH2) y 3-fosfoglicerato cinasa para proporcionar expresión.

Los ejemplos de secuencias de activador para dirigir la transcripción de la serina proteasa de la invención en un anfitrión bacteriano son el activador del operón *lac* de *Escherichia coli*, el activador *dagA* de agarasa de *Streptomyces coelicolor*, el activador del gen de la alfa-amilasa (*amyL*) de *B. licheniformis*, el activador del gen de amilasa maltógena (*amyM*) de *B. stearothermophilus*, los activadores de los genes *xylA* y *xylB* de *B. subtilis*, etc.

Los terminadores adecuados incluyen los de los genes anteriormente mencionados o cualesquiera otras secuencias de terminador caracterizadas.

Los marcadores de selección o transformación adecuados incluyen aquellos que complementan un defecto en el anfitrión, por ejemplo, los genes *dal* de *B. subtilis* o *amdS* y *niaD* de *B. licheniformis* o *Aspergillus*. La selección puede basarse también en un marcador que confiere resistencia a los antibióticos, tales como resistencia a la ampicilina, kanamicina, cloranfenicol, tetraciclina, fleomicina o higromicina.

Es preferible la secreción extracelular de la serina proteasa de la invención. Por lo tanto, el vector recombinante comprende secuencias que facilitan la secreción en el anfitrión seleccionado. La secuencia señal de la serina proteasa de la invención o la presecuencia o el prepéptido pueden incluirse en el vector de expresión recombinante o la secuencia señal natural puede sustituirse con otra secuencia señal capaz de facilitar la secreción en el anfitrión seleccionado. Por lo tanto, la secuencia señal seleccionada puede ser homóloga o heteróloga al anfitrión de expresión.

Los ejemplos de secuencias de señal adecuadas son las de los organismos de hongos o levaduras, por ejemplo, las secuencias señal de genes bien expresados. Dichas secuencias señal son bien conocidos de la bibliografía.

El vector recombinante puede comprender además secuencias que facilitan la integración del vector en el ADN cromosómico del anfitrión para obtener la expresión estable.

La proteasa Fe_RF6318 de la invención se expresó con su propia secuencia señal procedente del activador *cbhl* (*cel7A*) de *T. reesei* como se describe en el ejemplo 4. El montaje de expresión utilizado para transformar el anfitrión *T. reesei* incluye también el terminador *cbhl* y el marcador *amdS* para la selección de los transformantes de las células no transformadas.

La presente invención se refiere también a las células anfitrionas que comprenden el vector de expresión recombinante descrito anteriormente. Los anfitriones adecuados para la producción de la enzima serina proteasa

fúngica son anfitriones homólogos o heterólogos, tales como los anfitriones microbianos, incluyendo bacterias, levaduras y hongos. También son posibles sistemas de producción en las células vegetales o de mamífero.

Los hongos filamentosos, tales como *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Humicola*, *Chrysosporium*, *Neurospora*, *Penicillium*, *Rhizopus* y *Mortierella*, son los anfitriones de producción preferidos debido a la facilidad de tratamiento corriente abajo y a la recuperación del producto enzimático. Sistemas de anfitrión para la producción y expresión adecuados son, por ejemplo, el sistema de producción desarrollado para el hongo filamentoso anfitrión *Trichoderma reesei* (EP 244 234), o sistemas de producción de *Aspergillus*, tales como cepas del tipo *A. oryzae* o *A. niger* (documento WO 9708325, patente US nº 5.843.745, patente US nº 5.770.418), *A. awamori*, *A. sojae* y *A. japonicus*, o el sistema de producción desarrollado para *Fusarium*, tal como *F. oxysporum* (Malardier *et al.*, 1989) o *F. venenatum* y para *Neurospora crassa*, *Rhizopus miehei*, *Mortierella alpinis*, *H. lanuginosa* o *H. insolens* o para *Chrysosporium lucknowense* (documento nº 6.573.086). Los sistemas de producción adecuados desarrollados para levaduras son sistemas desarrollados para *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* o *Pichia pastoris*. Los sistemas de producción adecuados desarrollados para las bacterias son un sistema de producción desarrollado para *Bacillus*, por ejemplo para *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*, para *E. coli*, o para el actinomiceto *Streptomyces*. Preferentemente, la serina proteasa de la invención se produce en un anfitrión fúngico filamentoso del género *Trichoderma* o *Aspergillus*, tales como cepas del tipo *T. reesei*, o *A. niger*, *A. oryzae*, *A. sojae*, *A. awamori* o *A. japonicus*. Según la forma de realización más preferida de la invención la enzima serina proteasa fúngica se produce en *T. reesei*.

La célula anfitriona de producción puede ser homóloga o heteróloga a la serina proteasa de la invención. El anfitrión puede estar exento de proteasas homogéneas debido a la eliminación de las proteasas ya sea por inactivación o eliminación de una o más proteasas anfitrionas, por ejemplo, por eliminación del gen o genes que codifica(n) dichas proteasas homogéneas u homólogas.

La presente invención se refiere también a un procedimiento para producir un polipéptido que tiene actividad de serina proteasa, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de cultivar la célula anfitriona natural o recombinante que lleva el vector de expresión recombinante para una serina proteasa de la invención en condiciones adecuadas y, opcionalmente, aislar dicha enzima. El medio de producción puede ser un medio adecuado para cultivar el organismo anfitrión y que contiene inductores para la expresión eficaz. Los medios adecuados son bien conocidos en la bibliografía.

La invención se refiere a un polipéptido que tiene actividad de serina proteasa, estando codificado dicho polipéptido por la molécula de ácido nucleico de la invención y que puede obtenerse por el procedimiento descrito anteriormente. Preferentemente, el polipéptido es una enzima proteasa recombinante obtenido por cultivo de la célula anfitriona que lleva el vector de expresión recombinante para una serina proteasa de la invención.

La invención se refiere además a un procedimiento para la obtención de un preparado enzimático que comprende un polipéptido que tiene actividad de serina proteasa, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de cultivar una célula anfitriona que lleva el vector de expresión de la invención y, o bien la recuperación del polipéptido de las células o la separación de la las células del medio de cultivo y la obtención del sobrenadante que tiene actividad de serina proteasa.

La presente invención se refiere también a un preparado enzimático, que comprende la enzima serina proteasa caracterizada anteriormente. La preparación o composición enzimática tiene actividad de serina proteasa y puede obtenerse mediante el procedimiento según la invención.

En la invención es un preparado enzimático, que comprende la serina proteasa fúngica de la invención, preferentemente la serina proteasa recombinante obtenida mediante el cultivo de una célula anfitriona, que lleva el vector de expresión recombinante de la invención.

Dicho preparado enzimático puede comprender, además, diferentes tipos de enzimas, además de la serina proteasa de la presente invención, por ejemplo, otra proteasa, una amilasa, una lipasa, una celulasa, cutinasa, una pectinasa, una mananasa, una xilanasa y/o una oxidasa tal como una lacasa o peroxidasa con o sin un mediador. Es de esperar que estas enzimas mejoren la eficacia de las serina proteasas de la invención al eliminar los hidratos de carbono o grasas y aceites presentes en el material que se manipula. Dichas enzimas pueden ser enzimas naturales o recombinantes producidas por la cepa anfitrión o pueden añadirse al sobrenadante de cultivo después del proceso de producción.

Dicho preparado enzimático puede comprender además un aditivo adecuado seleccionado de entre el grupo de agentes tensioactivos, tampones, agentes anticorrosivos, estabilizantes, agentes blanqueadores, mediadores, constructores, cáusticos, abrasivos y conservantes, abrillantadores ópticos, agentes contra la reprecipitación, colorantes, pigmentos, etc.

Los tensioactivos son útiles para emulsionar grasas y humectar superficies. El tensioactivo puede ser un no iónico incluyendo semipolar y/o aniónico y/o catiónico y/o iónico dipolar.

Pueden añadirse tampones al preparado enzimático para modificar el pH o afectar la eficacia o la estabilidad de los demás ingredientes.

- 5 Los estabilizantes adecuados incluyen polioles tales como propilenglicol o glicerol, un azúcar o alcohol de azúcar, ácido láctico, ácido bórico, o derivados de ácido bórico, péptidos, etc.

10 Para oxidar y degradar compuestos orgánicos se utiliza agente blanqueante. Ejemplos de sistemas químicos blanqueantes adecuados son las fuentes de H_2O_2 , tales como perborato o percarbonato con o sin activadores de blanqueo formadores de perácido tal como tetraacetiletilendiamina o, alternativamente, peroxiácidos, por ejemplo, tipo amida, imida o sulfona. Los oxidantes químicos pueden estar sustituidos parcial o completamente utilizando enzimas oxidantes, tales como lacasas o peroxidasas. Muchas lacasas no funcionan eficazmente en ausencia de mediadores.

- 15 Los constructores o agentes complejantes incluyen sustancias, tales como zeolita, difosfato, trifosfato, carbonato, citrato, etc. El preparado enzimático puede comprender además uno o más polímeros, tales como carboximetilcelulosa, poli(etilenglicol), poli(alcohol vinílico), poli(vinilpirrolidona), etc. Además, se pueden añadir suavizantes, cáusticos conservantes para prevenir el deterioro de otros ingredientes, abrasivos y sustancias que modifican la formación de espuma y las propiedades de viscosidad.

20 Según una forma de realización preferida de la invención, dicho preparado enzimático está en la forma de líquido, polvo o granulado.

25 La serina proteasa fúngica de la presente invención como otras proteasas, particularmente las proteasas alcalinas puede utilizarse en las industrias de detergentes, proteínas, elaboración de la cerveza, cárnicas, fotográficas, de la piel, de productos lácteos y farmacéuticas (Kalisz, 1988; Rao *et al*, 1998). Por ejemplo, se puede utilizar como alternativa a los productos químicos para convertir los desechos proteicos fibrosos (por ejemplo, cuerno, plumas, uñas y cabello) en biomasa útil, concentrado de proteínas o aminoácidos (Anwar y Saleemuddin, 1998). La utilización de serina proteasa fúngica de la presente invención como otras enzimas puede lograr mejorar la calidad del cuero y reducir la contaminación medioambiental y ahorrar energía y como las proteasas alcalinas puede ser útil en la síntesis de péptidos y en la resolución de la mezcla de D,L-aminoácidos. La subtilisina en combinación con antibióticos de amplio espectro en el tratamiento de quemaduras y heridas es un ejemplo de la utilización de las serina proteasas en la industria farmacéutica, por lo tanto, la serina proteasa fúngica de la presente invención puede también encontrar dicha utilización y también como las proteasas alcalinas puede ser aplicable en la extracción de sangre en equipos quirúrgicos y en la limpieza de lentes de contacto o dentaduras postizas. Como proteasa alcalina de *Conidiobolus coronatus*, la serina proteasa fúngica de la presente invención se puede utilizar para la sustitución de tripsina en cultivos de células animales. Las proteasas de la invención también se pueden utilizar en la limpieza de membranas y en la destrucción de biofilmes. En la cocción de los proteasas se pueden utilizar por ejemplo, en la destrucción de la red del gluten y en otras aplicaciones alimentarias en la hidrólisis de proteínas alimentarias, por ejemplo, proteínas de la leche. También se pueden utilizar por ejemplo en el tratamiento de la levadura, haciendo (extrayendo más proteínas de huesos de animales), creando nuevos sabores, reduciendo el amargor, cambiando las propiedades emulsionantes, generando péptidos bioactivos y reduciendo el poder alérgico de las proteínas. Los sustratos incluyen proteínas animales, vegetales y microbianas.

45 La industria de los detergentes, en particular la industria de detergentes para lavandería, se ha convertido en el único gran consumidor de proteasas activas en el intervalo de pH alto (Anwar y Saleemuddin, 1998). La proteasa detergente ideal debe poseer amplia especificidad de sustrato para facilitar la eliminación de gran variedad de manchas debidas a comida, hierba, sangre y otras secreciones corporales. Tiene que ser activa al pH y la fuerza iónica de la solución detergente, la temperatura de lavado y el pH, y tolerar la manipulación mecánica, así como los agentes quelantes y oxidantes añadidos a los detergentes. El pl de la proteasa debe estar cerca del pH de la solución detergente. Debido a la actual crisis energética y a la conciencia para conservación de la energía, en la actualidad es deseable utilizar la proteasa a temperaturas más bajas.

50 La presente invención se refiere también a la utilización de la enzima serina proteasa o a la preparación de enzimas para detergentes, al tratamiento de fibras textiles, para el tratamiento de la lana, para el tratamiento del cabello, para el tratamiento del cuero, para el tratamiento de piensos o alimentos, o para cualquier aplicación que implique la modificación, la degradación o la eliminación de material proteínico.

60 Por lo tanto, una forma de realización preferida de la invención es la utilización de la enzima serina proteasa caracterizada anteriormente como aditivo de detergente útil para detergentes para ropa y composiciones para lavado de vajillas, incluidas las composiciones para lavavajillas automáticos.

65 La expresión "detergente" se utiliza para significar sustancia o material destinado ayudar a la limpieza o que tiene propiedades limpiadoras. El término "detergencia" indica la presencia o el grado de limpieza de la propiedad. El grado de la propiedad de limpieza puede probarse en diferentes materiales de sustrato proteínicos o que contienen proteínas o manchas o mezclas de manchas unidas a un soporte sólido, insoluble en agua, tal como fibras textiles o

de vidrio. El material proteínico típico incluye sangre, leche, tinta, huevo, hierba y salsas. Para pruebas hay mezclas de manchas proteínicas disponibles en el mercado. La función de la enzima detergente es degradar y eliminar las manchas de proteína que contienen. Los resultados de la prueba dependen del tipo de mancha, de la composición del detergente y de la naturaleza y el estado de los tejidos utilizados en el ensayo de lavado (Maurer, 2004).

Normalmente, la eficacia de la proteasa o del lavado se mide en "eficiencia de eliminación de las manchas" o "efecto de eliminación de las manchas" o "grado de propiedad limpiadora", lo que significa un aumento visible y mensurable de la luminosidad o cambio de color del material manchado, por ejemplo, en muestras artificialmente sucias o telas de prueba. Los valores de luminosidad o cambio de color se pueden medir, por ejemplo, midiendo el color como valores de reflectancia con un espectrofotómetro utilizando coordenadas espaciales de color $L^*a^*b^*$ como se describe en los ejemplos 6 a 10. La decoloración o eliminación de mancha proteica indicadora de la eficacia de la proteasa (eficiencia de eliminación de la mancha) se calcula por ejemplo como ΔL^* , lo que significa valor de luminosidad L^* de la tela tratada con enzima menos el valor de luminosidad L^* de la tela tratada con tampón o solución de lavado sin enzima (blanco enzimático o referencia). La presencia de detergente puede mejorar la eficacia de la enzima en la eliminación de las manchas.

La serina proteasa de la presente invención degrada diversos tipos de manchas proteínicas en condiciones de pH neutro y alcalino e incluso en presencia de detergentes con diferentes composiciones (como se muestra en los ejemplos 6 a 13).

Como se muestra en el ejemplo 6 la serina proteasa de la invención eliminó la mancha de sangre/leche/tinta a 50°C y especialmente a 30°C en tampón de pH 9 mejor que los preparados comerciales de proteasa Savinase® Ultra 16L y Purafect® 4000L (figuras 5 y 6). Los preparados enzimáticos se dosificaron en unidades de actividad. El efecto de eliminación de manchas en las manchas de sangre/leche/tinta se probó también en todo el intervalo de temperatura de 10°C a 60°C, tal como se describe en el ejemplo 12. El preparado de proteasa Fe_RF6318 presentó mayor capacidad de eliminación de manchas en comparación con el preparado comercial de proteasa Savinase® Ultra 16L y Purafect® 4000L. También mostró mayor capacidad de eliminación de manchas en un intervalo de 30°C a 60°C en comparación con Properase® 4000E (figura 16).

La eficacia de la proteasa Fe_RF6318 se ensayó también en detergente en polvo a 40°C/50°C a pH 10 como se describe en el ejemplo 7. Se ensayó la capacidad de la enzima en la eliminación de manchas de sangre/leche/tinta en material de poliéster-algodón. Cada preparado enzimático se dosificó en unidades de actividad (μmol de tirosina/minuto). Como se muestra en las figuras 7 y 8 la proteasa de la invención es adecuada también para detergentes en polvo en condiciones muy alcalinas y su resistencia a agentes de blanqueo fue ligeramente superior que con proteasa comercial Purafect® 4000L.

La proteasa Fe_RF6318 eliminó manchas típicas de sangre/leche/tinta también en detergente líquido principal y en Ariel Sensible (Procter & Gamble, Reino Unido), en presencia del detergente líquido principal y a 30°C (ejemplo 9). La eficiencia en manchas de sangre/leche/tinta fue considerablemente mayor que con los preparados comerciales Savinase® Ultra 14L y Purafect® 4000L (figuras 10 y 11). Los preparados enzimáticos se dosificaron en unidades de actividad. Se observó el mismo efecto también cuando la dosificación se calculaba como cantidad de proteína añadida (figuras 10B y 11B). Los lavados realizados con la concentración de detergente líquido de 3,3 g/l y a 10°C y 20°C. Volvió a presentar una eficacia superior sobre los preparados comerciales Savinase® Ultra 14L, Purafect® 4000L y Properase® 4000E (ejemplo 13; figura 17).

Además de las manchas de sangre/leche/tinta la proteasa Fe_RF6318 fue eficaz en la eliminación de manchas, tales como de hierba y cacao cuando se probó en detergentes líquidos a 30°C. Los tratamientos se realizan en ATLAS LP-2 Lave-Ometer. Resultados (figuras 12 y 13) demuestran que la Fe_RF6318 fue eficaz en varias manchas a temperaturas bajas como 30°C.

La eficacia del preparado de la enzima Fe_RF6318 recombinante producido en *T. reesei* se probó en presencia de detergente líquido principal a gran escala en lavadora a 30°C (ejemplo 11). Ocho trazadores diferentes sensibles a la proteasa para probar los efectos secundarios se presentan en la Tabla 5 y las condiciones del proceso en la Tabla 6. Las dosis de enzima utilizadas en los ensayos de prueba se calcularon tanto en actividades enzimáticas como en cantidad de proteína enzimática. Los resultados presentados en las figuras 14A-B demuestran que la suma de los resultados obtenidos con las diferentes manchas fue mayor con la Fe_RF6318 que con los preparados de proteasa comerciales Savinase® Ultra 16L y Purafect® 4000L cuando la enzima se dosificó en cantidad de actividad o en proteína. La Fe_RF6318 fue la más eficiente en manchas de sangre/leche/tinta, de chocolate/leche, de aceite de cacahuete/leche y de yema de huevo (figuras 15A-E).

Según una forma de realización preferida de la invención, la serina proteasa fúngica de la invención es útil en detergentes líquidos y detergentes en polvo como se muestra en los ejemplos 6 a 13. La enzima del preparado enzimático de la invención puede formularse para su utilización en un lavado a mano o a máquina o se puede formular para utilización en limpieza de superficies duras del hogar o, preferentemente, en operaciones de lavado de vajillas a mano o a máquina.

Ejemplo 1. Producción y purificación de la proteasa RF6318 de *Fusarium equiseti***(a) Cultivo de RF6318 de *Fusarium equiseti***

5 La cepa RF6318 fúngica se aisló previamente como un hongo filamentoso productor de celulasas. Se identificó como *Fusarium* cf. *equiseti* (Libert) Desmazières (por Arthur de Cock, Identification Services, Centralbureau Voor Schimmelcultures, P.O. Box 85167, 3508 AD Utrecht, Holanda). La RF6318 de *F. equiseti* se demostró que produce actividad de la proteasa en el ensayo en placa con agar-agar que contiene hemoglobina como sustrato. Como los cultivos en placa se llevaron a cabo a aproximadamente 10°C este resultado sugirió que RF6318 produce una proteasa o proteasas que actúan a temperaturas frías. La RF6318 de *F. equiseti* se cultivó, se mantuvo y esporuló en dextrosa de patata (DP) agar-agar (Difco) a +4°C. Para la producción enzimática se inocularon esporas en cultivo inclinado de RF6318 en un medio de cultivo que contenía: 30 g/l de harina de maíz (finamente molido), 5 g/l de polvo de maíz remojado, 4 g/l de harina de soja (desengrasado), 2 g/l de KH_2PO_4 , 1 g/l de NaCl y 1 g/l de aceite de parafina. El pH del medio se ajustó antes de la esterilización con NaOH a 8,5 y el medio se introdujo en autoclave durante 30 minutos a 121°C. El microbio se cultivó en un volumen de 50 ml en un agitador (200 rpm) a 28°C durante 7 días. El sobrenadante del cultivo gastado se demostró que contenía actividad de proteasa alcalina, cuando se realizaron mediciones de actividad (según los ejemplos 1c, 5 o 14) a diferentes valores de pH (pH 7-10). Debido a esta actividad alcalina, se eligió la cepa RF6318 como supuesta cepa donante del gen de proteasa.

(b) Purificación de la proteasa procedente del medio de cultivo de RF6318 de *F. equiseti*

Las células y los sólidos se retiraron del medio de cultivo gastado por centrifugación durante 30 min, 50.000 g a 4°C (Sorvall RC6 plus). Se utilizaron 50 ml del sobrenadante para la purificación de la proteasa. Tras la centrifugación, el pH del sobrenadante se ajustó a 8,0 con la adición de HCl. El sobrenadante se filtró a continuación a través de un filtro de 0,44 µm (MILLEX HV Millipore) y se aplicó a una columna Q Sepharose FF (GE Healthcare) de 5 ml equilibrada en Tris-HCl 20 mM, pH 8. Se recogió fracción de flujo a través y su pH se redujo a 7,5 añadiendo HCl. Se añadió sulfato de amonio sólido a la fracción de flujo a través para obtener una concentración salina final de 1 M. La fracción de flujo a través se filtró a través de un filtro de 0,44 µm antes de aplicar a la columna de fenil Sepharose HP (1 ml) (GE Healthcare) equilibrada en Tris-HCl 20 mM - sulfato de amonio 1 M pH 7,5. Las proteínas se eluyeron con un gradiente decreciente lineal de sulfato de amonio (de 1 a 0 M). Se recogieron fracciones de 1 ml y se analizó la actividad de proteasa en caseína marcada con resorufina (Boehringer Mannheim Biochemica) a pH 8,0 según las instrucciones del fabricante. Las fracciones con actividad de proteasa se agruparon y se ultrafiltraron con membrana 10 k (Amicon). El filtrado concentrado se aplicó a una columna Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare) equilibrada con Tris-HCl 20 mM - NaCl 200 mM, pH 7,5. Las proteínas se eluyeron con el mismo tampón y se recogieron fracciones de 0,5 ml. Se analizó la actividad de proteasa de estas fracciones. Las fracciones con actividad de proteasa se analizaron en electroforesis en gel de dodecil sulfato de sodio poliacrilamida (SDS-PAGE). Se demostró que las fracciones contenían una banda de proteína principal con un peso molecular de aproximadamente 29 kDa. Las fracciones seleccionadas se agruparon. Las fracciones agrupadas se utilizaron para la preparación de péptidos (ejemplo 2). Según las mediciones del ensayo de actividad, la proteína purificada tenía su pH óptimo a pH 10. Esta proteasa RF6318 purificada de *F. equiseti* se denomina Fe_RF6318.

(c) Ensayo de actividad de proteasa

La actividad de proteasa se ensayó por el método de Folin-Ciocalteu con caseína utilizando caseína como sustrato. La velocidad de degradación de la caseína por una proteasa se midió por seguimiento espectrofotométrico de la liberación de fragmentos solubles en ácido en función del tiempo. El sustrato de caseína, utilizado en el ensayo se preparó de la forma siguiente: se disolvieron 6 g de caseína Hammerstein calidad MP Biomedicals, LLC (101.289) en 500 ml de Tris 100 mM, CaCl_2 2,0 µM, MgCl_2 0,7 mM, NaHCO_3 2,5 mM. El pH de la solución de sustrato se ajustó a 9,0 con HCl. Las reacciones enzimáticas se interrumpieron utilizando solución de TCA que contenía: TCA 0,11 M, acetato sódico 0,22 M, ácido acético 0,33 M, Na_2CO_3 0,5 M en 1000 ml de agua destilada. El reactivo de Folin utilizado en el ensayo se preparó diluyendo 25 ml de reactivo de fenol de Folin-Ciocalteu 2 N (Sigma, F 9252) a 100 ml con agua destilada. La reacción se inició en primer lugar incubando 2,5 ml de solución del sustrato durante 5 min a la temperatura dada, tras lo cual se añadieron 0,5 ml de solución enzimática y la reacción se llevó a cabo durante 30 min. Después de 15 min. o 30 min. de reacción se añadieron 2,5 ml de solución de interrupción de la reacción, se mezclaron los contenidos y se dejaron reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los tubos se centrifugaron a 4000 rpm durante 10 minutos (Hettich Rotanta 460). Se pipeteó 1 ml de sobrenadante claro y se mezcló con 2,5 ml de Na_2CO_3 0,5 M y 0,5 ml de reactivo de Folin diluido. Después de esperar durante 5 min. (desarrollo del color) se midió la absorbancia de la mezcla (color) a 660 nm frente a un blanco enzimático. El blanco enzimático se preparó de la forma siguiente: 0,5 ml de solución enzimática se mezclaron con 2,5 ml de solución de interrupción y 2,5 ml de sustrato, y la mezcla se incubó durante 30 min a la temperatura dada. Una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima que libera el producto de la hidrólisis de proteína soluble en ácido correspondiente a 1 µg de tirosina por ml de la mezcla de reacción por min.

Ejemplo 2. Secuenciación de aminoácidos del terminal N e internos de la proteasa Fe_RF6318 de *F. equiseti* purificada

Para la determinación de secuencias internas, la banda teñida con azul brillante de Coomassie se eliminó del gel de poliacrilamida y se digirió esencialmente "en gel" como según ha descrito Shevchenko *et al.* (1996). Las proteínas se redujeron con ditioneitol y se alquilaron con yodoacetamida antes de la digestión con tripsina (Sequencing Grade Modified Tripsin, V5111, Promega).

Se generaron espectros de masas en tándem de tiempo de vuelo con cuadrupolo de ionización por electroatomización para la secuenciación desde el comienzo utilizando un instrumento Q-TOF (Micromass, Manchester, Reino Unido) conectado a un cromatógrafo líquido nano Ultimate (LC-Packings, Holanda) esencialmente como se describió anteriormente (Poutanen *et al.*, 2001), pero utilizando una columna de captura de 150 m × 1,0 mm (3 µm, 120 Å, nº 222403, SGE Ltd. Reino Unido) para la concentración previa de péptidos.

Para de análisis de secuencias de terminales N las proteínas separadas por SDS-PAGE se transfirieron por electrotransferencia a una membrana de difluoruro de polivinilideno (ProBlott; Perkin Elmer Applied Biosystems División, Foster City, CA). Después de teñir con azul brillante de Coomassie, las bandas de proteínas de interés se retiraron y se sometieron a análisis de la secuencia del terminal N mediante por degradación de Edman en un secuenciador de proteínas Procise 494A (Perkin Elmer Applied Biosystems División, Foster City, CA)

Las secuencias peptídicas del terminal N e interna determinadas en la proteasa Fe_RF6318 purificada se muestran en la Tabla 1. Las secuencias peptídicas presentaban homología con las secuencias de la proteasa publicadas de serina proteasas de *Fusarium oxysporum* con números de registro Q5R2N9 y O74236 en EMBL.

Tabla 1. Secuencias peptídicas del N-terminal e internas determinadas en proteasa Fe_RF6318

Péptido	Secuencia	SEC. ID.	Comentarios
Nº 3792	ALTTQSNAPWGLAAISRXTTP	nº: 1	Secuencia del terminal N. X puede ser C, S, T o R
1246.673	TVAAADSSWR	nº: 2	
3341.633	XTYGVAK	nº: 3	
1503.799	EA(L/I)TVGATTSADAK	nº: 4	El tercer aminoácido no es definitivo, puede ser L o I

Ejemplo 3. Clonación del gen RF6318 de *F. equiseti* que codifica la proteasa Fe_RF6318**(a) Aislamiento de ADN y procedimientos utilizados de biología molecular**

Se utilizaron procedimientos normalizados de biología molecular en el aislamiento y tratamientos enzimáticos de ADN (por ejemplo, aislamiento de ADN plásmido, digestión de ADN para producir fragmentos de ADN), en transformaciones de *E. coli*, secuenciación, etc. Los procedimientos básicos utilizados fueron ya sea como se describe para la enzima, el reactivo o por el fabricante del kit o como se describe en los manuales de normas de biología molecular, por ejemplo, Sambrook y Russell (2001). El aislamiento de ADN genómico de RF6318 de *F. equiseti* se llevó a cabo como describen con detalle Raeder y Broda (1985).

(b) Cebadores para la preparación de sondas

La sonda para la clonación del gen que codifica la proteína Fe_RF6318 se sintetizó por RCP. Se programaron oligos degenerados basándose en las secuencias de aminoácidos de los péptidos obtenidos de la Fe_RF6318 purificada (Tabla 1). Las secuencias de los cebadores se muestran en la Tabla 2 (SEC. ID. nº:5 a nº: 8).

Tabla 2. Oligonucleótidos (SEC. ID. nº:5 a nº 8) utilizados como cebadores de RCP en la amplificación de la sonda. Oligos, las SEC. ID. nº, longitudes y degeneraciones de oligos, oligonucleótidos y aminoácidos del péptido utilizado en la planificación de la secuencia de oligonucleótidos.

Oligo	SEC. ID. nº:	Longitud (nts)	Degeneración	Secuencia ^(a)	Péptido ^(b)
PRO87	5	20	256	CARTCNAAYGCNCCNTGGGG (s)	nº 3792
PRO88	6	20	128	CARAGYAAAYGCNCCNTGGGG (s)	Nº 3792
PRO89	7	20	2048	GCRTCNGCNGANGTNGTNGC (s)	1503.799
PRO90	8	20	1024	GCRTCNGCRCTNGTNGTNGC (s)	1503.799
^(a) N = A, T, C o G; R = A o G, Y = T o C; "s" entre paréntesis = cadena transcrita, "como" entre paréntesis = cadena complementaria.					
^(b) Las secuencias peptídicas se incluyen en la Tabla 1.					

(c) Reacciones de RCP y selección de sondas para la clonación

ADN genómico de RF6318 de *F. equiseti* se utilizó como plantilla para la síntesis de sondas. Las mezclas de

reacción de RCP contenían Tris-HCl 10 mM, pH 8,8, KCl 50 mM, Triton X-100 al 0,1%, MgCl₂ 1,5 mM, dNTPs 0,2 mM, 1 µM de cada cebador y 4 unidades de ADN polimerasa Dynazyme II (Finnzymes, Finlandia) y aproximadamente 3 µg de ADN genómico por 100 µl de volumen de reacción. Las condiciones para las reacciones de RCP fueron las siguientes: 5 min de desnaturalización inicial a 96°C, seguido por 32 ciclos de 1 min a 96°C, hibridación de 30 sek a 55,5°C, 1 min de ampliación a 72°C, y una ampliación final a 72°C durante 5 min. La combinación de cebadores PRO88 (SEC. ID. nº:6) y PRO89 (SEC. ID. nº:7) produjo un producto de ADN específico con el tamaño esperado (según los cálculos basándose en las secuencias de la proteasa fúngica publicada). El producto de ADN se aisló y purificó en la mezcla de reacción de RCP y se clonó al vector pCR[®] 2.1-TOPO[®] según las instrucciones de los fabricantes (Invitrogen, USA). El fragmento de ADN de 866 pb se secuenció a partir de este plásmido (SEC. ID. nº:9). El plásmido pCR[®] 2.1-TOPO[®] que contiene este fragmento de ADN ampliado por RCP se denominó pALK2521. La cepa RF7664 de *E. coli* que incluye el plásmido pALK2521 se depositó en la colección DSM con el número de registro DSM 22171.

La secuencia de aminoácidos deducida del fragmento de RCP incluye las secuencias de los péptidos internos Fe_RF6318 1246.673 (SEC. ID. nº:2) y 3341.633 (SEC. ID. nº:3) (Tabla 1). Además la parte del terminal C del péptido de terminal N nº 3792 (SEC. ID. nº:1) no incluido en el cebador se halló a partir de la secuencia de aminoácidos deducida (Tabla 1). Esto confirma que el fragmento de ADN obtenido a partir de la reacción de RCP formaba parte del gen que codifica la proteína Fe_RF6318 y por lo tanto se utilizó como sonda para la detección del gen completo a partir de ADN genómico de *F. equiseti*.

(d) Clonación del gen RF6318 de *F. equiseti* que codifica la proteasa Fe_RF6318

El ADN genómico de *F. equiseti* se digirió con varias enzimas de restricción para el análisis de transferencia Southern. La hibridación se llevó a cabo con el fragmento EcoRI de 884 kb que incluye la SEC. ID. nº:9, cortado del plásmido pALK2521 como sonda (ejemplo 3c). La sonda anterior se marcó con digoxigenina según las instrucciones del proveedor (Roche, Alemania). La hibridación se realizó durante la noche a 65°C. Tras la hibridación, los filtros se lavaron 2 x 5 min a temperatura ambiente utilizando 2 x SSC-SDS al 0,1% seguido por 2 x 15 min a 65°C utilizando 0,1 x SSC-SDS al 0,1%.

Pudieron detectarse varios fragmentos de hibridación en los productos de la digestión de ADN genómico de *F. equiseti*. Los productos de digestión de *MunI* y *BglII* genómicos contenían fragmentos de hibridación de tamaños aproximados de 4,2 kb y 3,2 kb, respectivamente. Los tamaños de los fragmentos de hibridación individuales eran lo suficientemente grandes como para contener el gen completo que codifica la proteína Fe_RF6318 según los cálculos basándose en las secuencias de proteasa fúngica publicadas. Se aislaron fragmentos de ADN genómico de los productos de digestión de *MunI* y *BglII* genómicos de RF6318 del intervalo de tamaño del fragmento de hibridación (aproximadamente 4 kb para la digestión de *MunI* y aproximadamente 3 kb para la digestión de *BglII*). Los fragmentos genómicos se aislaron en gel de agarosa y se clonaron a vectores pBluescript II KS+ (Stratagene, USA) escindidos con EcoRI y BamHI. Las mezclas de ligadura se transformaron en células XL10-Gold de *Escherichia coli* (Stratagene) y se sembraron en placas en medio LB (Luria-Bertani) que contenían 50-100 µg/ml de ampicilina. Se detectaron los clones positivos en las colonias de *E. coli* utilizando hibridación colonial con la inserción pALK2521 como sonda. La hibridación se realizó como se describió para los productos de digestión de ADN genómico RF6318. Se recogieron de las placas cuatro clones *BglII* positivos y ocho *MunI* positivos. Se demostró por digestión de restricción que contenían inserciones de tamaños esperados. La inserción del fragmento *MunI* ligado al vector BamHI se cortó con doble digestión de PstI-SalI. La inserción del fragmento *BglII* ligado al vector EcoRI se cortó con doble digestión de PstI-NotI. Una transferencia Southern se realizó en inserciones de los clones recogidos (hibridación por transferencia Southern a 68°C y se lavó 2 x 5 min a T.A. utilizando 2 x SSC-SDS al 0,1% seguido de 2 x 15 min a 68°C utilizando 0,1 x SSC-SDS al 0,1%). Tres de los clones *BglII* recogidos y seis de los clones *MunI* recogidos contenían el fragmento de hibridación en la transferencia Southern. El gen completo que codifica la proteasa Fe_RF6318 (SEC. ID. nº:10) se secuenció a partir de la inserción *BglII* de 3,2 kb y el plásmido que contiene esta inserción se denominó pALK2529. La cepa RF7800 de *E. coli* que incluye el plásmido pALK2529 se depositó en la colección DSM con el número de registro DSM 22172. El gen que codifica la proteína Fe_RF6318 se denominó *Fe prtS8A*.

(e) Caracterización del gen que codifica la proteasa Fe_RF6318 y la secuencia de aminoácidos deducida

La secuencia *Fe prtS8A* (SEC. ID. nº:10) y la secuencia de aminoácidos deducida (SEC. ID. nº:11) se muestran en la figura 1A-B. La longitud del gen es de 1303 pb (incluyendo el codón de terminación). Un supuesto intrón se encontró que tiene la longitud de 64 pb (secuencias de los bordes 5' y 3' según las de los intrones de hongos, según Gurr *et al* (1987). La secuencia de la proteína deducida (SEC. ID. nº 11) consta de 412 aminoácidos incluyendo una secuencia señal prevista de 20 aminoácidos (SignalP V3.0.; Nielsen *et al*, 1997 y Nielsen y Krogh, 1998). Todo el péptido nº 3792 del terminal N (también la parte del terminal N no incluida en el secuencia de la sonda) se incluyó en la secuencia de aminoácidos deducida. La masa molecular predicha era 29141,09 Da para el polipéptido maduro y la pI predicha era 9,30. Estas predicciones se hicieron utilizando la herramienta Compute pI/MW en el servidor ExPASy (Gasteiger *et al.*, 2003). La secuencia de aminoácidos deducida contenía dos posibles sitios de N-glicosilación en las posiciones de los aminoácidos Asn77 y Asn255 (figura 1), pero según CBS Server NetNGlyc V1.0 sólo es probable el sitio en la posición Asn77 (ubicado en la secuencia pro).

(f) Estudios de homología, identidad y alineación

Se buscaron las homologías con las secuencias de la proteasa publicadas utilizando el programa BLASTX versión 2.2.9 en NCBI (National Center for Biotechnology Information) con ajustes por defecto (Altschul *et al.*, 1990). Los mayores homologías eran con una hipotética proteína de *Gibberella zeae* (*Fusarium graminearum*) (EMBL número de registro XP_383491) y serina endopeptidasa de *Trichoderma harzianum* (*Hypocrea lixii*) (EMBL número de registro CAL25508). También se halló homología con una secuencia incluida en la solicitud de patente US 60/818.910 (Catalist Bioscience Inc.) como SEC. ID. nº:313. La secuencia Fe_RF6318 se alineó con las secuencias homólogas anteriores. Los valores de identidad obtenidos utilizando la alineación ClustalW (www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw, Matriz: BLOSUM, hueco abierto: 10, ampliación del hueco: 0,5) se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3.

Valores de identidad (%) obtenidos a partir de la alineación ClustalW de las secuencias deducidas de aminoácidos de proteasa. Se alinearon las secuencias de aminoácidos maduros excluyendo los péptidos y propéptidos señal. Matriz: BLOSUM, hueco abierto: 10, extensión del hueco: 0,5, EMBL_EBI. *G. zeae*, XP_383491; *T. harzianum* CAL25508: documento US 60/818.910, SEC. ID. nº 313 en la aplicación.

	Fe_RF6318	<i>G. zeae</i>	<i>T. harzianum</i>	US 60/818.910
Fe_RF6318	100	85	75	74
<i>G. zeae</i>		100	78	76
<i>T. harzianum</i>			100	94
US 60/818.910				100

Ejemplo 4. Producción de la proteasa Fe_RF6318 recombinante en *Trichoderma reesei*

(a) Preparación del vector (anfitrión) de producción

Se construyó el plásmido de expresión pALK2533 para la producción de la proteasa Fe_RF6318 recombinante en *Trichoderma reesei*. El gen *Fe prtS8A* con su propia secuencia señal se fusionó exactamente al activador *cbh1* (*cel7A*) en *T. reesei* por RCP. *Bam*HI (una zona creada después de codón de terminación en la RCP) escindió el fragmento del gen *Fe prtS8A* a partir de su extremo 3'. Esto no deja ningún terminador *Fe prtS8A* original en el montaje antes de la secuencia del terminador de *cbh1*. Un gen marcador *amdS* se añadió al montaje que incluye el activador *cbh1* y el terminador *cbh1*. El montaje es análogo al descrito en Paloheimo *et al.* (2003) y la casete de expresión lineal de 8,7 kb se presenta en la Figura 2. La casete de expresión se aisló del eje central del vector después de la digestión con *Eco*RI y se utilizó para transformar protoplastos de *T. reesei*. La cepa anfitriona utilizada no produce ninguno de los cuatro celulasas de *T. reesei* principales (CBHI, CBHII, EGI, EGII). Las transformaciones se realizaron como en Penttilä *et al.* (1987) con las modificaciones descritas en Karhunen *et al.* (1993). Los transformantes se purificaron en placas de selección mediante un solo conidio antes de esporularles en DP.

(b) Producción de proteasa en matraces en agitación y el biorreactor a escala de laboratorio

Los transformantes se inocularon en los cultivos inclinados de DP a matraces en agitación que contenían 50 ml de medio inductor complejo de celulasa a base de lactosa (Joutsjoki *et al.*, 1993) tamponado con 5% de KH_2PO_4 a pH 6,0. La producción de proteasa de los transformantes se analizó en los sobrenadantes del cultivo después de cultivarles durante 7 días a 30°C, 250 rpm. En los geles de SDS-PAGE, se detectó una banda principal de proteína de aproximadamente 29 kDa correspondiente a proteasa Fe_RF6318 recombinante en los sobrenadantes del cultivo gastado. Se ensayó la actividad de la proteasa utilizando caseína como sustrato como se describe en los ejemplos 1c o 4c. Unas actividades claramente aumentadas en comparación con las del anfitrión se midieron en los sobrenadantes del cultivo. La integración de la casete de expresión en los genomas de hongos se confirmó a partir de los transformantes seleccionados utilizando análisis de transferencia Southern en el que varios productos de digestión genómicos se incluyeron y la casete de expresión se utilizó como sonda.

El transformante de *T. reesei* que producen las mejores actividades de proteasa en los cultivos en matraz en agitación se seleccionaron para ser cultivo en biorreactores a escala de laboratorio. Se utilizó en los cultivos medio complejo que produce celulasa. El medio de cultivo gastado obtenido de los cultivos se utilizó en pruebas de aplicación (ejemplos 6-11) y como material de partida para la purificación y la caracterización adicional de la proteasa Fe_RF6318 recombinante.

Ejemplo 5. Purificación y caracterización de la proteasa recombinante Fe_RF6318

Las células y los sólidos se retiraron del medio de cultivo gastado procedente de la fermentación (ejemplo 4) por centrifugación durante 30 min, 50.000 g a +4°C (Sorvall RC6 plus). Se utilizaron 15 ml del sobrenadante para la

purificación de la proteasa. Todos los pasos de purificación se llevaron a cabo en la cámara fría. Después de la centrifugación, la muestra se filtró a través de filtro de 0,44 μm (MILLEX HV Millipore) aplicando antes a la columna de desalado HiPrep 26/10 (de GE Healthcare) equilibrada en Tris 20 mM, pH 8,8. La muestra filtrada en gel se aplicó a una columna de 20 ml Q Sepharose FF (de GE Healthcare) equilibrada en Tris 20 mM, pH 8,8. La fracción de flujo a través se recogió y se analizó en gel de SDS-PAGE al 12% (Fig. 3). Esta muestra de enzima se utilizó para la caracterización de pH y perfiles de temperatura.

Perfil de Temperatura

El perfil de temperatura se obtuvo para proteasa Fe_RF6318 a pH 9 utilizando el ensayo descrito en el ejemplo 1c o 14, utilizando un tiempo de reacción de 15 min. El resultado se muestra en la Fig. 4A. La proteasa tiene una temperatura óptima alrededor de 60°C.

Perfil de pH

El perfil de pH de la proteasa se determinó a 50°C utilizando caseína como sustrato según se describe en el ejemplo 1c o 14. El pH de la reacción se ajustó a pH 6-12 utilizando tampón Britton-Robinson 40 mM, y el tiempo de reacción fue de 15 min. Las reacciones enzimáticas se interrumpieron utilizando una solución de TCA 0,11 M que contenía acetato sódico 0,22 M y ácido acético 0,33 M. Los resultados se muestran en la Fig. 4B. La proteasa Fe_RF6318 recombinante presenta más del 60% de actividad relativa desde pH 6 a pH 10 con una actividad óptima alrededor de pH 10. El perfil de pH de la proteasa Fe_RF6318 recombinante purificada correspondió al perfil de pH de la proteasa Fe_RF6318 natural purificada como se ha descrito en el ejemplo 1a.

Ejemplo 6. Eficacia de la proteasa Fe_RF6318 recombinante en tampón de pH 9 a diferentes temperaturas

Se probó la capacidad del preparado de proteína Fe_RF6318 recombinante producido en *Trichoderma* (como se describe en el ejemplo 4) para eliminar manchas típicas de sangre/leche/tinta (Art. 116, 100% algodón, EMPA Testmaterialen AG, Suiza) a temperaturas de 30°C y 50°C. Los preparados comerciales de proteasa Savinase® Ultra 16 L (Novozymes) y Purafect® 4000L (Genencor International) y el tratamiento sin enzima (de referencia) se utilizaron para comparación. La tela manchada se cortó en primer lugar en muestras de 1,5 cm x 1,5 cm y las piezas se redondearon cortando las esquinas. Las piezas se colocaron en pocillos de placas de microvaloración (Nunc 150200). En cada pocillo que tiene un diámetro de 2 cm, se añadió 1,5 ml de dilución enzimática en tampón de pH 9 Glicina-NaOH en la parte superior de la tela. Se dosificaron 0, 0,2, 0,4, 0,8, 1,6, 4, y 8 unidades de actividad (μmol de tirosina/min) de cada enzima por 1,5 ml de tampón. Se midió la actividad utilizando un tiempo de reacción de 30 min. Como se describe en los ejemplos 1(c) o 14 empleando un tiempo de 10 min. para el desarrollo del color después de la adición de reactivo de Folin diluido. Las placas de microvaloración con muestras se incubaron en un agitador horizontal a 30°C y 50°C durante 60 min. con 125 rpm. Una vez enjuagadas las muestras cuidadosamente con agua corriente (aproximadamente 45°C) y secadas durante la noche al aire del interior, en una cuadrícula, se protegieron de la luz del día.

Se evaluó el efecto de eliminación de las manchas midiendo el color como valores de reflectancia en espectrofotómetro Minolta CM 2500 utilizando las coordenadas espaciales de color $L^*a^*b^*$ (iluminador D65/2°). Después del tratamiento se midió el color de ambas caras de las muestras. Cada valor era el promedio de por lo menos 2 muestras de tela en paralelo medidas en ambas caras de la tela. La decoloración de las manchas de sangre/leche/tinta indicador de la eficacia de la proteasa (eficiencia en la eliminación de manchas) se calculó como ΔL^* , que significa valor de luminosidad L^* de la tela tratada con enzima menos valor de luminosidad L^* de la tela tratada con solución de lavado (tampón) sin enzima (blanco enzimático, de referencia).

Los resultados se muestran en las figuras 5 y 6. El preparado de proteasa Fe_RF6318 mostró una capacidad de eliminación de manchas considerablemente superior a 50°C, y en especial a 30°C en tampón de pH 9 en comparación con los preparados comerciales de proteasa Savinase® Ultra 16L y Purafect® 4000L.

Ejemplo 7. Eficacia de proteína Fe_RF6318 recombinante con detergente en polvo a 40°C/50°C y pH 10

Se probó la capacidad del preparado de proteína Fe_RF6318 recombinante producido en *Trichoderma* (como se describe en el ejemplo 4) para quitar manchas típicas de sangre/leche/tinta en presencia de fosfato que contiene el detergente de referencia con y sin agente de blanqueo a 40°C y 50°C (pH aproximadamente 10). Se utilizó como material de prueba el art. 117 con manchas típicas (sangre/leche/tinta, poliéster + algodón, EMPA). Se utilizaron para comparación proteasa comercial Purafect® 4000L y tratamiento sin enzima (referencia). Se dosificaron 0, 0,2, 0,4, 0,8, 1,6, 4 y 8 unidades de actividad (μmol de tirosina/min) de cada enzima por ml de solución de lavado. La actividad se midió como se describe en el ejemplo 6.

Una cantidad de 3,3 g de fosfato que contiene detergente de referencia ECE 77 sin abrillantador óptico (Art. 601, EMPA) se disolvió en 1 litro de agua del grifo (agua, $\text{dH} \leq 4$), se mezclaron bien con un agitador magnético y se templó a 40°C/50°C. La tela manchada se cortó en piezas como se ha descrito en el ejemplo 6. Las muestras se colocaron en los pocillos de placas de microvaloración (Nunc 150200) y se añadieron 1,5 ml de solución de lavado

que contiene detergente y dilución de la enzima en agua (inferior a 60 µl) en la parte superior de la tela. Las placas con las muestras se incubaron en agitador horizontal a 40°C/50°C durante 60 min. con 125 rpm. Una vez enjuagadas las muestras cuidadosamente a fondo con agua corriente (aproximadamente 45°C) y secadas durante la noche con aire del interior, en una cuadrícula, se protegieron de la luz diurna. Se realizó otra serie de pruebas de la misma manera, salvo que se añadió, además de detergente, 0,81 g de perborato de sodio tetrahidratado (Art. 604, EMPA) y 0,16 g de activador de blanqueo TAED tetraacetiletilendiamina (Art. 606, EMPA).

El color de las muestras después del tratamiento se midió con espectrofotómetro Minolta CM 2500 utilizando las coordenadas espaciales de color L*a*b* y el efecto de eliminación de manchas calculado como ΔL^* como se ha descrito en el ejemplo 6.

Los resultados mostrados en las figuras 7A, 7 B, 8 A y 8 B, demostraron que la proteasa Fe_RF6318 también es adecuada para los detergentes en polvo en condiciones muy alcalinas y su resistencia para agentes de blanqueo era ligeramente superior que con la proteasa comercial Purafect® 4000L.

Ejemplo 8. Eficacia de la proteína Fe_RF6318 recombinante con detergente líquido a 40°C

Se probó la capacidad del preparado de proteína Fe_RF6318 recombinante producido en *Trichoderma* (como se describe en el ejemplo 4) para quitar manchas típicas de sangre/leche/tinta en presencia de detergente líquido Ariel Sensitive (Procter & Gamble, Inglaterra), que no contiene enzimas, a 40°C y pH aproximadamente 7,9. Como material de ensayo se utilizó el Art.117 tela de prueba artificialmente sucia con manchas típicas (sangre/leche/tinta, poliéster + algodón, EMPA). Se utilizaron para comparación preparados comerciales de proteasa Purafect® 4000L, Savinase® Ultra 16 L y el tratamiento sin enzimas (de referencia). Se dosificaron 0, 0,2, 0,4, 0,8, 1,6, 4 y 8 unidades de actividad (µmol de tirosina/min) de cada enzima por ml de solución de lavado. La actividad se midió como se describe en el ejemplo 6.

Se disolvió una cantidad de 3,3 g de Ariel Sensitive en 1 litro de agua del grifo (dH ≤ 4), se mezcló bien con agitador magnético y se templó a 40°C. La tela con manchas se cortó en piezas como se describe en el ejemplo 6. Se colocaron muestras en los pocillos de placas de microvaloración (Nunc 150200) y en la parte superior de la tela se añadieron 1,5 ml de solución de lavado que contiene detergente y dilución enzimática en agua (inferior a 60 l). Las placas con las muestras se incubaron en un agitador horizontal a 40°C durante 60 min a 125 rpm. Una vez enjuagadas las muestras cuidadosamente con agua corriente (aproximadamente 45°C) y secadas durante la noche al aire del interior, en una cuadrícula, se protegieron de la luz diurna.

El color de las muestras después del tratamiento se midió con un espectrofotómetro Minolta CM 2500 utilizando las coordenadas espaciales de color L*a*b* y se calculó el efecto de eliminación de manchas como ΔL^* como se describe en el ejemplo 6.

Basándose en los resultados mostrados en la figura 9 la proteasa Fe_RF6318 tiene una excelente eficacia con un detergente líquido a 40°C. La eficacia de Fe_RF6318 en manchas de sangre/leche/tinta (poliéster + algodón) era considerablemente mayor en comparación con los preparados comerciales Purafect® 4000L y Savinase® Ultra 14 L, cuando se dosificaba la misma cantidad de actividad de proteasa. La dosis de 4 a 8 unidades de enzimas comerciales por ml de solución de lavado era igual a la dosis de alrededor de 0,2 a 0,5% de preparado enzimático por peso de detergente, que es un nivel de utilización típico de enzimas detergentes.

Ejemplo 9. Eficacia de la proteína Fe_RF6318 recombinante con diferentes concentraciones de líquido detergente a 30°C.

Se probó la capacidad del preparado de proteína Fe_RF6318 recombinante producido en *Trichoderma* (como se ha descrito en el ejemplo 4) para quitar manchas típicas de sangre/leche/tinta con detergente líquido a concentraciones de 1 a 5 g/l a 30°C. Se utilizaron como detergentes Ariel Sensitive (Procter & Gamble, Inglaterra) que no contiene enzimas y detergente líquido principal para tejido de color que contiene 25% de sustancias activas de lavado, poliol y polímeros (Tabla 4) y el Art. 117 con manchas típicas (sangre/leche/tinta, algodón + poliéster, EMPA) se utilizó como material de prueba. Se utilizaron para la comparación preparados comerciales de proteasa Purafect® 4000L, Savinase® Ultra 16 L y el tratamiento sin enzima (de referencia). Se dosificaron 0, 0,2, 0,4, 0,8, 1,6, 4 y 8 unidades de actividad de cada enzima (µmol de tirosina/min) por ml de solución de lavado. La actividad se midió como se describe en el ejemplo 6.

Tabla 4. Composición de detergente líquido principal para tejidos de color

Ingredientes	%
NaLES (lauril éter sulfato sódico)	4,9
C12-15 7EO no iónico (óxido de etileno)	15
Jabón-Na (FA de nuez de palma)	4,4
Glucósido de coco	1

Ingredientes	%
<Tensiactivo total>	<25,30>
Poliol (Glicerina)	5
Fosfonato (32%) ThermPhos)	2
PVP-Sokalan HP 53 (BASF)	1
Sokalan partícula 15 (BASF)	1,56
Sorez-100 (ISP)	0,4
Agua hasta 100%	

Se disolvieron las cantidades de 1, 3,3 y 5 g de detergente líquido en 1 litro de agua del grifo ($\text{dH} \leq 4$), se mezclaron bien con un agitador magnético y se templó a 30°C. El pH en las soluciones de lavado fue aproximadamente 7,3 a 7,5 con detergente principal o aproximadamente 7,6-8,0 con Ariel, dependiendo de la concentración de detergente.

La tela con manchas se cortó en piezas como se describe en el ejemplo 6. Las muestras se colocaron en pocillos de placas de microvaloración (Nunc 150200) y 1,5 ml de solución de lavado que contiene detergente y dilución enzimática en agua (inferior a 60 μl) se añadieron en la parte superior de la tela. Las placas con las muestras se incubaron en un agitador horizontal a 30°C durante 60 min a 125 rpm. Una vez enjuagadas las muestras a fondo con cuidado/bien con agua corriente caliente, y secadas durante la noche al aire del interior, en una cuadrícula, se protegieron de la luz diurna.

El color de las muestras después del tratamiento se midió con un espectrofotómetro Minolta CM 2500 utilizando las coordenadas espaciales de color $L^*a^*b^*$ y el efecto de eliminación de manchas se calculó como ΔL^* como se ha descrito en el ejemplo 6.

Los resultados obtenidos con un detergente principal para las telas de color se muestran en las figuras 10 A-D y los resultados obtenidos con Ariel Sensitive se muestran en las figuras 11 A-D. La eficiencia de Fe_RF6318 en manchas de sangre/leche/tinta era considerablemente mayor en comparación con los preparados comerciales Purafect® 4000L y Savinase® Ultra 14 L con ambos detergentes y a todas las concentraciones de detergente, cuando se dosificó la misma cantidad de actividad. Además, si la dosificación se calcula en cantidad de proteína añadida (figuras 10B y 11B), la eficiencia de eliminación de manchas es más alta con Fe_RF6318. La cantidad de proteína a partir de los preparados enzimáticos se determinó mediante el ensayo de proteínas Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) utilizando gammaglobulina bovina (Bio-Rad) como patrón. Los resultados de estas pruebas indican que la proteasa Fe_RF6318 tiene una excelente eficacia con detergentes líquidos a bajas temperaturas, como 30°C.

Ejemplo 10. Eficiencia de la proteína Fe_RF6318 recombinante en diferentes manchas con detergentes líquidos a 30°C. (Launder Ometer)

Se probó la capacidad del preparado de proteína Fe_RF6318 recombinante producido en *Trichoderma* (como se ha descrito en el ejemplo 4) para quitar diferentes manchas con un detergente líquido a 30°C, y se comparó con los preparados comerciales de proteasa Purafect® 4000L y/o Savinase® Ultra 16 L. Se utilizaron las telas de ensayo artificialmente sucias de EMPA: sangre/leche/tinta (Art. 117, poliéster + algodón), sangre/leche/tinta (Art. 116, algodón), hierba (Art. 164, algodón) y cacao (Art. 112, algodón). La tela se cortó en muestras de 9 cm $\times$ 12 cm y los bordes se arreglaron con puntos de sutura en zig-zag. Se llevaron a cabo dos series de pruebas: en primer lugar con Ariel Sensitive sin enzimas y en segundo lugar más tarde con un detergente líquido principal para telas de color (ejemplo 8). Diferentes lotes de manchas se utilizaron en los dos experimentos anteriores.

Se realizaron tratamientos para eliminación de manchas en LP-2 Launder Ometer de la forma siguiente. Se precalienta en primer lugar Launder Ometer a 30°C. Se añadieron 450 ml de solución de lavado templada que contiene 5 g de detergente por litro de agua del grifo ($\text{dH} \leq 4$) y dilución enzimática en recipientes que contienen manchas Art. 116 y Art. 117 o manchas Art. 164 y Art. 112. Cada enzima se dosificó 0, 2, 5, 10, y en algunas pruebas 20 o 30 unidades de actividad (μmol de tirosina/min) por ml de solución de lavado. La actividad se midió como se describe en el ejemplo 6. El Launder Ometer se realizó a 30°C durante 60 mm y un pH de aproximadamente 7,5 (detergente principal) u 8 (Ariel). Una vez enjuagadas las muestras cuidadosamente con agua corriente (aproximadamente 20°C) y secadas durante la noche en el aire interior, en una cuadrícula, se protegieron de la luz diurna.

El color de las muestras después del tratamiento se midió con el espectrofotómetro Minolta CM 2500 utilizando las coordenadas espaciales de color $L^*a^*b^*$ y el efecto de eliminación de manchas se calculó como ΔL^* como se describe en el ejemplo 6. El color de ambas caras de las muestras se midió después del tratamiento. Cada valor era el promedio de por lo menos 20 mediciones por muestra. Se evitaron las mediciones de áreas con marcas de arrugas formadas durante el tratamiento debido al plegado de la tela (en las manchas en algodón Art. 116 y Art. 112).

Los resultados obtenidos con Ariel® Sensitive (Fig. 12 AC) muestran que la eficiencia en las manchas de sangre/leche/tinta y de hierba fue considerablemente mayor con Fe_RF6318 en comparación preparación comercial Savinase® 16L Ultra a 30°C cuando se administró la misma cantidad de actividad de proteasa. Además los

resultados obtenidos con la mancha de cacao fueron mejores con Fe_RF6318 (datos no mostrados).

También los resultados obtenidos con un detergente principal (5 g/l) para los tejidos de color (Fig. 13 A-D) demostró que la eficiencia en manchas de sangre/leche/tinta, hierba y cacao fue considerablemente mayor con Fe_RF6318 en comparación con los preparados comerciales Savinase® Ultra 16L y Purafect® 4000L a 30°C, cuando se administró la misma cantidad de actividad de proteasa. La dosis de 10 unidades de enzimas comerciales por ml de solución era igual a la dosis de aproximadamente 0,4% del preparado enzimático por peso de detergente, que es en el nivel de utilización típico de enzimas detergentes. Los resultados de estas pruebas indican que la proteasa Fe_RF6318 es eficiente en varias manchas a bajas temperaturas como 30°C.

Ejemplo 11. Evaluación de la eficacia de la proteína Fe_RF6318 recombinante en detergente líquido para lavandería en ensayos en gran escala a 30°C

La eficacia del preparado de la proteína Fe_RF6318 recombinante producido en *Trichoderma* (ejemplo 4) se probó en detergente líquido en gran escala en una máquina de lavado a 30°C y se comparó con preparados comerciales de proteasas Purafect® 4000L y Savinase® Ultra 16L y el tratamiento con detergente sin enzima. Se utilizaron detergente líquido principal para tejidos de color, como se ha descrito en el ejemplo 9, y 8 trazadores diferentes sensibles a proteasa (Tabla 5). Además dos piezas de suciedad de deslastre (CFT-SBL) por lavado se colocaron en el lavado limpio para evitar la contaminación por el contacto con las demás muestras. Los trazadores procedían del CFT (Center of Testmaterials BV, Holanda). Unas muestras de manchas 10 cm × 10 cm se cosieron a los trapos de cocina. Los parámetros y condiciones del proceso se describen en la Tabla 6. Las dosis de enzimas utilizadas en los ensayos se calcularon ambas como actividades enzimáticas (aproximadamente 0-14 unidades de actividad por ml de solución de lavado) y como cantidad de proteína (aproximadamente 0-2,2 mg por litro de solución de lavado). Las actividades de la proteasa y los contenidos de proteína de los preparados se midieron como se ha descrito en los ejemplos 6 y 9.

Tabla 5. Trazadores sensibles a la proteasa utilizados en la prueba.

nº	Monitor/Muestra	Sustrato
1	CFT/CS-01-106	Sangre (envejecida)/Algodón
2	CFT/C-03-030	Chocolate/leche/pigmento/algodón
3	CFT/C-05-059b	Sangre/leche/tinta/algodón
4	CFT/PC-05-014	Sangre/leche/tinta/PE-algodón
5	CFT/CS-08-069	Hierba/algodón
6	CFT/C-10-186b	Aceite de cacahuete/leche/algodón
7	CFT/CS-25-016	Espinacas/algodón
8	CFT/CS-38-010	Yema de huevo/pigmento/algodón

Tabla 6. Parámetros y condiciones del proceso

Máquina	Miele N-Tronic Frontstar
Programa	Programa corto, 30°C
Dureza del agua	aproximadamente 11,2º dH con 13 litros de consumo
Carga de lastre	2,5 kg de sábanas de cama/toallas de baño y trapos de cocina
Dosis de detergente	80 g / carga de máquina
Cantidad de cada trazador	2 tiras con manchas 10 cm x 10 cm por máquina
Número de lavados	2

La evaluación del efecto de eliminación de manchas se basó en la medición de la reflectancia (R 457 nm) con espectrofotómetro Datacolor con un filtro UV y se calculó como efecto porcentual de eliminación de manchas (% SR):

$$\% \text{ SR} = \frac{\text{Reflectancia después del lavado} - \text{Reflectancia antes del lavado} \times 100\%}{\text{Reflectancia de la tela sin manchas} - \text{Reflectancia antes del lavado}}$$

Los resultados se calcularon como %Δ SR (% de delta SR), lo que significa % de SR de tela tratada con enzima menos % SR de tratamiento sin enzima (sólo detergente).

Dos lavados que contienen dos muestras de cada mancha se realizaron con cada dosis de enzima y se hicieron tres mediciones de cada muestra de mancha, por lo que los valores se basan en las 12 mediciones por mancha por producto.

Los resultados de las eficiencias totales de eliminación de la suciedad (% de delta de SR) se muestran en las figuras 14A-B y en las figuras 15A-E. El efecto total de la eliminación de manchas sobre la base de la suma de los resultados obtenidos con los ocho manchas diferentes sensibles a la proteasa (Manchas 1 a 8, tabla fue mayor con

Fe_RF6318 en comparación con los preparados comerciales de proteasas Purafect® 4000L y Savinase® Ultra 16L, cuando las proteasas se dosificaron como cantidad de actividad y como proteína por volumen de solución de lavado (figuras 14A-B). Fe_RF6318 fue eficiente, sobre todo en las manchas de sangre/leche/tinta, chocolate/leche, aceite de cacahuete/leche y yema de huevo (figuras 15A-E).

Se utilizó como referencia un trazador general de detergencia (pigmento/aceite) en repeticiones en diferentes máquinas. No se observaron diferencias entre las diversas pruebas.

Ejemplo 12. Eficacia de la proteína Fe_RF6318 recombinante en tampón de pH 9 a temperaturas de 10°C a 60°C.

Se probó la capacidad de la proteína Fe_RF6318 recombinante producida en *Trichoderma* (como se ha descrito en el ejemplo 4) para quitar manchas típicas de sangre/leche/tinta (Art. 117, poliéster + algodón, EMPA Testmaterialen AG, Suiza) a temperaturas de 10 a 60°C. Se utilizaron para comparación preparados comerciales de proteasa Savinase® Ultra 16 L, Purafect® 4000 L y Properase® 4000 E y el tratamiento sin enzima (de referencia). Las pruebas se realizaron en tampón de pH 9 como se ha descrito en el ejemplo 6, excepto que el intervalo de temperatura de incubación fue más amplio, el material de la mancha fue diferente y la temperatura del agua de lavado de las muestras fue similar a la temperatura de lavado. El color de las muestras después del tratamiento se midió con espectrofotómetro Minolta CM 2500 utilizando las coordenadas espaciales de color L*a*b* y el efecto de eliminación de manchas se calculó como ΔL^* como se describió en el ejemplo 6.

Los resultados se muestran en las figuras 16A-F. El preparado de proteasa Fe_RF6318 mostró mayor capacidad de eliminación de manchas en todo el intervalo de temperatura de 10°C a 60°C en tampón de pH 9, en comparación con los preparados comerciales de proteasa Savinase® Ultra 16L y Purafect® 4000L. También mostró mayor capacidad de eliminación de manchas en el intervalo de 30°C a 60°C en comparación con Properase® 4000E.

Ejemplo 13. Eficacia de la proteína Fe_RF6318 recombinante con detergente líquido a temperaturas de 10°C y 20°C de lavado en frío

Se probó la capacidad de la proteína Fe_RF6318 recombinante producida en *Trichoderma* (como se ha descrito en el ejemplo 2) para quitar manchas típicas de sangre/leche/tinta (Art. 117, algodón + poliéster, EMPA) con detergente líquido principal a bajas temperaturas. El método de ensayo fue similar al del ejemplo 9, excepto sólo que se utilizaron la concentración de detergente de 3,3 g/l, y menores temperaturas de incubación, 10°C y 20°C. La temperatura del agua de enjuague de las muestras fue similar a la temperatura de lavado.

El color de las muestras después del tratamiento se midió con espectrofotómetro Minolta CM 2500 utilizando las coordenadas espaciales de color L*a*b* y el efecto de eliminación de manchas se calculó como ΔL^* como se describe en el ejemplo 6. Para el tratamiento sin enzima (blanco enzimático), se utilizó solución de lavado como solución de detergente.

Los resultados obtenidos con la concentración de detergente líquido principal de 3,3 g/l a 10°C y 20°C se muestran en las figuras 17A y B. La eficacia de Fe_RF6318 en manchas de sangre/leche/tinta fue considerablemente mayor tanto a 10°C como a 20°C en comparación con los preparados comerciales Savinase® Ultra 16L, Purafect® 4000L y Properase® 4000E, cuando se administraba la misma cantidad de actividad. Los resultados de estas pruebas indican que la proteasa Fe_RF6318 tiene un excelente rendimiento con detergentes líquidos a muy bajas temperaturas de lavado.

Ejemplo 14. Ensayo II de actividad de proteasas

La actividad de proteasa se ensayó por el método de Folin-Ciocalteu con caseína utilizando caseína como sustrato. La velocidad de degradación de la caseína por una proteasa se midió por seguimiento espectrofotométrico de la liberación de fragmentos solubles en ácido en función del tiempo. El sustrato de caseína, utilizado en el ensayo se preparó de la forma siguiente: se disolvieron 6 g de caseína Hammerstein calidad MP Biomedicals, LLC (101289) en 500 ml de Tris 30 mM, CaCl₂ 2,0 mM, MgCl₂ 0,7 mM, NaHCO₃ 2,5 mM. El pH de la solución de sustrato se ajustó a 8,5 con HCl. Las reacciones enzimáticas se interrumpieron utilizando solución de TCA 0,11 M. El reactivo de Folin utilizado en el ensayo se preparó diluyendo 25 ml de reactivo de fenol de Folin-Ciocalteu 2 N (SIGMA, F 9252) a 100 ml con agua destilada. La reacción se inició en primer lugar incubando 2,5 ml de solución del sustrato durante 5 min a 50°C, tras lo cual se añadieron 0,5 ml de solución enzimática y la reacción se llevó a cabo durante 30 min. Después de 30 min. de reacción se añadieron 2,5 ml de solución de interrupción de la reacción, se mezclaron los contenidos y se dejaron reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los tubos se centrifugaron a 4000 rpm durante 10 minutos (Hettich Rotanta 460). Se mezcló 1 ml de sobrenadante claro con 2,5 ml de Na₂CO₃ 0,5 M y 0,5 ml de reactivo de Folin diluido. Después de esperar durante 5 min. (desarrollo del color) se midió la absorbancia de la mezcla (color) a 660 nm frente a un blanco enzimático. El blanco enzimático se preparó de la forma siguiente: 0,5 ml de solución enzimática se mezclaron con 2,5 ml de solución de interrupción y 2,5 ml de sustrato, y la mezcla se incubó durante 30 min a 50°C. Una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima que libera el producto de la hidrólisis de proteínas soluble en ácido correspondiente a 1 µg de tirosina por ml (o g) de la

mezcla de reacción por min.

Referencias

- 5 Altschul SF, W Gish, W Miller, EW Myers and DJ Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol. 215:403-410.
- AMFEP, 2007. Association of Manufacturers and Formulators of Enzyme products, List of commercial enzymes at <http://www.amfep.org/list.html> (updated 30 November 2007).
- 10 Anwar, A and M Saleemuddin. 1998. Alkaline proteases: A review. Bioresource Technology 64:175-183.
- Bolton, ET and BJ McCarthy. 1962. A general method for the isolation of RNA complementary to ADN. Proc. Nat. Acad. Sci.USA 48:1390-1397.
- 15 Chen, Y-J, and M Inouye, 2008. The intramolecular chaperone-mediated protein folding. Curr. Opin. Struct. Biol. 18: 765-770.
- Cherry, J. R., and Fidantsef, A. L. 2003. Directed evolution of industrial enzymes: an update. Curr. Opin. Biotechnol. 14: 438-443.
- 20 Edman P and G Begg. 1967. A protein sequenator. Eur. J. Biochem. 1:80-91.
- Gasteiger, E, A Gattiker, C Hoogland, I Ivanyi, RD Appel and A Bairoch. 2003. ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. Nucleic Acids Res. 31:3784-3788.
- 25 Geremia RA, Goldman GH, Ardiles W, Vila SB, Van Montagu M, Herrera-Estrella A. 1993) Molecular characterization of the proteinase-encoding gene, *prbl*, related to mycoparasitism by *Trichoderma harzianum*. Mol. Microbiol. 8(3):603-613.
- 30 Gupta, R, QK Beg, S Khan and B Chauhan. 2002. An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline protease. Appl. Microbiol. Biotechnol. 60: 381-395.
- Gurr, SJ, Uncles, SE, and Kinghorn JR. 1987. The structure and organization of nuclear genes in filamentous fungi. pp 93-139. In (JR Kinghorn, ed.) Gene Structure in Eukaryotic Microbes. IRL Press, Oxford.
- 35 Joutsjoki, VV, TK Torkkeli, and KMH Nevalainen. 1993. Transformation of *Trichoderma reesei* with the *Hormoconis resinae* glucoamylase P (*gamP*) gene: production of a heterologous glucoamylase by *Trichoderma reesei*. Curr. Genet. 24:223-228.
- 40 Kalisz, HM. 1988. Microbial proteinases. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 36:1-65. Karhunen T, A Mäntylä, KMH Nevalainen, and PL Suominen. 1993. High frequency one-step gene replacement in *Trichoderma reesei*. I. Endoglucanase I overproduction. Mol. Gen. Genet. 241:515-522.
- 45 Laemmli, UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680-685.
- Malardier L, MJ Daboussi, J Julien, F Roussel, C Scazzocchio and Y Brygoo. 1989. Cloning of the nitrate reductase gene (*niaD*) of *Aspergillus nidulans* and its use for transformation of *Fusarium oxysporum*. Gene 78:147-156.
- 50 Maurer, K-H. 2004. Detergent proteases. Curr. Opin. Biotechnol. 15: 330-334.
- Nielsen H, J Engelbrecht, S Brunak and G von Heijne. 1997. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. Protein Engineering 10:1-6.
- 55 Nielsen H and A Krogh. 1998. Prediction of signal peptides and signal anchors by a hidden Markov model. In: Proceedings of the Sixth International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology (ISMB 6), AAAI Press, Menlo Park, California, pp. 122-130.
- 60 Paloheimo M, A Mäntylä, J Kallio, and P Suominen. 2003. High-yield production of a bacterial xylanase in the filamentous fungus *Trichoderma reesei* requires a carrier polypeptide with an intact domain structure. Appl. Env. Microbiol. 69:7073-7082.
- 65 Penttilä M, H Nevalainen, M Rättö, E Salminen, and J Knowles. 1987. A versatile transformation system for the cellulolytic filamentous fungus *Trichoderma reesei*. Gene 61:155-164.

Poutanen, M, L Salusjärvi, L Ruohonen, M Penttilä and N Kalkkinen. 2001. Use of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass mapping and nanospray liquidchromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry sequence tag analysis for high sensitivity identification of yeast proteins separated by two-dimensional gel electrophoresis. Rapid Commun. Mass Spectrom. 15: 1685-1692

Raeder U and P Broda. 1985. Rapid preparation of ADN from filamentous fungi. Lett. Appl. Microbiol. 1:17-20.

Rao, MB, AM Tanksale, MS Ghatge and VV Deshpande. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62:597-635.

Sambrook J and DW Russell. 2001. Molecular cloning, a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, US.

Shevchenko, A, M. Wilm, O. Vorm, M Mann. 1996. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. Anal Chem. 68: 850-858.).

Shimogaki, H, K Takenchi, T. Nishino, M. Ohdera, T. Kudo, K. Ohba, MV Iwama and M Irie. 1991. Purification and properties of a novel surface active agent and alkaline-resistant protease from Bcillus sp. Y. Agric. Biol. Chem. 55:2251-2258.

Suarez MB, Vizcaino JA, Lobell A, and Monte E. 2007. Characterization of genes encoding novel peptidases in the biocontrol Trichoderma harzianum CECT 2413 using the TrichoEST functional genomics approach. Curr. Genet. 51(5):331-342.

Listado de secuencias

<110> AB Enzymes Oy

<120> Nueva proteasa fúngica y utilización de la misma

<130> A9273PC

<150> FI 20095497

<151> 2009-04-30

<160> 15

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 20

<212> PRT

<213> Fusarium equiseti

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> Secuencia de un péptido aminoterminal nº 3792 de la proteasa RF6318 de *Fusarium equiseti*.

<220>

<221> VARIANTE

<222> (18)..(18)

<223> /replace= "Ser"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (18)..(18)

<223> /replace= "Thr"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (18)..(18)

<223> /replace= "Arg"

<400> 1

Ala Leu Thr Thr Gln Ser Asn Ala Pro Trp Gly Leu Ala Ala Ile Ser
1 5 10 15

Arg Cys Thr Pro
20

<210> 2
<211> 10
<212> PRT
<213> Fusarium equiseti

<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> Secuencia de un péptido triptico 1246.673 de la proteasa RF6318 de *Fusarium equiseti*

<400> 2

Thr val Ala Ala Ala Asp Ser Ser Trp Arg
1 5 10

<210> 3
<211> 7
<212> PRT
<213> Fusarium equiseti

<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> Secuencia de un péptido triptico 3341.633 de la proteasa RF6318 de *Fusarium equiseti*

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> xaa puede ser un aminoácido de origen natural

<400> 3

Xaa Thr Tyr Gly val Ala Lys
1 5

<210> 4
<211> 14
<212> PRT
<213> Fusarium equiseti

<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> Secuencia de un péptido triptico 1503.799 de la proteasa RF6318 de *Fusarium equiseti*

<220>
<221> VARIANT
<222> (3)..(3)
<223> /replace= "Ile"

<400> 4

Glu Ala Leu Thr val Gly Ala Thr Thr Ser Ala Asp Ala Lys
1 5 10

<210> 5
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia del cebador oligonucleotídico PRO87 procedente de la SEC. ID. nº:1 del péptido aminoterminal.

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> r e s a o g
 5
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> n e s a, c, g, o t
 10
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> y e s t o c
 15
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 <223> n i s a, c, g, o r t
 20
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (15)..(15)
 <223> n e s a, c, g, o t
 25
 <400> 5 20
 cartcnaayg cncntgggg 20
 30
 <210> 6
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35
 <220>
 <223> Secuencia del fragmento de RCP obtenida utilizando los cebadores PRO88 (SEC. ID. nº:6) y PRO89 (SEC. ID. nº:7) y ADN genómico de RF6318 de *Fusarium equiseti* como plantilla.
 40
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> r e s a o g
 45
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> y e s t o c
 50
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> y e s t o c
 55
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 <223> n e s a, c, g, o t
 60
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (15)..(15)
 <223> n e s a, c, g, o t
 65
 <400> 6
 caragyaayg cncntgggg 20

<210> 7
 <211> 20
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Secuencia del cebador oligonucleotídico PRO89 obtenido a partir de la SEC ID n^o:4 peptídica.

 10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> r e s a o g

 15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> n e s a, c, g, o t

 20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> n i s a, c, g, o r t

 25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 <223> n e s a, c, g, o t

 30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (15)..(15)
 <223> n e s a, c, g, o t

 35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (18)..(18)
 <223> n e s a, c, g, o t

 40 <400> 7

 gcrtcngcng angtngtngc 20

 <210> 8
 45 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 50 <223> Secuencia del cebador oligonucleotídico PRO90 obtenido a partir de la SEC ID n^o:4 peptídica.

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 55 <223> r e s a o g

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 60 <223> n e s a, c, g, o t

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 65 <223> r e s a o g

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 <223> n es a, c, g, o t
 5
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (15)..(15)
 <223> n es a, c, g, o t
 10
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (18)..(18)
 <223> n es a, c, g, o t
 15
 <400> 8
 gcrctngcrc tngtngtngc 20
 20
 <210> 9
 <211> 866
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> Secuencia del fragmento de PCR obtenida utilizando los cebadores PRO88 (SEC ID nº:6) y PRO89 (SEC ID nº:7) y ADN genómico de RF6318 de Fusarium equiseti como una matriz.
 <400> 9
 30
 aaagcaacgc accgtggggt cttgctgcc tctcccgccg aacccccggt ggcagcacct 60
 acacctacga caccactgcc ggtgccggtta cttacggta cgtcgttgac tctggtatca 120
 acaccgcca cactgacttt ggcggccgtg cttctctcgg ttacaacgct gctggtggcg 180
 cccacactga tacccttggc caccgtaccc acgttgctgg taccattgcc tccaacacct 240
 acggtgttgc caagcgtgta agtacaatca taccacacat gagctacaac atgatctgaa 300
 ctttatactt actattatta ggccaacgtc atctctgtca aggttttcgt cggtaaccaa 360
 gcttctacct ctgttatcct tgcgtggttc aactgggctg tcaacgacat cacctccaga 420
 accgtgctag cccgctctgt catcaacatg tctctcgggt gtccctcttc tcagacctgg 480
 gctactgcca tcaacgctgc ctacagccaa ggtgtcctct ccgttggtgc tgccggtaac 540
 ggtgattcca acggtcgtcc tctcccgcc tctggccagt ctcctgcca cgttcccaac 600
 gctatcacgc ttgctgccgc cgactccagc tggcgaactg cctctttcac caactacggt 660
 cctgaggtcg atgtcttcgg tcctgggtgc aacatccagt ccacctggta cacctccaac 720
 agcgtacca acaccatcag cggtacctcc atggcttgcc ctcacgttgc tggctttgct 780
 ctctacctcc aggtctctga gaacctcaat acccctgctg ccgtcaccaa ccgcatcaag 840
 tctcttgcaa ctacctccgc tgacgc 866
 35
 <210> 10
 <211> 1303
 <212> ADN
 <213> Fusarium equiseti
 <220>
 <221> misc_feature
 40
 <223> Secuencia nucleotídica del gen de la proteasa RF6318 de Fusarium equiseti de longitud completa (FeprtS8A).
 <400> 10

atgactagct tccgccgtat cgctcttggc cttgcagctc tgctgcccgc agtcctcgcc 60
gctcccaccg agaagcgaca ggagctcact gccgcgcctg acaagtacat catcaccctc 120
aagcccgagg ctgctgaggc caaggctcag gctcacatgg cctgggttac cgacgtccac 180
cgccgcagcc tcggcaagcg tgacacttcc ggtgttgaga agaagttcaa catcagcagc 240
tggaacgcct actctggcga gttcgacgat gctaccattg ctgagatcaa gaagagcccc 300
gaggttgcct tcgtcgagcc cgactacatt gtcaccctcg actacaaggt tgagcctctc 360
tctgaccgtg ctctgaccac tcagagcaac gtccttggg gtcttgctgc catctcccgc 420
cgaacccccg gtggcagcac ctacacctac gacaccactg ccggtgccgg tacttacggc 480
tacgtcgttg actctggtat caacaccgcc cacactgact ttggcggccg tgcttctctc 540
ggttacaacg ctgctggtgg cggccacact gatacccttg gccacggtac ccacgttgct 600
ggtaccattg cctccaacac ctacgggtgtt gccaacgctg taagtacaat cataccccac 660
atgagctaca acatgatctg aactttatac ttactattat taggccaacg tcatctctgt 720
caaggttttc gtcggttaacc aagcttctac ctctgttata cttgctggtt tcaactgggc 780
tgtcaacgac atcacctcca agaaccgtgc tagccgctct gtcatacaaca tgtctctcgg 840
tggctccctc tctcagacct gggctactgc catcaacgct gcctacagcc aagggtgcct 900
ctccgttggt gctgccggta acggtgattc caacggctgt cctctccccg cctctggcca 960
gtctcctgcc aacgttccca acgctatcac cgttgctgcc gccgactcca gctggcgaac 1020
tgcctctttc accaactacg gtcctgaggt cgatgtcttc ggtcctggtg tcaacatcca 1080
gtccacctgg tacacctcca acagcgctac caacaccatc agcgggtacct ccatggcttg 1140
ccctcacgtt gctggtcttg ctctctacct ccaggctctc gagaacctca ataccctgc 1200
tgccgtcacc aaccgcatca agtctcttgc cactaccggc cgcactactg gcagcctcag 1260
cggcagcccc aacgccatgg ctttcaacgg cgctactgct taa 1303

5
<210> 11
<211> 412
<212> PRT
<213> *Fusarium equiseti*
10
<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> Secuencia de aminoácidos deducida de la proteasa RF6318 (Fe_RF6318) completa de *Fusarium equiseti* que
incluye los aminoácidos desde Met1 a Ala412.
15
<400> 11

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

ES 2 409 890 T3

Gly Lys Arg Asp Thr Ser Gly Val Glu Lys Lys Phe Asn Ile Ser Ser
 65 70 75 80
 Trp Asn Ala Tyr Ser Gly Glu Phe Asp Asp Ala Thr Ile Ala Glu Ile
 85 90 95
 Lys Lys Ser Pro Glu Val Ala Phe Val Glu Pro Asp Tyr Ile Val Thr
 100 105 110
 Leu Asp Tyr Lys Val Glu Pro Leu Ser Asp Arg Ala Leu Thr Thr Gln
 115 120 125
 Ser Asn Ala Pro Trp Gly Leu Ala Ala Ile Ser Arg Arg Thr Pro Gly
 130 135 140
 Gly Ser Thr Tyr Thr Tyr Asp Thr Thr Ala Gly Ala Gly Thr Tyr Gly
 145 150 155 160
 Tyr Val Val Asp Ser Gly Ile Asn Thr Ala His Thr Asp Phe Gly Gly
 165 170 175
 Arg Ala Ser Leu Gly Tyr Asn Ala Ala Gly Gly Ala His Thr Asp Thr
 180 185 190
 Leu Gly His Gly Thr His Val Ala Gly Thr Ile Ala Ser Asn Thr Tyr
 195 200 205
 Gly Val Ala Lys Arg Ala Asn Val Ile Ser Val Lys Val Phe Val Gly
 210 215 220
 Asn Gln Ala Ser Thr Ser Val Ile Leu Ala Gly Phe Asn Trp Ala Val
 225 230 235 240
 Asn Asp Ile Thr Ser Lys Asn Arg Ala Ser Arg Ser Val Ile Asn Met
 245 250 255
 Ser Leu Gly Gly Pro Ser Ser Gln Thr Trp Ala Thr Ala Ile Asn Ala
 260 265 270
 Ala Tyr Ser Gln Gly Val Leu Ser Val Val Ala Ala Gly Asn Gly Asp
 275 280 285
 Ser Asn Gly Arg Pro Leu Pro Ala Ser Gly Gln Ser Pro Ala Asn Val
 290 295 300
 Pro Asn Ala Ile Thr Val Ala Ala Ala Asp Ser Ser Trp Arg Thr Ala
 305 310 315 320
 Ser Phe Thr Asn Tyr Gly Pro Glu Val Asp Val Phe Gly Pro Gly Val
 325 330 335

ES 2 409 890 T3

Asn Ile Gln Ser Thr Trp Tyr Thr Ser Asn Ser Ala Thr Asn Thr Ile
340 345 350
Ser Gly Thr Ser Met Ala Cys Pro His Val Ala Gly Leu Ala Leu Tyr
355 360 365
Leu Gln Ala Leu Glu Asn Leu Asn Thr Pro Ala Ala Val Thr Asn Arg
370 375 380
Ile Lys Ser Leu Ala Thr Thr Gly Arg Ile Thr Gly Ser Leu Ser Gly
385 390 395 400
Ser Pro Asn Ala Met Ala Phe Asn Gly Ala Thr Ala
405 410

<210> 12
<211> 1243
<212> ADN
<213> Fusarium equiseti

<220>
<221> misc_feature

<223> Secuencia nucleotídica que codifica la secuencia de aminoácidos de la forma de proenzima de la proteasa RF6318 de Fusarium equiseti.

<400> 12

gctcccaccg agaagcgaca ggagctcact gccgcgcctg acaagtacat catcacccctc	60
aagcccagagg ctgctgaggc caaggctcag gctcacatgg cctgggttac cgacgtccac	120
cgccgcagcc tcggcaagcg tgacacttcc ggtgttgaga agaagttcaa catcagcagc	180
tggaacgcct actctggcga gttcgacgat gctaccattg ctgagatcaa gaagagcccc	240
gaggttgcct tcgtcgagcc cgactacatt gtcaccctcg actacaaggt tgagcctctc	300
tctgaccgtg ctctgaccac tcagagcaac gtccttggg gtcttgctgc catctcccgc	360
cgaacccccg gtggcagcac ctacacctac gacaccactg ccggtgccgg tacttacggt	420
tacgtcgttg actctggtat caacaccgcc cacttgact ttggcggccg tgcttctctc	480
ggttacaacg ctgctggtgg cggccacact gatacccttg gccacggtac ccacgttgct	540
ggtaccattg cctccaacac ctacggtggt gccaaagctg taagtacaat cataccccac	600
atgagctaca acatgatctg aactttatac ttactattat taggccaacg tcatctctgt	660
caaggttttc gtcggttaacc aagcttctac ctctgttate cttgctgggt tcaactgggc	720
tgtcaacgac atcacctcca agaaccgtgc tagccgtct gtcacaaaca tgtctctcgg	780
tggtccctct tctcagacct gggctactgc catcaacgct gcctacagcc aaggtgtcct	840
ctccgttggt gctgccggta acggtgattc caacggctgt cctctccccg cctctggcca	900
gtctcttgcc aacgttccca acgctatcac cggttgctgcc gccgactcca gctggcgaac	960
tgctcttttc accaactacg gtcctgaggt cgatgtcttc ggtcctggtg tcaacatcca	1020
gtccacctgg tacacctcca acagcgctac caacaccatc agcgggtacct ccatggcttg	1080
ccctcacgtt gctggtcttg ctctctacct ccaggctctc gagaacctca ataccctgc	1140
tgccgtcacc aaccgcatca agtctcttgc cactaccggc cgcactactg gcagcctcag	1200
cggcagcccc aacgccatgg ctttcaacgg cgctactgct taa	1243

<210> 13
<211> 392
<212> PRT

<213> Fusarium equiseti

<220>

<221> MISC_FEATURE

5 <223> Secuencia de aminoácidos de la forma de proenzima de la proteasa RF6318 de Fusarium equiseti que incluye los aminoácidos Ala21 a Ala 412 de la proteasa de longitud total.

<400> 13

Ala	Pro	Thr	Glu	Lys	Arg	Gln	Glu	Leu	Thr	Ala	Ala	Pro	Asp	Lys	Tyr
1				5					10					15	
Ile	Ile	Thr	Leu	Lys	Pro	Glu	Ala	Ala	Glu	Ala	Lys	Val	Glu	Ala	His
			20					25					30		
Met	Ala	Trp	Val	Thr	Asp	Val	His	Arg	Arg	Ser	Leu	Gly	Lys	Arg	Asp
		35					40					45			
Thr	Ser	Gly	Val	Glu	Lys	Lys	Phe	Asn	Ile	Ser	Ser	Trp	Asn	Ala	Tyr
		50				55					60				
Ser	Gly	Glu	Phe	Asp	Asp	Ala	Thr	Ile	Ala	Glu	Ile	Lys	Lys	Ser	Pro
65					70					75					80
Glu	Val	Ala	Phe	Val	Glu	Pro	Asp	Tyr	Ile	Val	Thr	Leu	Asp	Tyr	Lys
				85					90					95	
Val	Glu	Pro	Leu	Ser	Asp	Arg	Ala	Leu	Thr	Thr	Gln	Ser	Asn	Ala	Pro
			100					105					110		
Trp	Gly	Leu	Ala	Ala	Ile	Ser	Arg	Arg	Thr	Pro	Gly	Gly	Ser	Thr	Tyr
		115					120					125			
Thr	Tyr	Asp	Thr	Thr	Ala	Gly	Ala	Gly	Thr	Tyr	Gly	Tyr	Val	Val	Asp
	130					135					140				
Ser	Gly	Ile	Asn	Thr	Ala	His	Thr	Asp	Phe	Gly	Gly	Arg	Ala	Ser	Leu
145					150					155					160
Gly	Tyr	Asn	Ala	Ala	Gly	Gly	Ala	His	Thr	Asp	Thr	Leu	Gly	His	Gly
				165					170					175	
Thr	His	Val	Ala	Gly	Thr	Ile	Ala	Ser	Asn	Thr	Tyr	Gly	Val	Ala	Lys
			180					185					190		

10

ES 2 409 890 T3

Arg Ala Asn Val Ile Ser Val Lys Val Phe Val Gly Asn Gln Ala Ser
 195 200 205
 Thr Ser Val Ile Leu Ala Gly Phe Asn Trp Ala Val Asn Asp Ile Thr
 210 215 220
 Ser Lys Asn Arg Ala Ser Arg Ser Val Ile Asn Met Ser Leu Gly Gly
 225 230 235 240
 Pro Ser Ser Gln Thr Trp Ala Thr Ala Ile Asn Ala Ala Tyr Ser Gln
 245 250 255
 Gly Val Leu Ser Val Val Ala Ala Gly Asn Gly Asp Ser Asn Gly Arg
 260 265 270
 Pro Leu Pro Ala Ser Gly Gln Ser Pro Ala Asn Val Pro Asn Ala Ile
 275 280 285
 Thr Val Ala Ala Ala Asp Ser Ser Trp Arg Thr Ala Ser Phe Thr Asn
 290 295 300
 Tyr Gly Pro Glu Val Asp Val Phe Gly Pro Gly Val Asn Ile Gln Ser
 305 310 315 320
 Thr Trp Tyr Thr Ser Asn Ser Ala Thr Asn Thr Ile Ser Gly Thr Ser
 325 330 335
 Met Ala Cys Pro His Val Ala Gly Leu Ala Leu Tyr Leu Gln Ala Leu
 340 345 350
 Glu Asn Leu Asn Thr Pro Ala Ala Val Thr Asn Arg Ile Lys Ser Leu
 355 360 365
 Ala Thr Thr Gly Arg Ile Thr Gly Ser Leu Ser Gly Ser Pro Asn Ala
 370 375 380
 Met Ala Phe Asn Gly Ala Thr Ala
 385 390

<210> 14

<211> 934

5 <212> ADN

<213> Fusarium equiseti

<220>

<221> misc_feature

10 <223> Secuencia nucleotídica que codifica la secuencia de aminoácidos de la forma madura de la proteasa RF6318 de Fusarium equiseti.

<400> 14

gctctgacca ctcagagcaa cgctccttgg ggtcttgctg ccatctcccg ccgaaccccc 60

15 ggtggcagca cctacaccta cgacaccact gccggtgccg gtacttacgg ttacgtcgtt 120

```

gactctggta tcaacaccgc ccacactgac tttggcggcc gtgcttctct cggttacaac 180
gctgctgggtg gcgcccacac tgataccctt ggccacggta cccacgttgc tggtagcatt 240
gcctccaaca cctacggtgt tgccaagcgt gtaagtacaa tcatacccca catgagctac 300
aacatgatct gaactttata cttactatta ttaggccaac gtcattctctg tcaaggtttt 360
cgtcggtaac caagcttcta cctctgttat ccttgctggt ttcaactggg ctgtcaacga 420
catcacctcc aagaaccgtg ctagccgctc tgatcatcaac atgtctctcg gtggtccctc 480
ttctcagacc tgggctactg ccatcaacgc tgcctacagc caagggtgtcc tctccgttgt 540
tgctgccggt aacggtgatt ccaacggtcg tcctctcccc gcctctggcc agtctcctgc 600
caacgttccc aacgctatca ccgttgctgc cgccgactcc agctggcgaa ctgcctcttt 660
caccaactac ggtcctgagg tcgatgtctt cggtcctggt gtcaacatcc agtccacctg 720
gtacacctcc aacagcgcta ccaacaccat cagcgggtacc tccatggctt gccctcacgt 780
tgctggtctt gctctctacc tccaggctct cgagaacctc aatacccttg ctgccgtcac 840
caaccgcatc aagtctcttg ccactaccgg ccgcatcact ggcagcctca gcggcagccc 900
caacgccatg gctttcaacg gcgctactgc ttaa 934

```

<210> 15

<211> 289

5 <212> PRT

<213> Fusarium equiseti

<220>

<221> MISC_FEATURE

10 <223> Secuencia de aminoácidos de la forma madura de la proteasa RF6318 de Fusarium equiseti que incluye los aminoácidos Ala124 a Ala412 de la enzima de longitud total.

<400> 15

```

Ala Leu Thr Thr Gln Ser Asn Ala Pro Trp Gly Leu Ala Ala Ile Ser
1           5           10           15

```

```

Arg Arg Thr Pro Gly Gly Ser Thr Tyr Thr Tyr Asp Thr Thr Ala Gly
          20           25           30

```

```

Ala Gly Thr Tyr Gly Tyr Val Val Asp Ser Gly Ile Asn Thr Ala His
          35           40           45

```

```

Thr Asp Phe Gly Gly Arg Ala Ser Leu Gly Tyr Asn Ala Ala Gly Gly
          50           55           60

```

```

Ala His Thr Asp Thr Leu Gly His Gly Thr His Val Ala Gly Thr Ile
65           70           75           80

```

```

Ala Ser Asn Thr Tyr Gly Val Ala Lys Arg Ala Asn Val Ile Ser Val
          85           90           95
15

```

ES 2 409 890 T3

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

Phe Asn Trp Ala Val Asn Asp Ile Thr Ser Lys Asn Arg Ala Ser Arg
115 120 125

Ser Val Ile Asn Met Ser Leu Gly Gly Pro Ser Ser Gln Thr Trp Ala
130 135 140

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

Ala Gly Asn Gly Asp Ser Asn Gly Arg Pro Leu Pro Ala Ser Gly Gln
165 170 175

Ser Pro Ala Asn Val Pro Asn Ala Ile Thr Val Ala Ala Ala Asp Ser
180 185 190

Ser Trp Arg Thr Ala Ser Phe Thr Asn Tyr Gly Pro Glu Val Asp Val
195 200 205

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

Ala Thr Asn Thr Ile Ser Gly Thr Ser Met Ala Cys Pro His Val Ala
225 230 235 240

Gly Leu Ala Leu Tyr Leu Gln Ala Leu Glu Asn Leu Asn Thr Pro Ala
245 250 255

Ala Val Thr Asn Arg Ile Lys Ser Leu Ala Thr Thr Gly Arg Ile Thr
260 265 270

Gly Ser Leu Ser Gly Ser Pro Asn Ala Met Ala Phe Asn Gly Ala Thr
275 280 285

Ala

REIVINDICACIONES

1. Enzima serina proteasa fúngica, caracterizada porque dicha enzima presenta actividad de la serina proteasa y comprende una secuencia de aminoácidos de la enzima Fe_RF6318 madura tal como se define en la SEC. ID. nº:15 o una secuencia de aminoácidos que presenta por lo menos 86% de identidad con la secuencia de aminoácidos de la enzima Fe_RF6318 madura definida en la SEC. ID. nº:15.
2. Enzima serina proteasa fúngica según la reivindicación 1, caracterizada porque dicha enzima puede obtenerse a partir de *Fusarium equiseti*.
3. Enzima serina proteasa fúngica según la reivindicación 1 o 2, caracterizada porque dicha enzima presenta actividad de la serina proteasa y comprende la secuencia de aminoácidos SEC. ID. nº:15.
4. Enzima serina proteasa fúngica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada porque una forma madura de dicha enzima presenta un peso molecular entre 20 y 35 kDa.
5. Enzima serina proteasa fúngica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizada porque la temperatura óptima de dicha enzima a pH 9 utilizando un tiempo de reacción de 15 min. y la caseína como sustrato es de 30°C a 70°C.
6. Enzima serina proteasa fúngica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizada porque dicha enzima presenta un pH óptimo a 50°C utilizando un tiempo de reacción de 15 min. y la caseína como sustrato en el intervalo de pH de por lo menos pH 6 a pH 11.
7. Enzima serina proteasa fúngica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizada porque dicha enzima puede degradar y eliminar las manchas proteínicas en presencia de detergente entre 10°C y 60°C.
8. Enzima serina proteasa fúngica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizada porque dicha enzima está codificada por una secuencia polinucleotídica aislada, que se hibrida en condiciones severas con una secuencia polinucleotídica incluida en el plásmido pALK2521 que comprende la secuencia nucleotídica SEC. ID. nº:9 depositada en *Escherichia coli* RF7664 con el número de registro DSM 22171.
9. Enzima serina proteasa fúngica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizada porque dicha enzima está codificada por una secuencia polinucleotídica aislada, que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de la enzima Fe_RF6318 madura tal como se define en SEC. ID. nº:15 o una secuencia de aminoácidos que presenta por lo menos 86% de identidad con la secuencia de aminoácidos de la Fe_RF6318 madura definida en la SEC. ID. nº:15.
10. Enzima serina proteasa fúngica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizada porque dicha enzima está codificada por una molécula de ácido nucleico aislada, que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos caracterizada en la SEC. ID. nº:15.
11. Enzima serina proteasa fúngica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizada porque dicha enzima está codificada por una molécula de ácido nucleico aislada que comprende la secuencia nucleotídica SEC. ID. nº:14.
12. Enzima serina proteasa fúngica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, caracterizada porque dicha enzima está codificada por la secuencia polinucleotídica incluida en pALK2529 depositada en *Escherichia coli* RF7800 con el número de registro DSM 22172.
13. Enzima serina proteasa fúngica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, caracterizada porque dicha enzima se produce a partir de un vector de expresión recombinante que comprende la molécula de ácido nucleico que codifica una serina proteasa fúngica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 unida operativamente a las secuencias reguladoras que pueden dirigir la expresión del gen que codifica la serina proteasa en un anfitrión adecuado.
14. Enzima serina proteasa fúngica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, caracterizada porque dicha enzima se produce en un anfitrión heterólogo.
15. Enzima serina proteasa fúngica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, caracterizada porque dicha enzima se produce en un anfitrión microbiano.
16. Enzima serina proteasa fúngica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, caracterizada porque dicha enzima se produce en un anfitrión del género *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Humicola*, *Chrysosporium*, *Neurospora*, *Rhizopus*, *Penicillium* y *Mortierella*.

17. Enzima serina proteasa fúngica según la reivindicación 16, caracterizada porque dicha enzima se produce en *Trichoderma* o *Aspergillus*.

18. Enzima serina proteasa fúngica según la reivindicación 17, caracterizada porque dicha enzima se produce en *T. reesei*.

19. Molécula de ácido nucleico aislada que codifica una enzima serina proteasa fúngica seleccionada de entre el grupo que consiste en:

(a) una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que presenta actividad de serina proteasa y que comprende la secuencia de aminoácidos como es representada en la SEC. ID. nº:15;

(b) una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que presenta actividad de serina proteasa y por lo menos 86% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. nº:15;

(c) una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de codificación de la secuencia nucleotídica como es representada en la SEC. ID. nº:10;

(d) una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de codificación de la secuencia polinucleotídica contenida en DSM 22171 o DSM 22172;

(e) una molécula de ácido nucleico cuya secuencia de codificación se diferencia de la secuencia de codificación de una molécula de ácido nucleico de una cualquiera de (c) a (d) debido a la degeneración del código genético; y

(g) una molécula de ácido nucleico que se hibrida en condiciones severas con una molécula de ácido nucleico contenida en DSM 22171, y que codifica un polipéptido que presenta actividad de serina proteasa y una secuencia de aminoácidos que presenta por lo menos 86% de identidad con la secuencia de aminoácidos como es representada en la SEC. ID. nº:15.

20. Vector de expresión recombinante que comprende la secuencia nucleotídica según la reivindicación 19 operativamente unida a las secuencias reguladoras que pueden dirigir la expresión de dicho gen que codifica la serina proteasa en un anfitrión adecuado.

21. Célula anfitriona que comprende el vector de expresión recombinante según la reivindicación 20.

22. Célula anfitriona según la reivindicación 21, caracterizada porque dicho anfitrión es un anfitrión microbiano.

23. Célula anfitriona según la reivindicación 21 o 22, caracterizada porque dicho anfitrión es un hongo filamentoso.

24. Célula anfitriona según cualquiera de las reivindicaciones 21 a 23, caracterizada porque dicho anfitrión es de un género *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Humicola*, *Chrysosporium*, *Neurospora*, *Rhizopus*, *Penicillium* y *Mortierella*.

25. Célula anfitriona según la reivindicación 24, caracterizada porque dicho anfitrión es *Trichoderma* o *Aspergillus*.

26. Célula anfitriona según la reivindicación 25, caracterizada porque dicho anfitrión es *T. reesei*.

27. Procedimiento para producir un polipéptido que presenta actividad de serina proteasa, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de cultivar la célula anfitriona según cualquiera de las reivindicaciones 21 a 26 y recuperar el polipéptido.

28. Polipéptido que presenta actividad de serina proteasa codificado por la secuencia de ácido nucleico según la reivindicación 19 y que puede obtenerse por el procedimiento según la reivindicación 27.

29. Procedimiento para la obtención de un preparado enzimático que comprende un polipéptido que presenta actividad de serina proteasa, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de cultivar una célula anfitriona según cualquiera de las reivindicaciones 21 a 26 y, recuperar el polipéptido de las células o separar las células del medio de cultivo y obtener el sobrenadante.

30. Preparado enzimático que puede obtenerse por el procedimiento según la reivindicación 29.

31. Preparado enzimático, que comprende la enzima serina proteasa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18.

32. Preparado enzimático según la reivindicación 30 o 31, caracterizado porque dicho preparado comprende otras

enzimas seleccionadas de entre el grupo de proteasa, amilasa, celulasa, lipasa, xilanasas, mananasa, cutinasa, pectinasa u oxidasa con o sin un mediador.

5 33. Preparado enzimático según cualquiera de las reivindicaciones 30 a 32, caracterizado porque dicho preparado comprende un aditivo adecuado seleccionado de entre el grupo de estabilizadores, tampones, tensioactivos, constructores, agentes blanqueadores, mediadores, agentes anticorrosivos, agentes antireprecipitación, cáusticos, abrasivos, abrillantadores ópticos, colorantes, pigmentos y conservantes.

10 34. Preparado enzimático según cualquiera de las reivindicaciones 30 a 33, caracterizado porque dicho preparado enzimático está en forma de líquido, polvo o granulado.

15 35. Utilización de la enzima serina proteasa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18 o del preparado enzimático según cualquiera de las reivindicaciones 30 a 34 para detergentes, para el tratamiento de fibras, para el tratamiento de lana, para el tratamiento del cabello, para el tratamiento del cuero, para el tratamiento de alimentos o piensos, o para cualquiera de las aplicaciones que implican la modificación, degradación o eliminación de material proteínico.

20 36. Utilización de la enzima serina proteasa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18 o del preparado enzimático según cualquiera de las reivindicaciones 30 a 34 como aditivo detergente.

37. Utilización según la reivindicación 36 en detergentes líquidos.

38. Utilización según la reivindicación 36 en detergentes en polvo.

25

Fig. 1A

```

1  atgactagct tccgccgtat cgctcttggc cttgcagctc tgctgcccgc agtcctcgcc gctcccaccg agaagcgaca ggagctcact
1  m t s f r r i a l g l a a l l p a v l a a p t e k r q e l t
91  gccgcgcctg acaagtacat catcaccttc aagcccgagg ctgctgaggc caaggtcgag gctcacatgg cctgggttac cgacgtccac
31  a a p d k y i i t l k p e a a e a k v e a h m a w v t d v h
181  cgccgcagcc tcggcaagcg tgacacttcc ggtgttgaga agaagttaa catcagcagc tggaacgcct actctggcga gttcgacgat
61  r r s l g k r d t s g v e k k f n i s s w n a y s g e f d d
271  gctaccattg ctgagatcaa gaagagcccc gaggttgccct tcgtcgagcc cgactacatt gtcaccctcg actacaaggt tgagcctctc
91  a t i a e i k k s p e v a f v e p d y i v t l d y k v e p l
361  tctgaccgtg CTCTGACCAC TCAGAGCAAC GCTCCTTGGG GTCTTGCTGC CACTCCCGC CGAACCCCGG GTGGCAGCAC CTACACCTAC
121  s d r A L T T Q S N A P W G L K A I S R F T B G G S T Y T Y
451  GACACCACTG CCGGTGCCGG TACTTACGGT TACGTCGTTG ACTCTGGTAT CAACACCGCC CACACTGACT TTGGCGGCCG TGCTTCTCTC
151  D T T A G A G T Y G Y V V D S G I N T A H T D F G G R A S L
541  GGTTACAACG CTGCTGGTGG CGCCCACT GATACCCCTTG GCCACGGTAC CCACGTTGCT GGTACCATTG CCTCCAACAC CTACGGTGT
181  G Y N A A G G A H T D T L G H G T H V A G T I A S N T Y G V
631  GCCAAGCGTg taagtacaat cataccccac atgagctaca acatgatctg aactttatata ttactattat tagGCCAACG TCATCTCTGT
211  A K R..... A N V I S
721  CAAGGTTTC GTCGGTAACC AAGCTTCTAC CTCTGTTATC CTGTGTTGTT TCAACTGGGC TGTC AACGAC ATCACCTCCA AGAACCGTGC
219  V K V F V G N Q A S T S V I L A G F N W A V N D I T S K N R
811  TAGCCGCTCT GTCATCAACA TGCTCTCTCGG TGGTCCCTCT TCTCAGACCT GGGCTACTGC CATCAACGCT GCCTACAGCC AAGGTGTCCT
249  A S R S V I N M S L G G P S S Q T W A T A I N A A Y S Q G V

```

Fig. 1B

```

901 CTCCGTTGTT GCTGCCGGTA ACGGTGATTC CAACGGTCGT CCTCTCCCG CCTCTGGCCA GTCTCCTGCC AACGTTCCCA ACGCTATCAC
279 L S V V A A G N G D S N G R P L P A S G Q S P A N V P N A I

991 CGTTGCTGCC GCCGACTCCA GCTGGCGAAC TGCCTCTTTC ACCAACTACG GTCCTGAGGT CGATGTC TTC GGTCCCTGGTG TCAACATCCA
309 T V A A A D S S H R T A S F T N Y G P E V D V F G P G V N I

1081 GTCCACCTGG TACACCTCCA ACAGCGCTAC CAACACCATC AGCGGTACCT CCATGGCTTG CCCTCAGCTT GCTGGTCTTG CTCTCTACCT
339 Q S T W Y T S N S A T N T I S G T S M A C P H V A G L A L Y

1171 CCAGGCTCTC GAGAACCTCA ATACCCCTGC TGCCGTCACC AACCGCATCA AGTCTCTTGC CACTACCGGC CGCATCACTG GCAGCCTCAG
369 L Q A L E N L N T P A A V T N R I K S L A T T G R I T G S L

1261 CGGCAGCCCC AACGCCATGG CTTTCAACGG CGTACTGCT TAA
399 S G S P N A M A F N G A T A *

```

Fig. 2

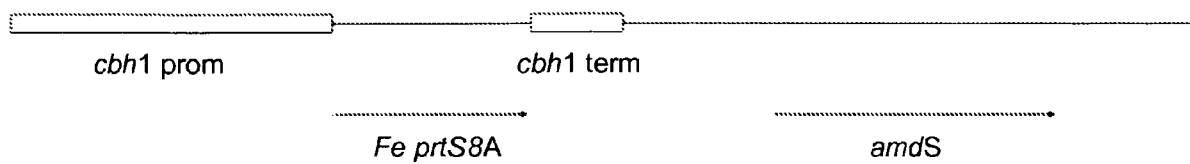


Fig. 3

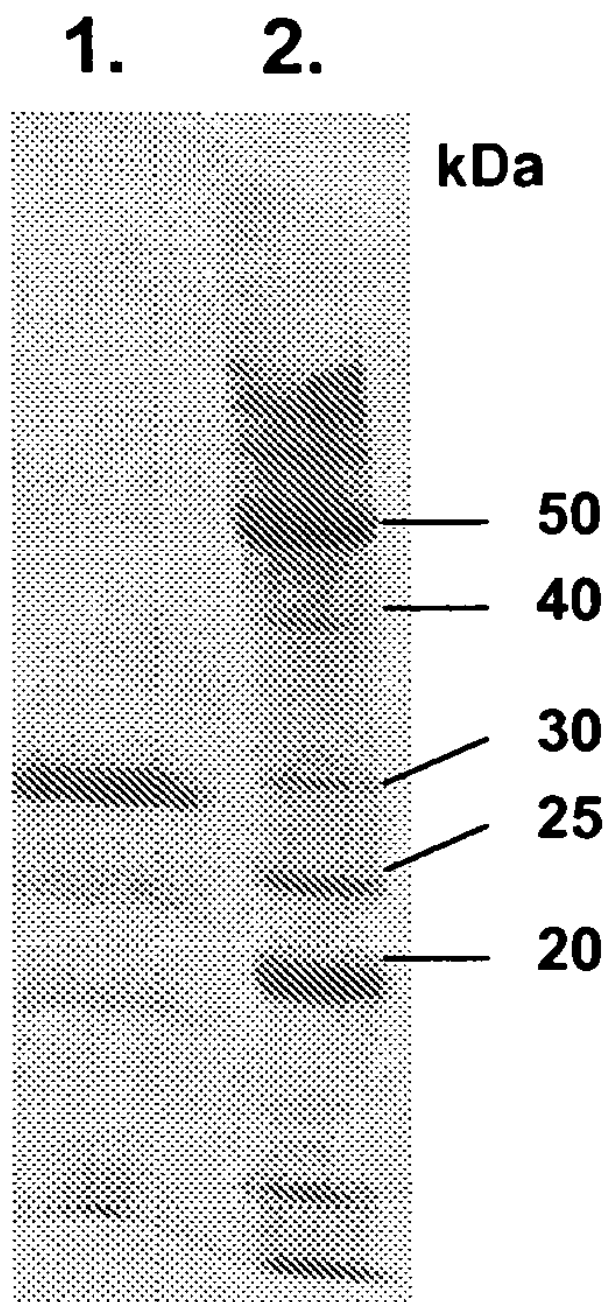


Fig. 4A

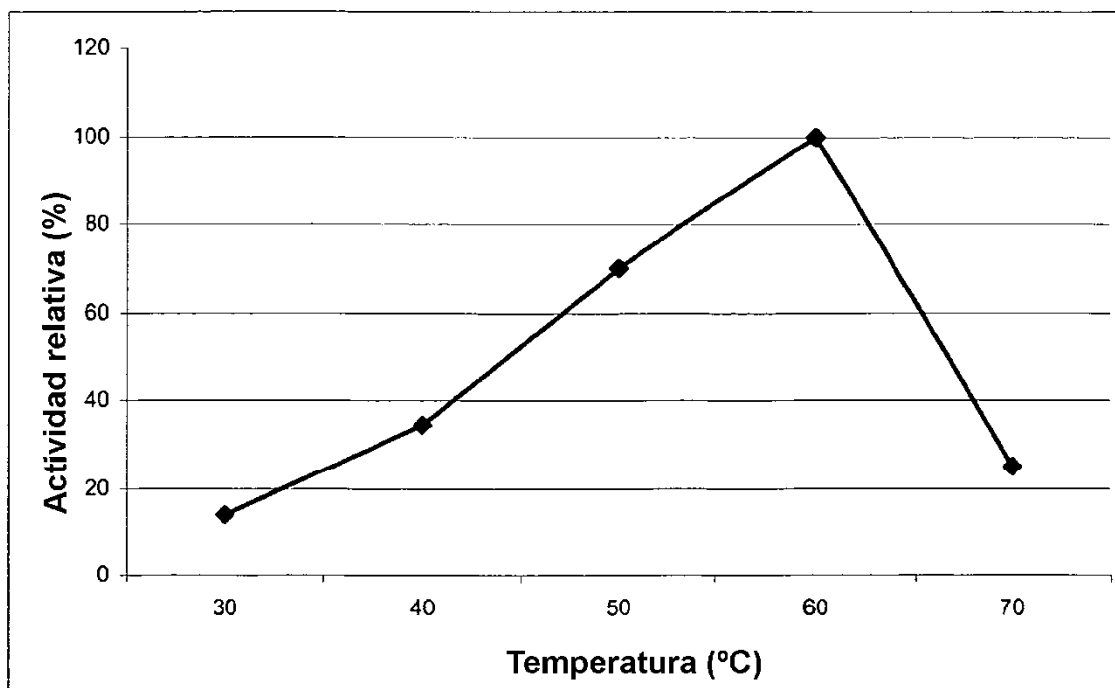


Fig. 4B

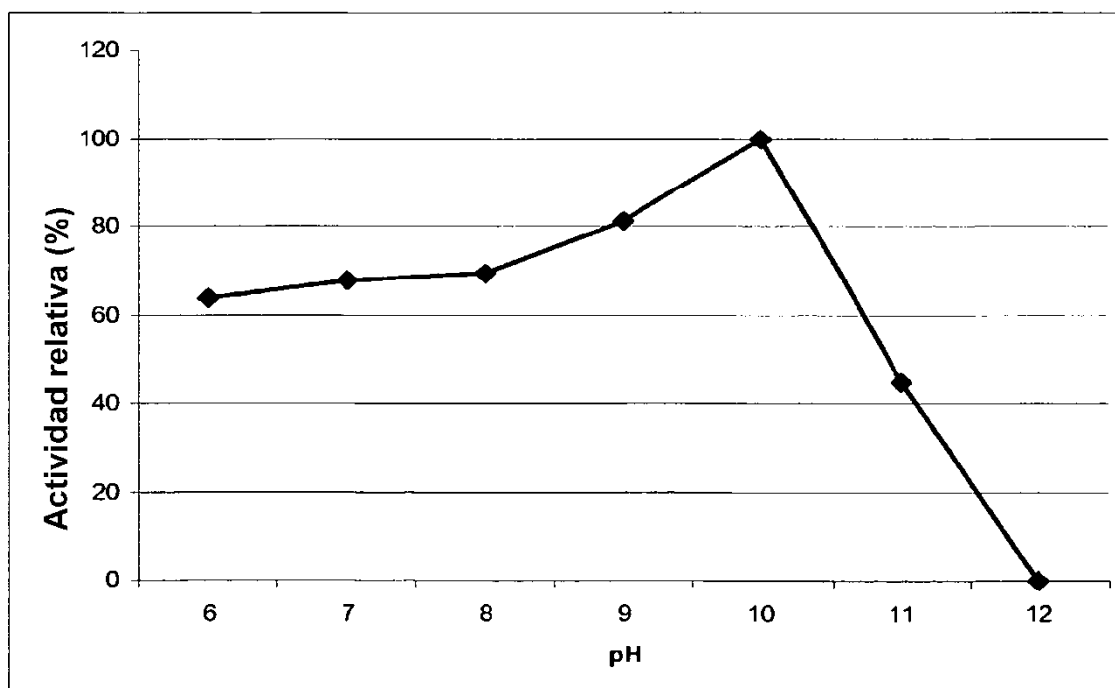


Fig. 5
Eficacia de Fe_RF6318 recombinante
Mancha de sangre-leche-tinta
30 °C, pH 9, 60 min.

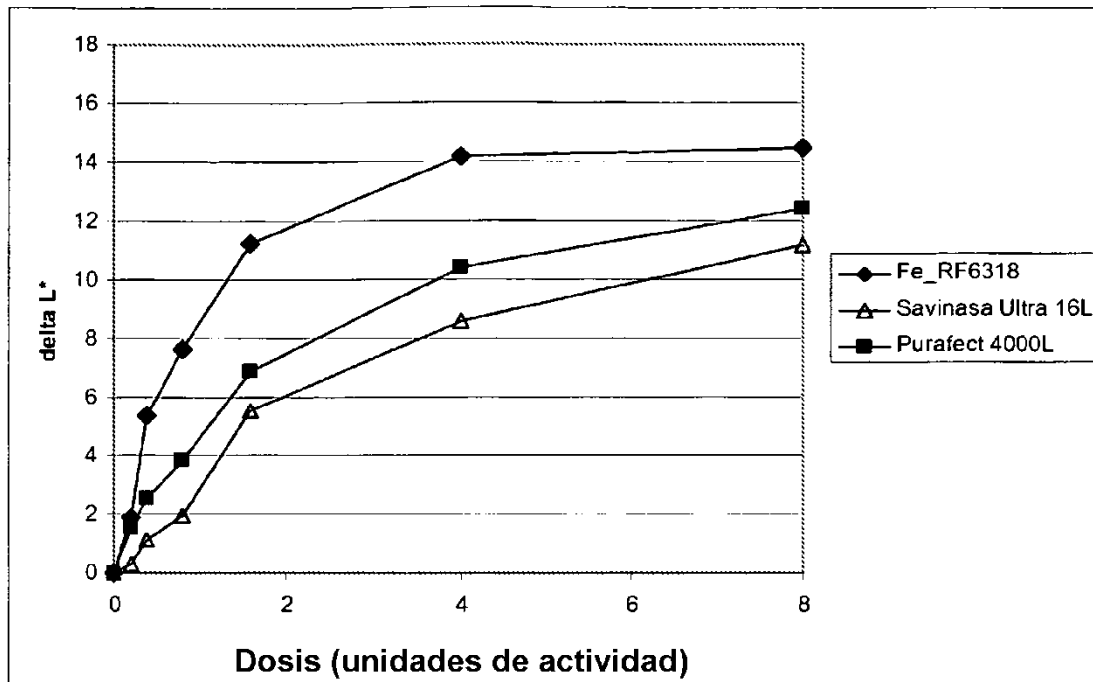


Fig. 6
Eficacia de Fe_RF6318 recombinante
Mancha de sangre-leche-tinta
50 °C, pH 9, 60 min.

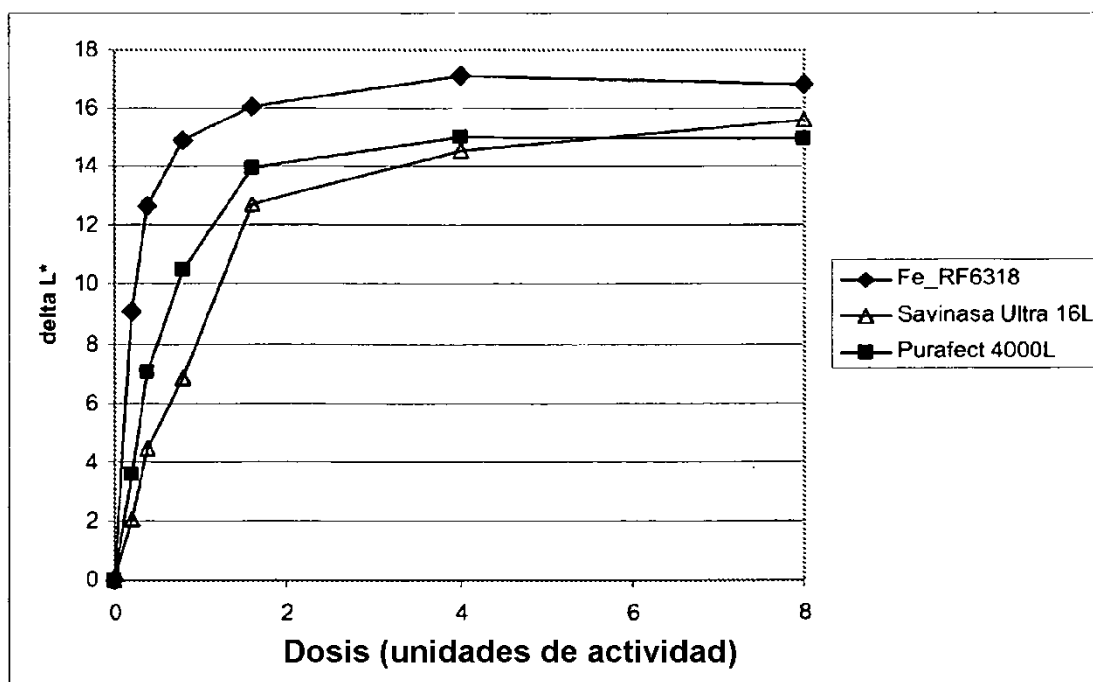


Fig. 7A

Eficacia de Fe_RF6318 recombinante

Mancha de sangre-leche-tinta

40 °C, pH aprox. 10, 60 min.

Detergente en polvo

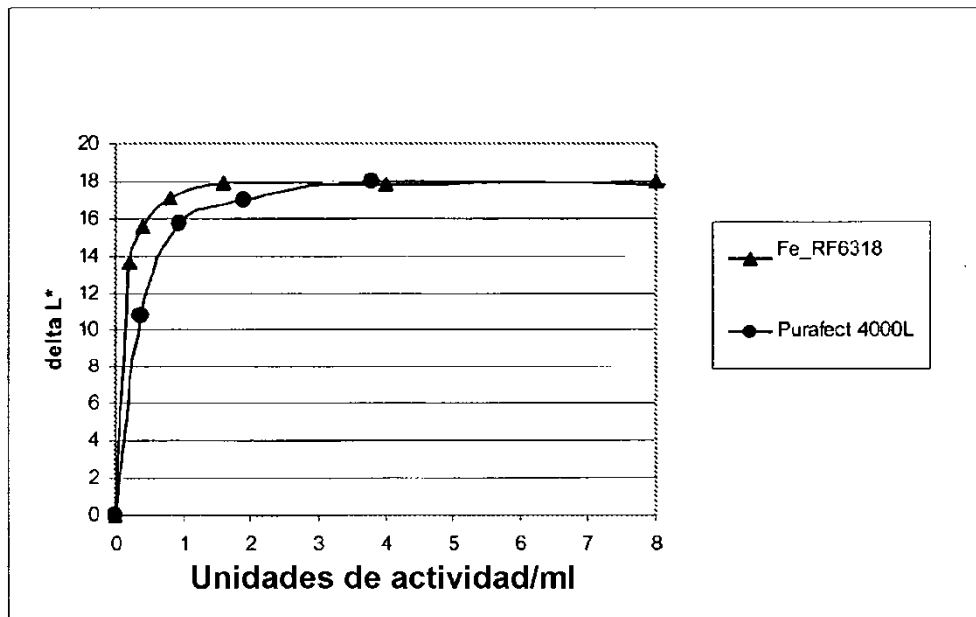


Fig. 7B

Eficacia de Fe_RF6318 recombinante

Mancha de sangre-leche-tinta

40 °C, pH aprox. 10, 60 min.

Detergente en polvo y agentes blanqueadores

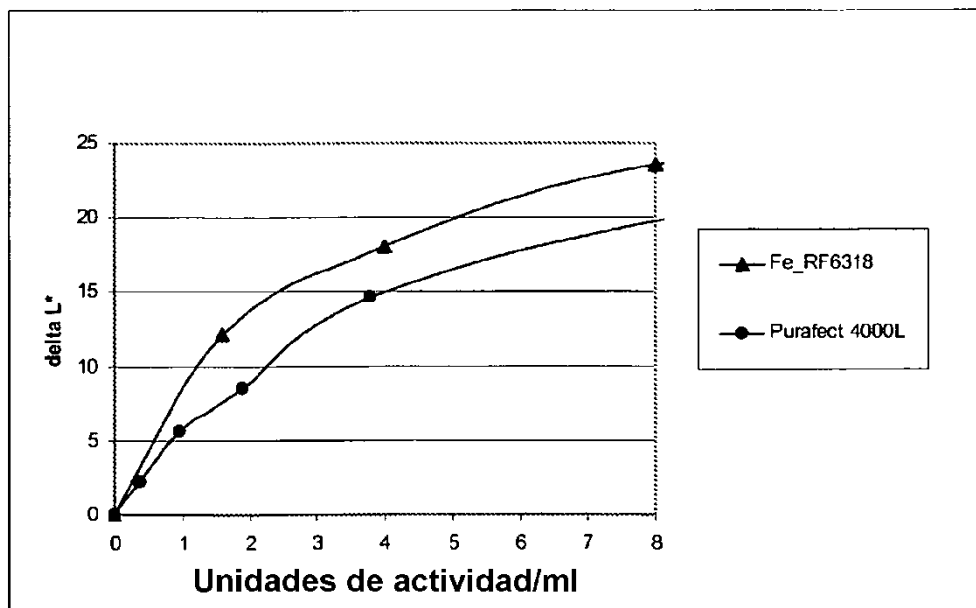


Fig. 8A
Eficacia de Fe_RF6318 recombinante
Mancha de sangre-leche-tinta
 50 °C, pH aprox. 10, 60 min.
Detergente en polvo

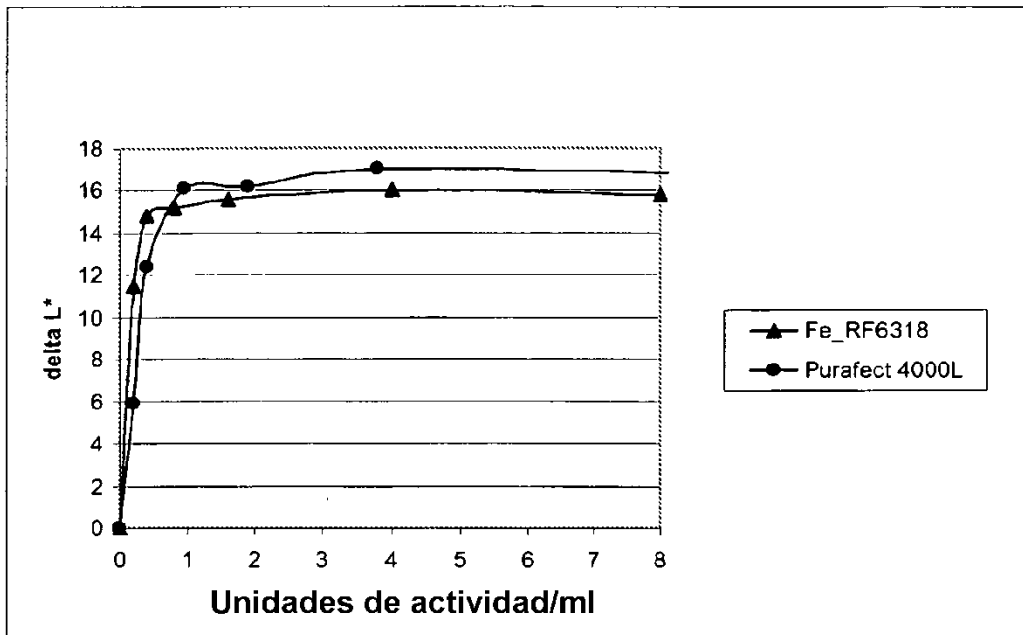


Fig. 8B
Eficacia de Fe_RF6318 recombinante
Mancha de sangre-leche-tinta
 50 °C, pH aprox. 10, 60 min.
Detergente en polvo y agentes blanqueadores

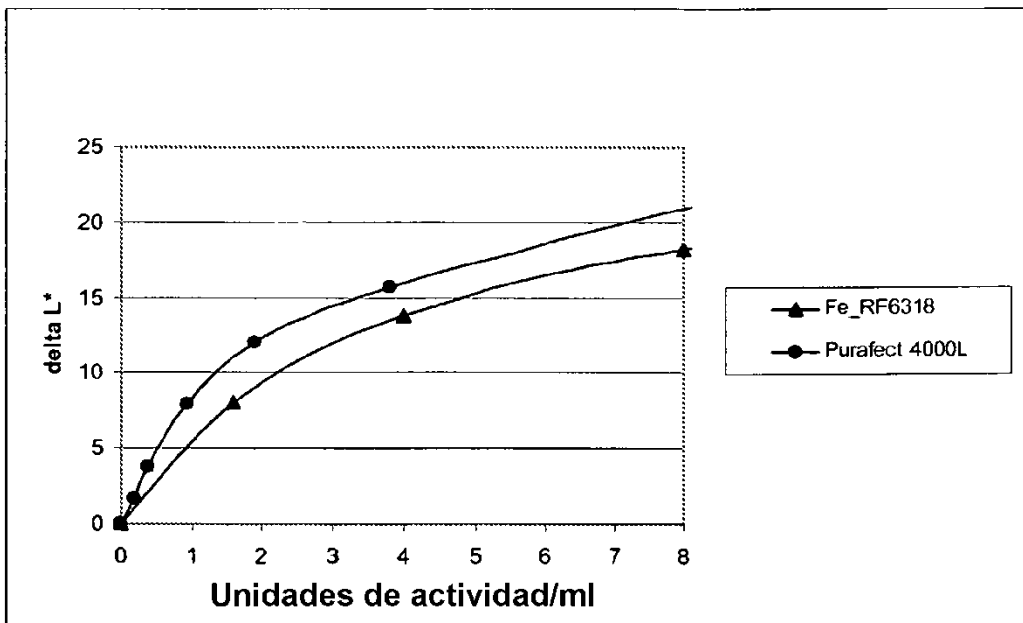


Fig. 9
Eficacia de Fe_RF6318 recombinante
Mancha de sangre-leche-tinta
Detergente líquido Ariel Sensitive
40 °C, pH aprox. 7.9, 60 min.

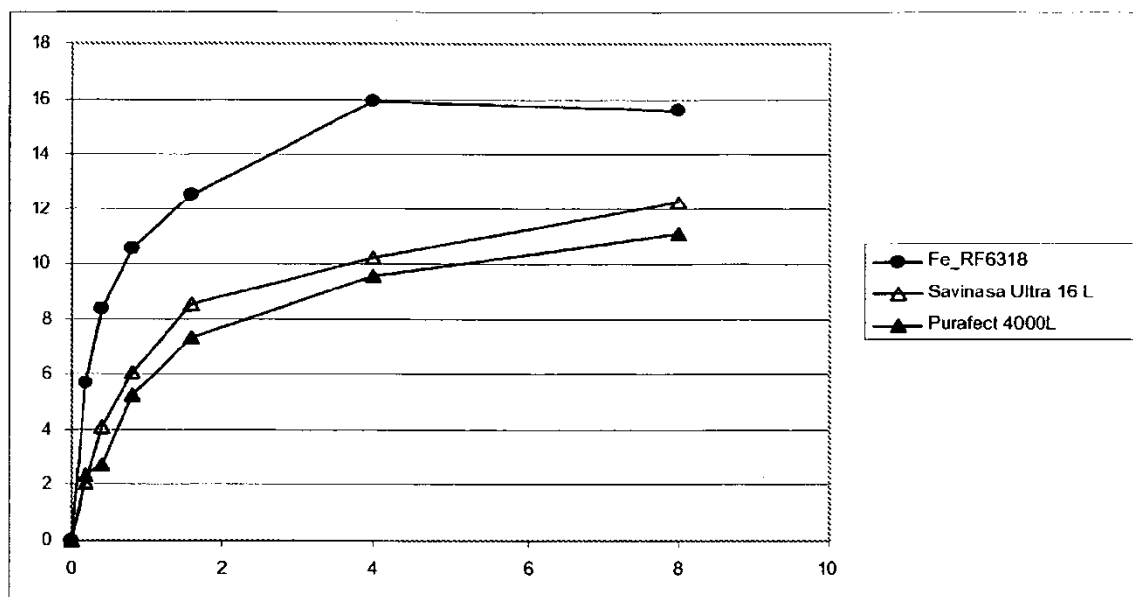


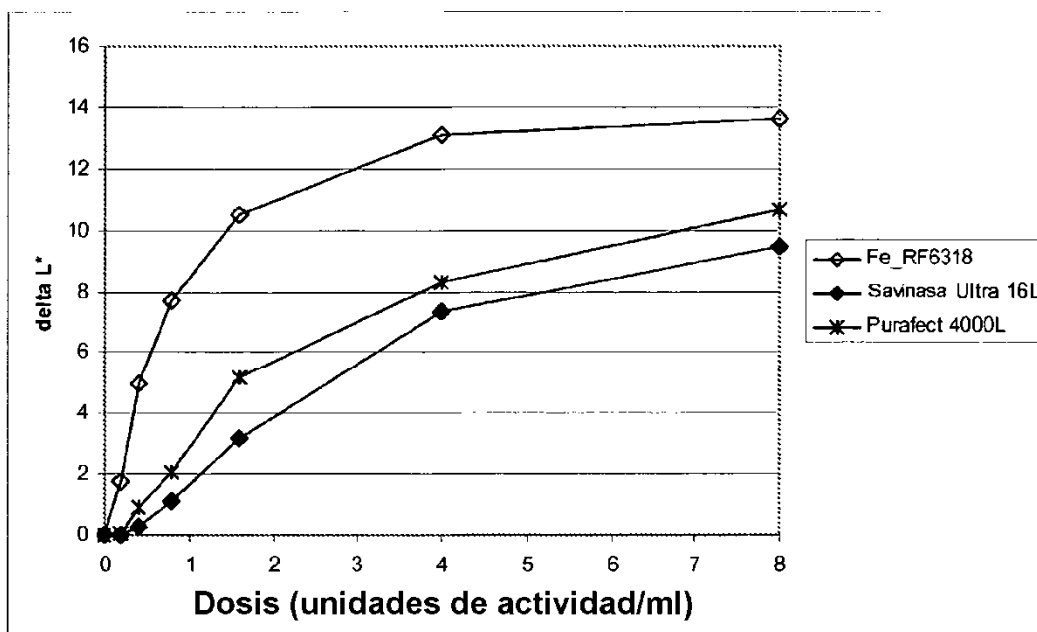
Fig. 10A

Eficacia de Fe_RF6318 recombinante

Mancha de sangre-leche-tinta

Detergente líquido principal para tejidos de color

30°C, concentración de detergente 5 g/l, pH 7,5

**Fig. 10B**

Eficacia de Fe_RF6318 recombinante

Mancha de sangre-leche-tinta

Detergente líquido principal para tejidos de color

30°C, concentración de detergente 5 g/l (dosis de enzima calculada como proteína)

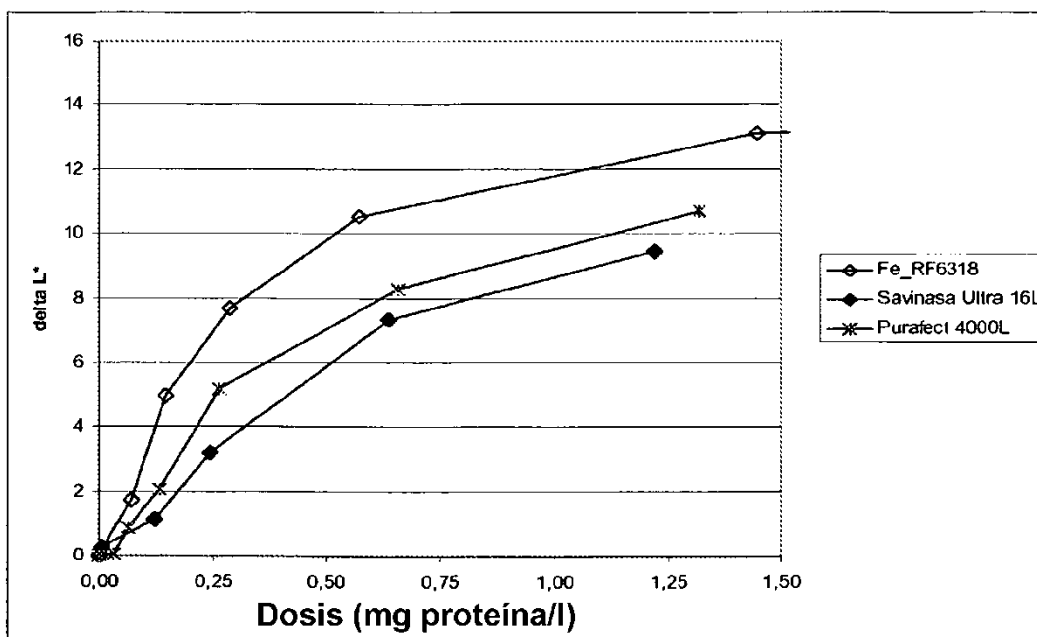


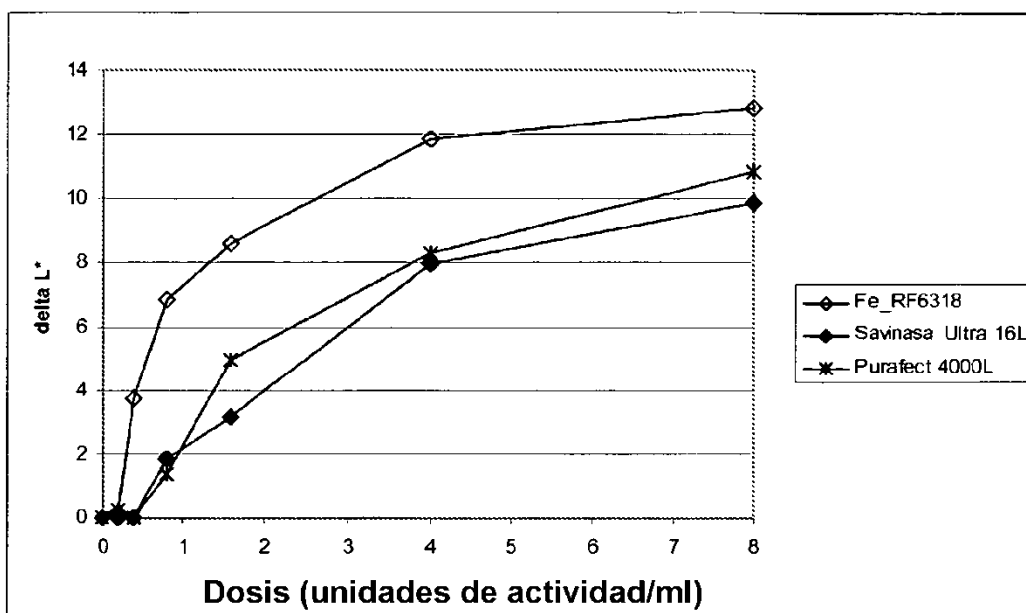
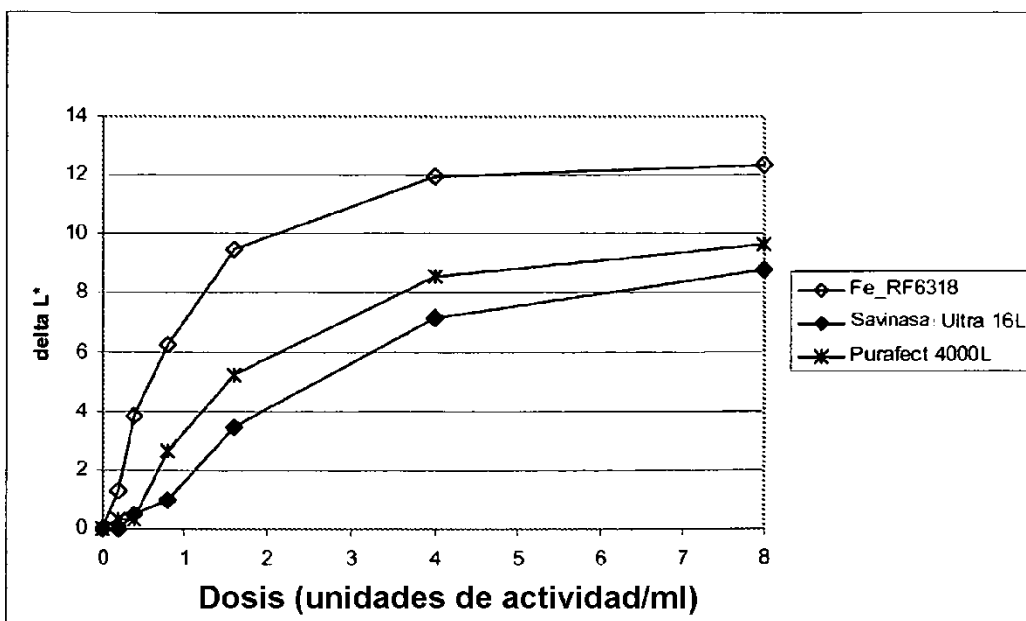
Fig. 10C**Eficacia de Fe_RF6318 recombinante****Mancha de sangre-leche-tinta****Detergente líquido principal para tejidos de color****30°C, concentración de detergente 3,3 g/l, pH 7,4****Fig. 10D****Eficacia de Fe_RF6318 recombinante****Mancha de sangre-leche-tinta****Detergente líquido principal para tejidos de color****30°C, concentración de detergente 1 g/l, pH 7,3**

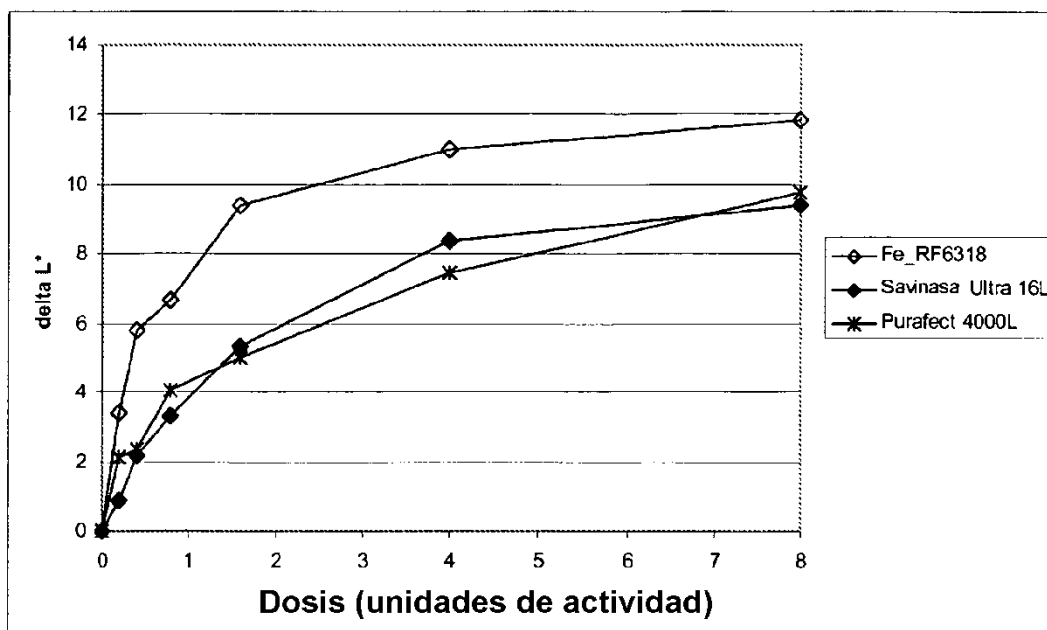
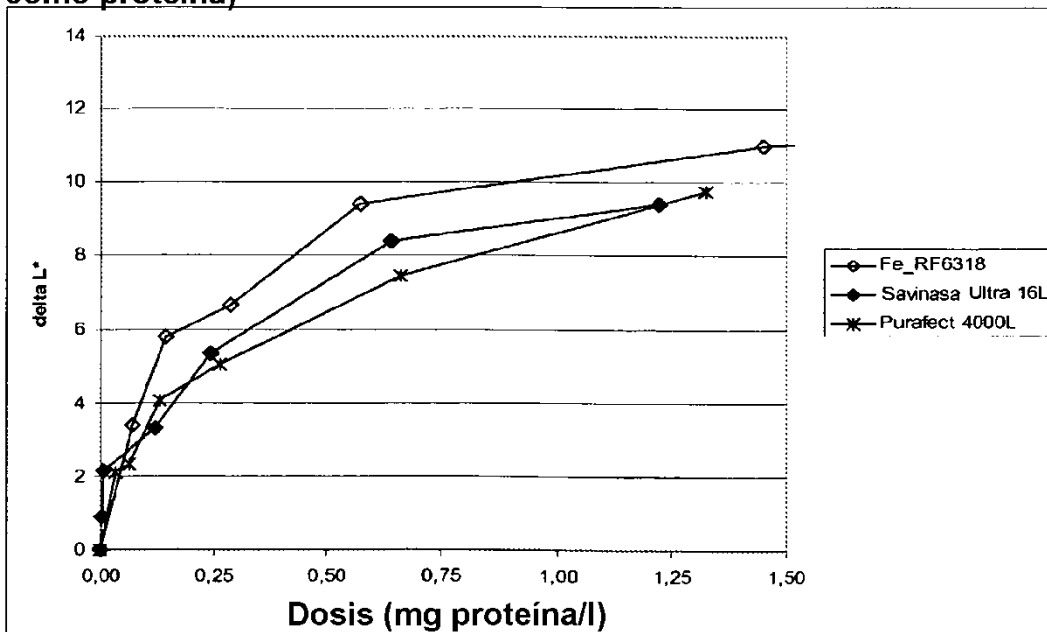
Fig. 11A**Eficacia de Fe_RF6318 recombinante****Mancha de sangre-leche-tinta****Ariel Sensitive****30°C, concentración de detergente 5 g/l, pH 8****Fig. 11B****Eficacia de Fe_RF6318 recombinante****Mancha de sangre-leche-tinta****Ariel Sensitive****30°C, concentración de detergente 5 g/l, (dosis de enzima calculada como proteína)**

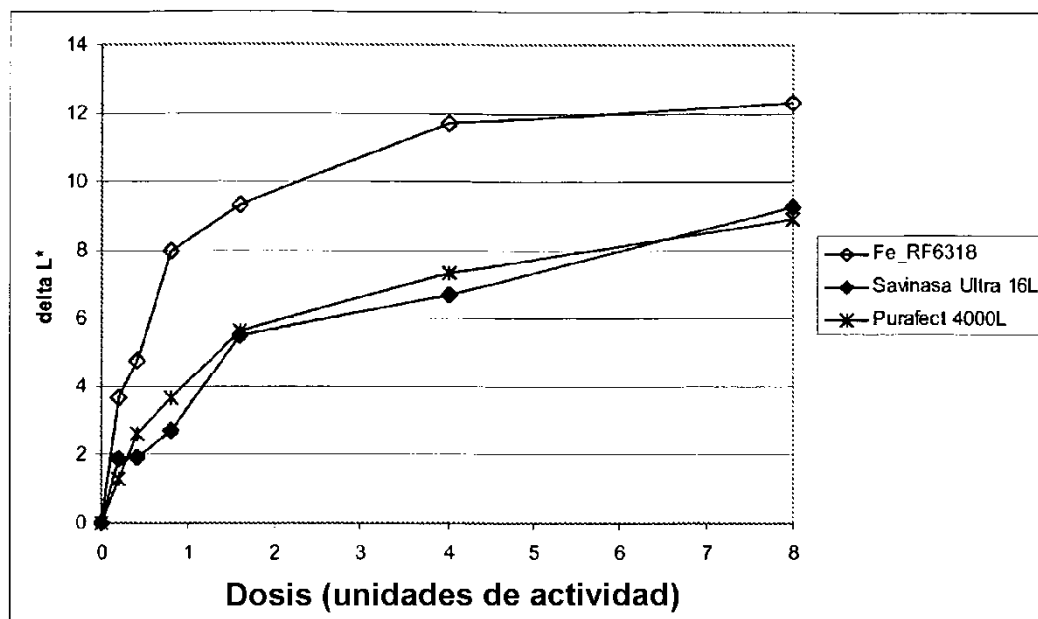
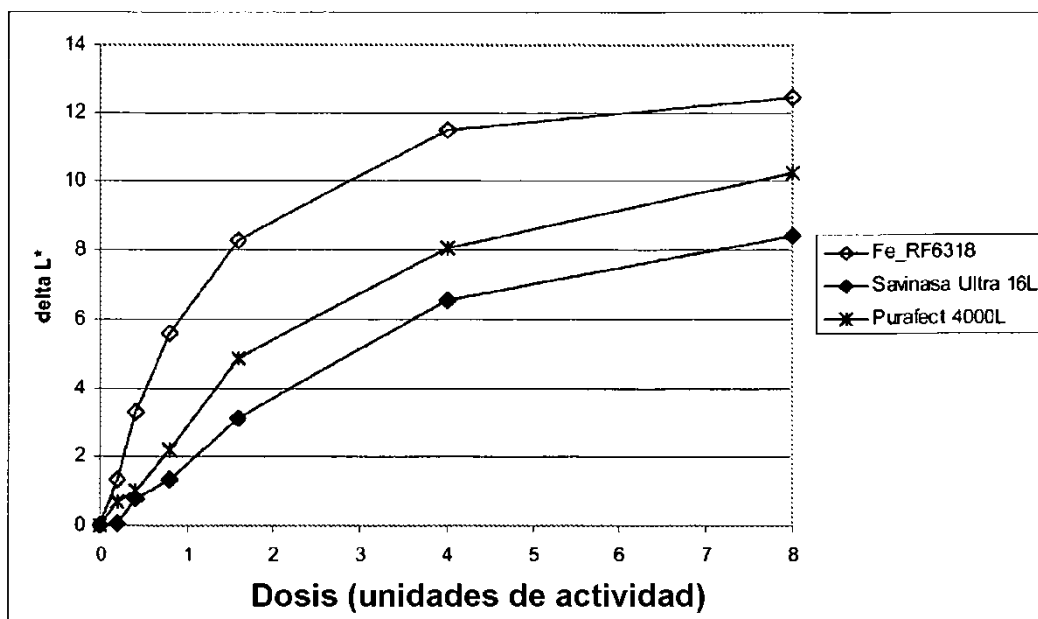
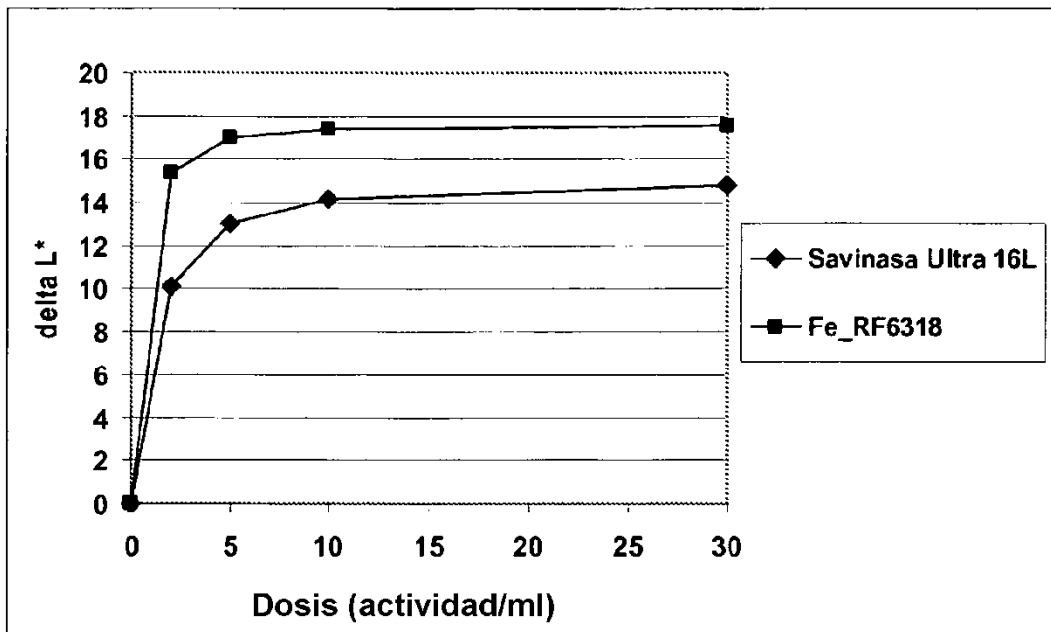
Fig. 11C**Eficacia de Fe_RF6318 recombinante****Mancha de sangre-leche-tinta****Ariel Sensitive****30°C, concentración de detergente 3,3 g/l, pH 7,9****Fig. 11D****Eficacia de Fe_RF6318 recombinante****Mancha de sangre-leche-tinta****Ariel Sensitive****30°C, concentración de detergente 1 g/l, pH 7,6**

Fig. 12A

Eficacia de Fe RF6318 recombinante
Prueba Launder Ometer
Detergente líquido Ariel Sensitive, 30°C
Mancha de sangre-leche-tinta

**Fig. 12B**

Eficacia de Fe RF6318 recombinante
Prueba Launder Ometer
Detergente líquido Ariel Sensitive, 30°C
Mancha de sangre-leche-tinta

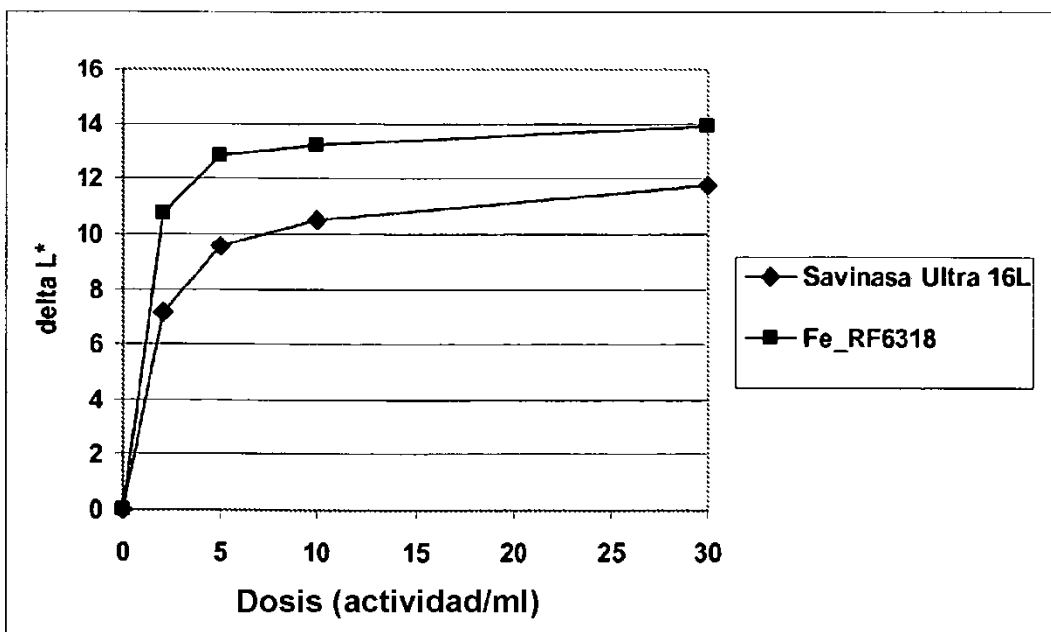


Fig. 12C

Eficacia de Fe_RF6318 recombinante
Prueba Launder Ometer
Detergente líquido Ariel Sensitive, 30°C
Mancha de sangre-leche-tinta
Hierba

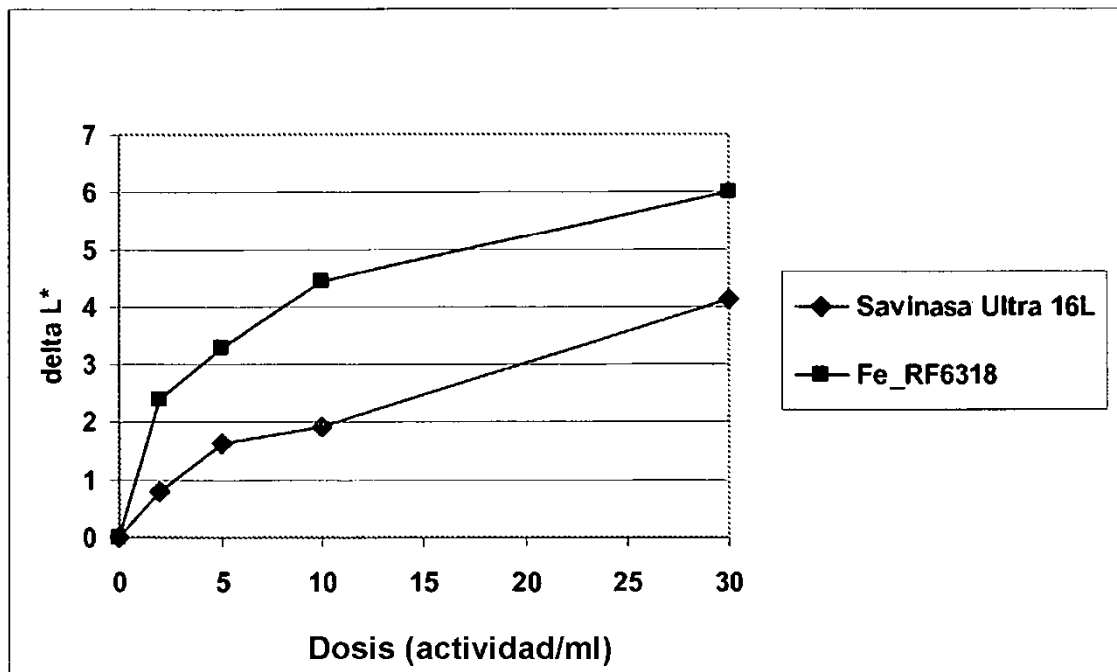


Fig. 13A

Eficacia de Fe_RF6318 recombinante
Prueba Launder Ometer
Detergente líquido Ariel Sensitive, 30°C
sangre-leche-tinta

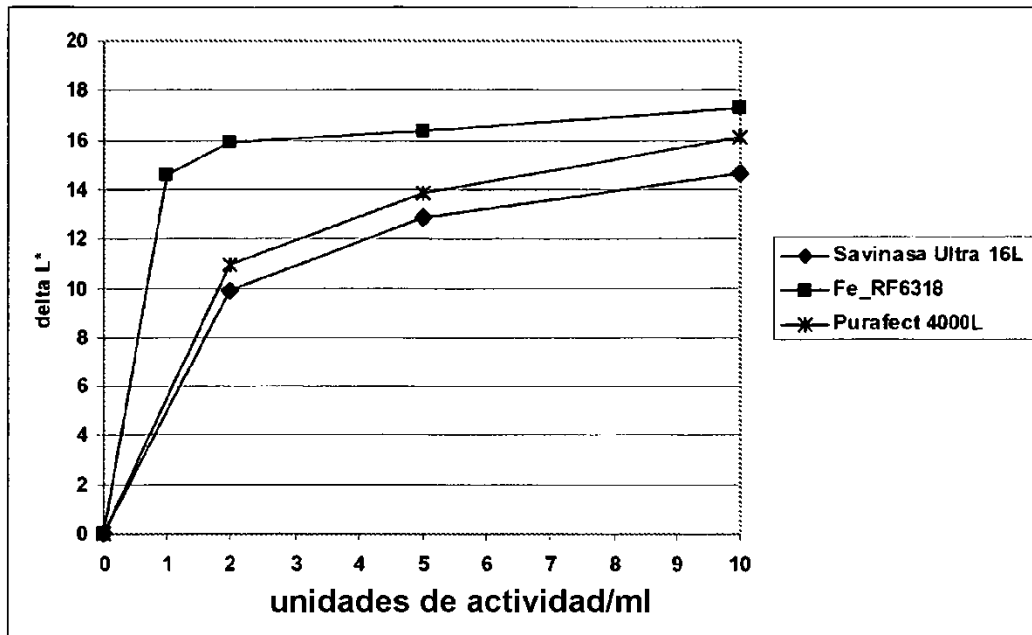


Fig. 13B

Eficacia de Fe_RF6318 recombinante
Prueba Launder Ometer
Detergente líquido Ariel Sensitive, 30°C
sangre-leche-tinta

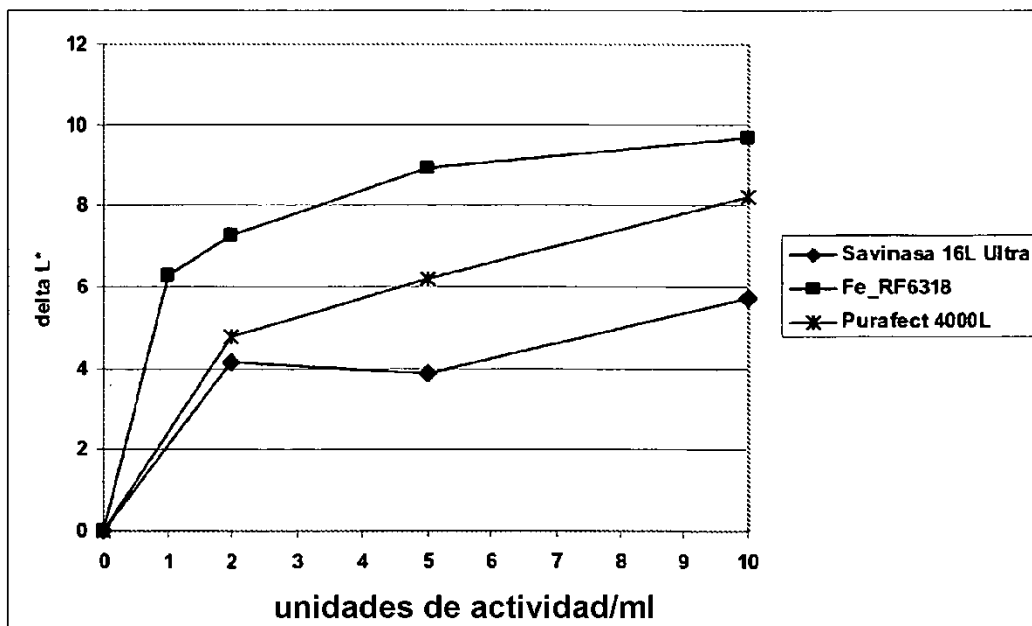


Fig. 13C

Eficacia de Fe_RF6318 recombinante
Prueba Launder Ometer
Detergente líquido para tejidos de color, 30°C
Hierba

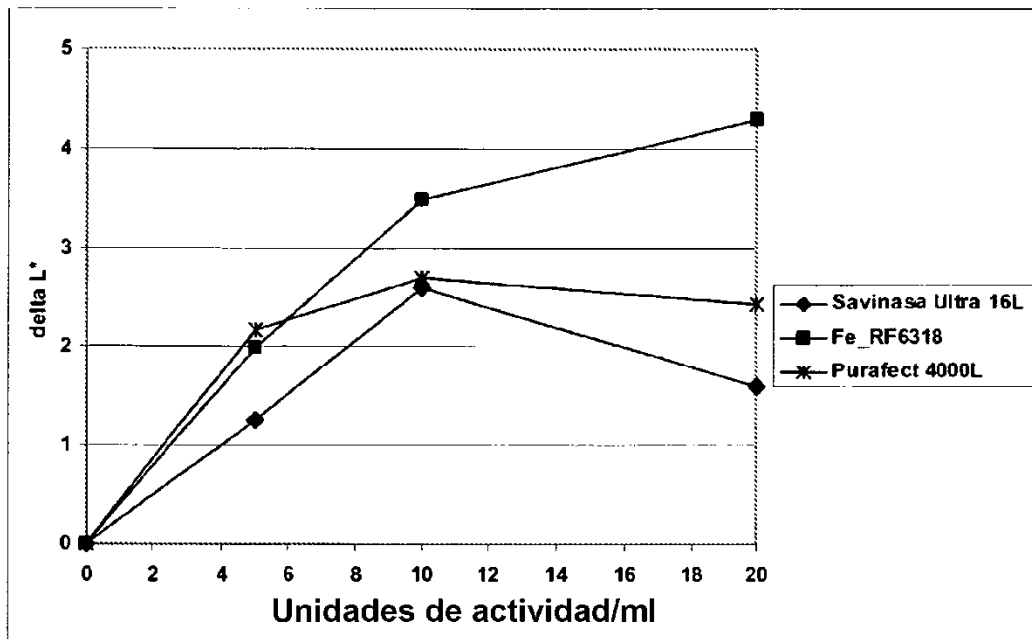


Fig. 13D

Eficacia de Fe_RF6318 recombinante
Prueba Launder Ometer
Detergente líquido para tejidos de color, 30°C
Cacao

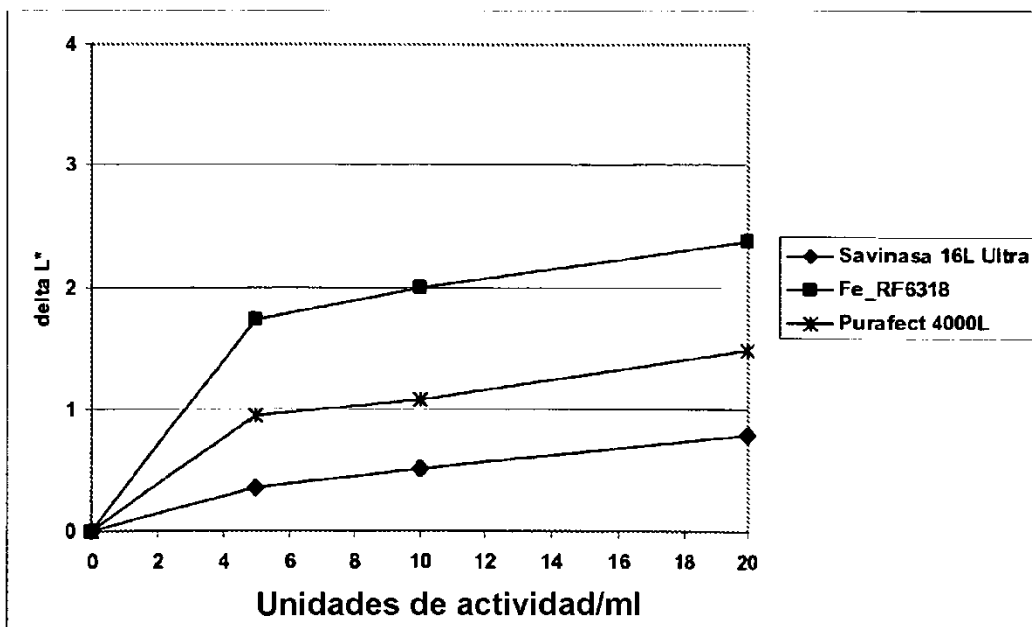
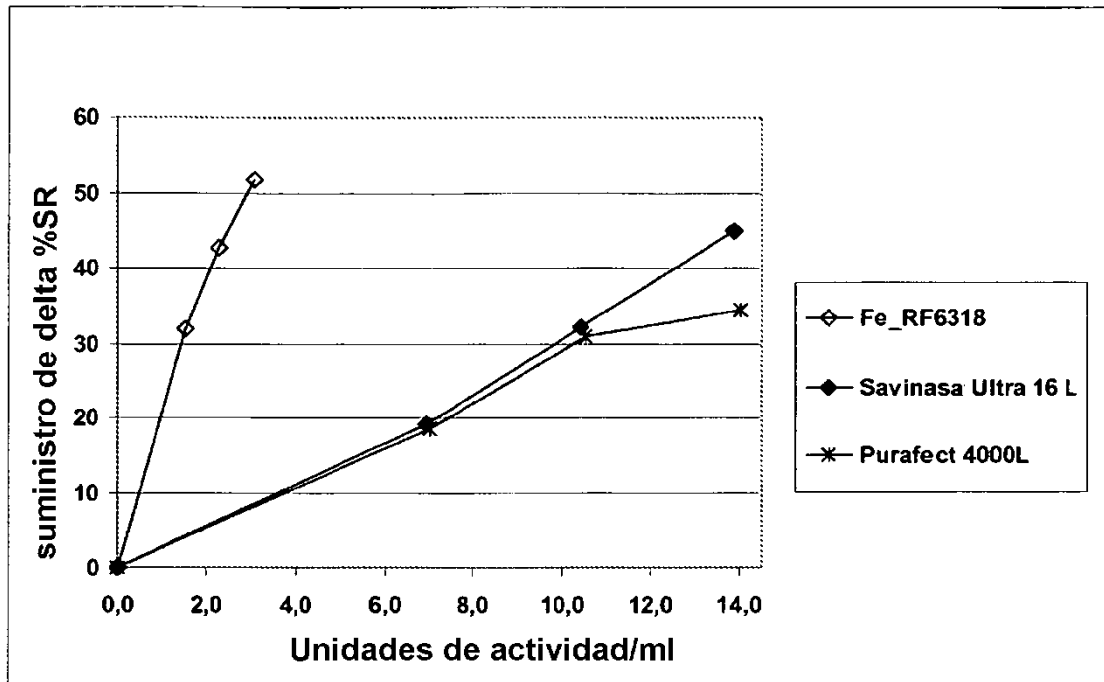


Fig. 14A

Eficiencia de eliminación de todas las manchas (delta %SR) de las manchas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8
A gran escala

**Fig. 14B**

Eficiencia de eliminación de todas las manchas (delta %SR) de las manchas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8
A gran escala

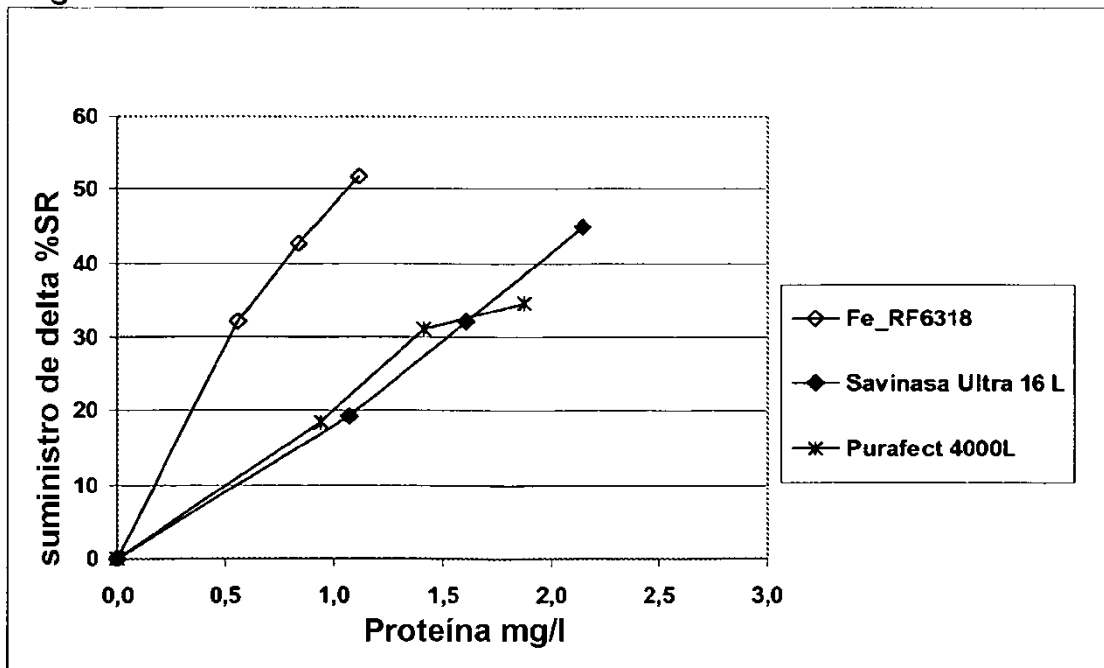
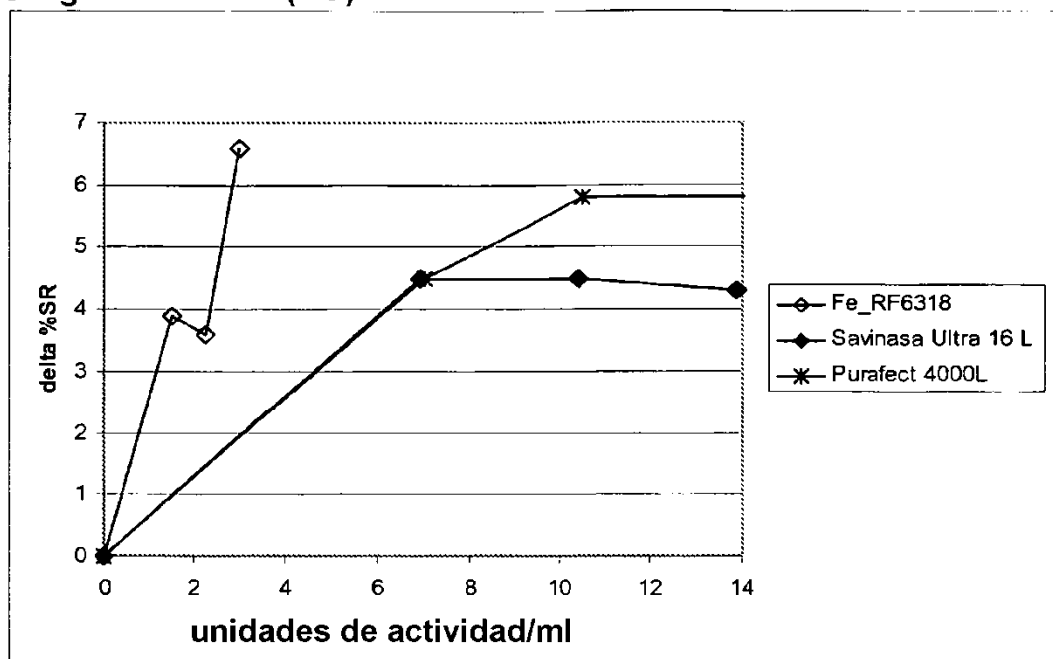


Fig. 15A

Eliminación de manchas efectuada detergente líquido principal para tejidos de color en prueba a gran escala a 30°C
Sangre/leche/tinta (CO)

**Fig. 15B**

Eliminación de manchas efectuada detergente líquido principal para tejidos de color en prueba a gran escala a 30°C
Sangre/leche/tinta (PE-CO)

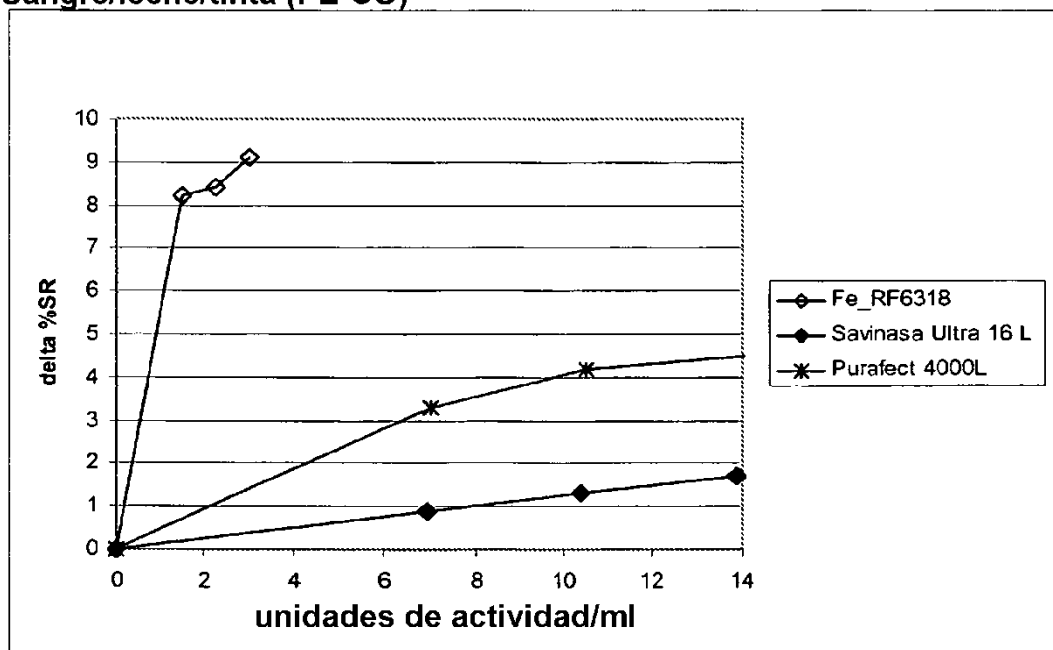
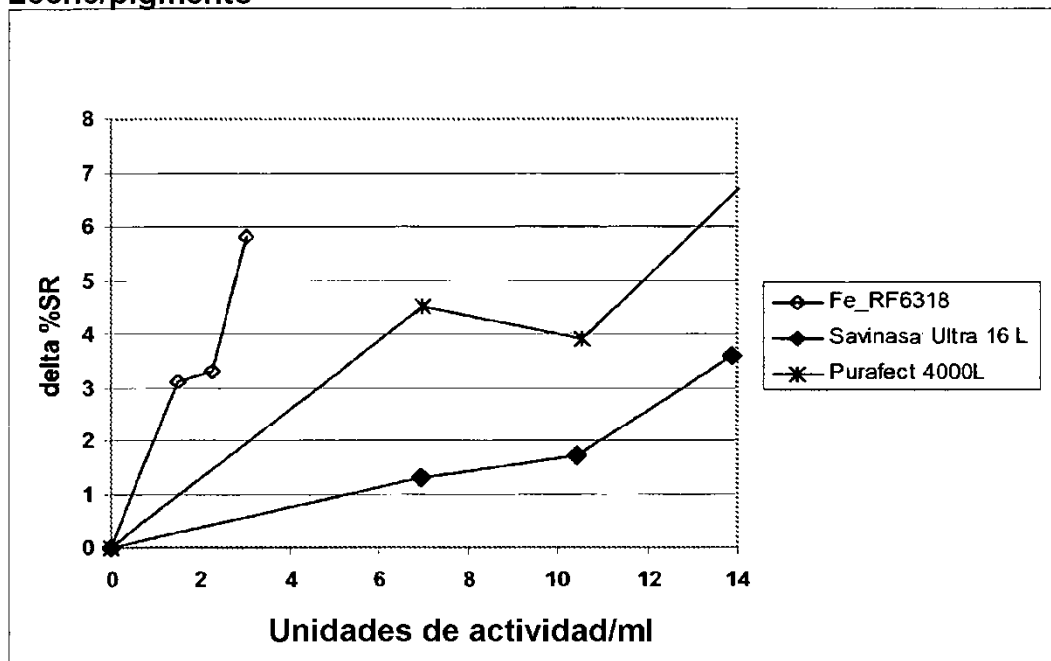


Fig. 15C

Eliminación de manchas efectuada detergente líquido principal para tejidos de color en prueba a gran escala a 30°C
Leche/pigmento

**Fig. 15D**

Eliminación de manchas efectuada detergente líquido principal para tejidos de color en prueba a gran escala a 30°C
Aceite de cacahuete/leche

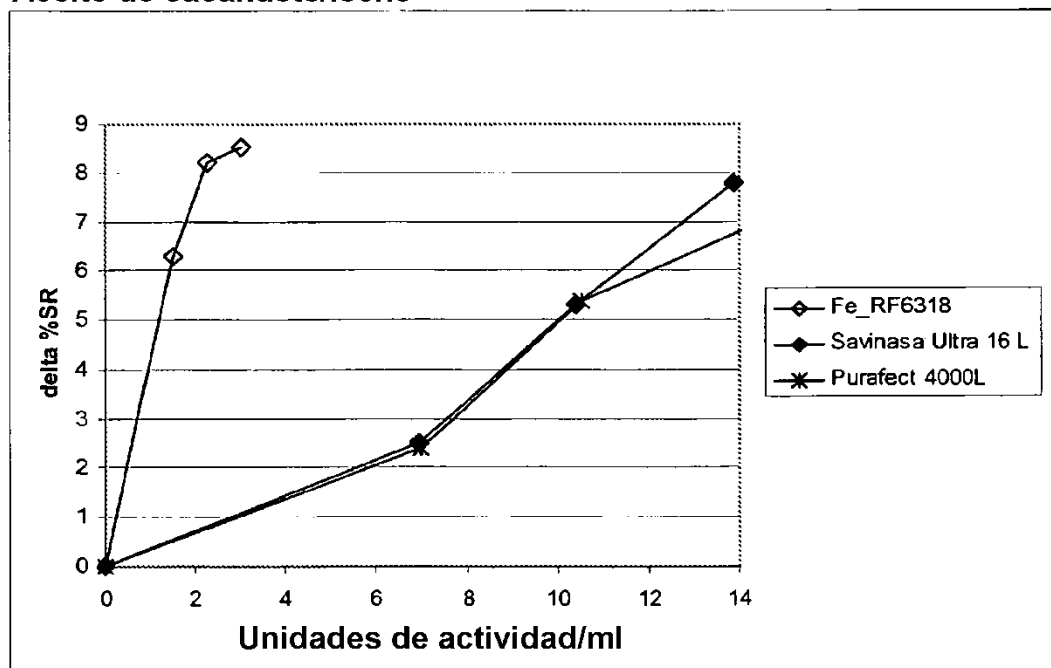


Fig. 15E

Eliminación de manchas efectuada detergente líquido principal para tejidos de color en prueba a gran escala a 30°C
Yema de huevo/pigmento

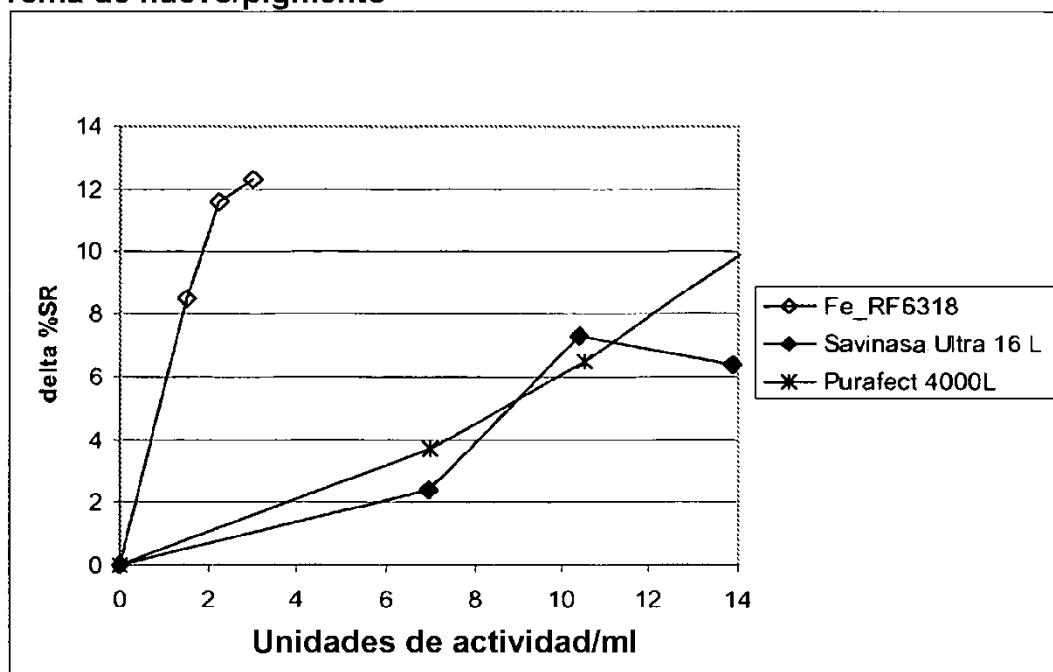
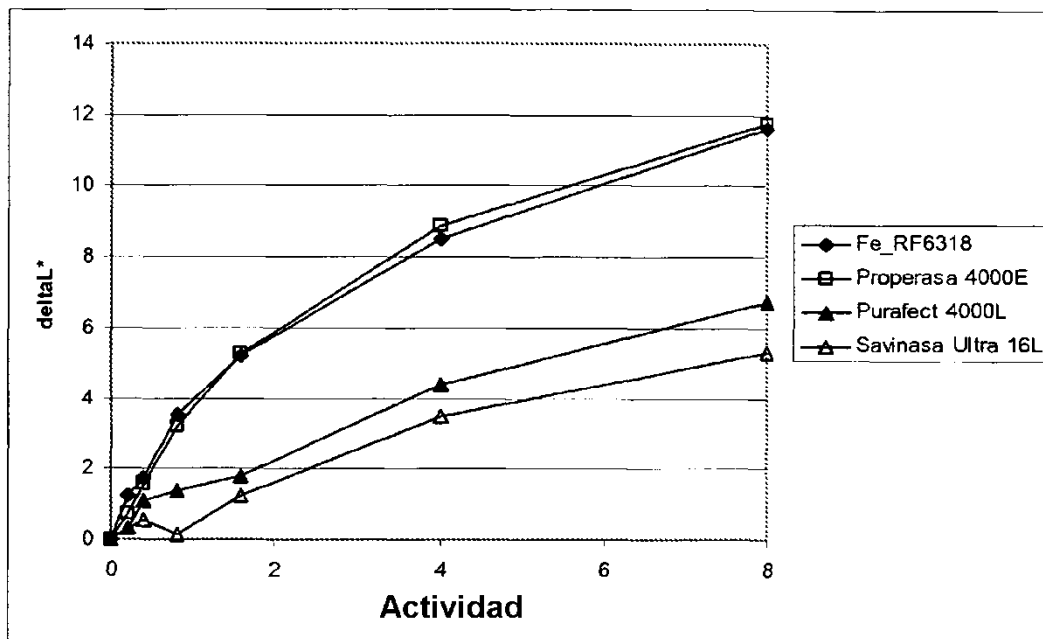


Fig. 16A

Eficacia de Fe_RF6318 recombinante
Mancha de sangre-leche-tinta
10°C, pH 9, 60 min.

**Fig. 16B**

Eficacia de Fe_RF6318 recombinante
Mancha de sangre-leche-tinta
20°C, pH 9, 60 min.

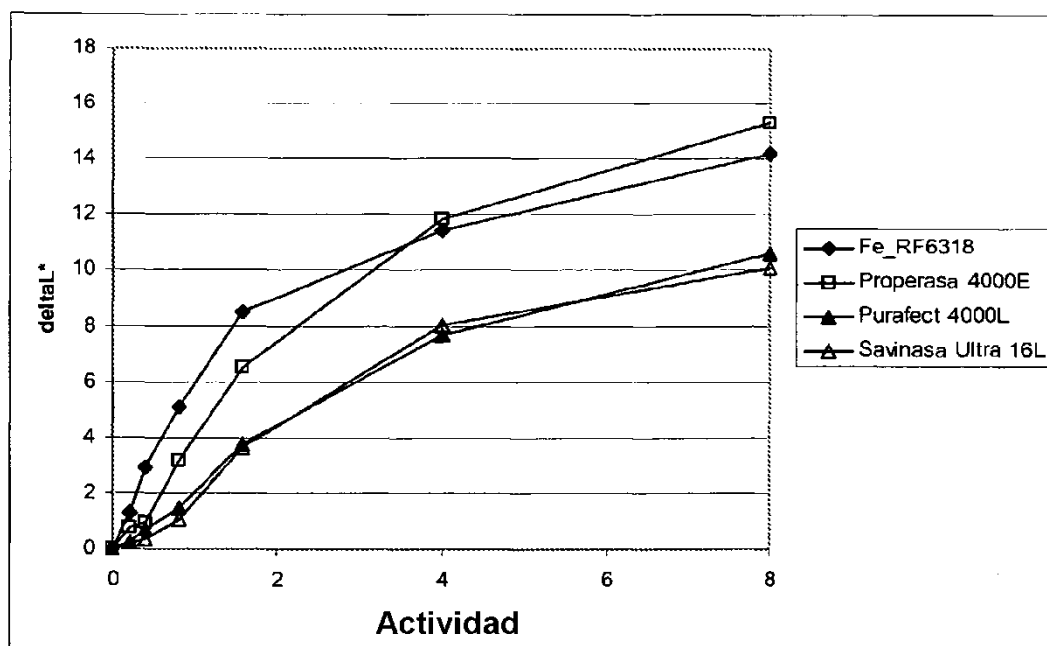
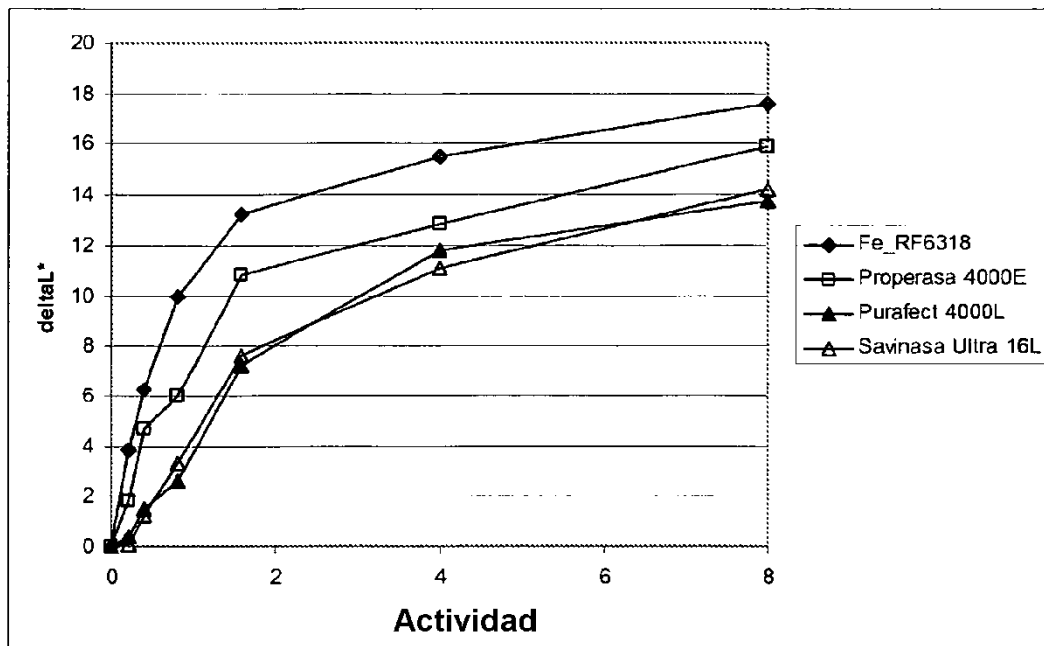


Fig. 16C

Eficacia de Fe_RF6318 recombinante
Mancha de sangre-leche-tinta
30°C, pH 9, 60 min.

**Fig. 16D**

Eficacia de Fe_RF6318 recombinante
Mancha de sangre-leche-tinta
40°C, pH 9, 60 min.

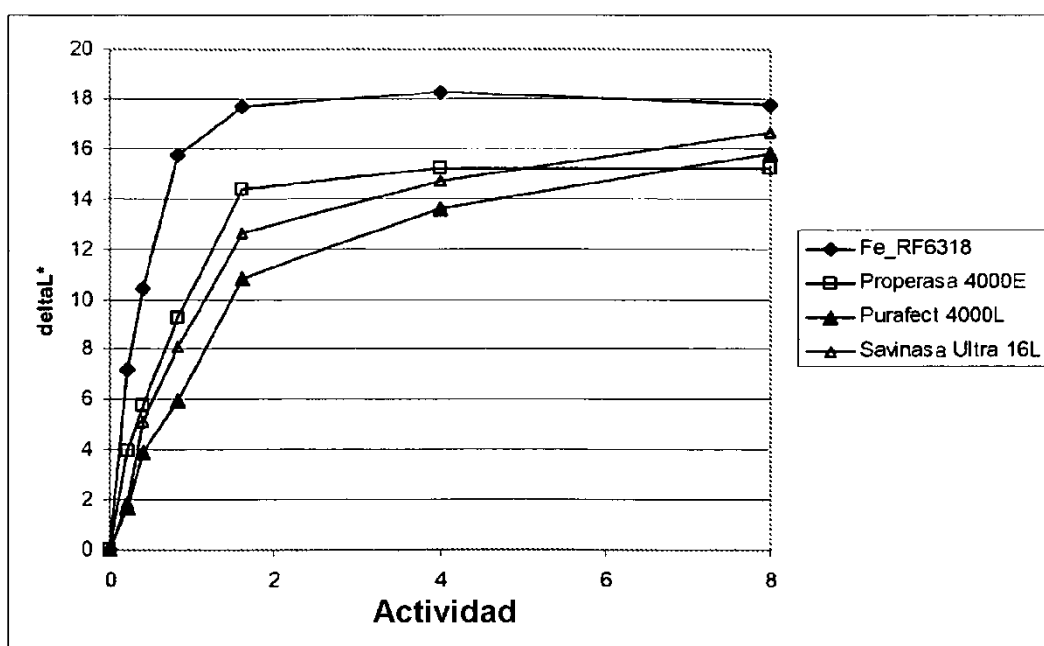
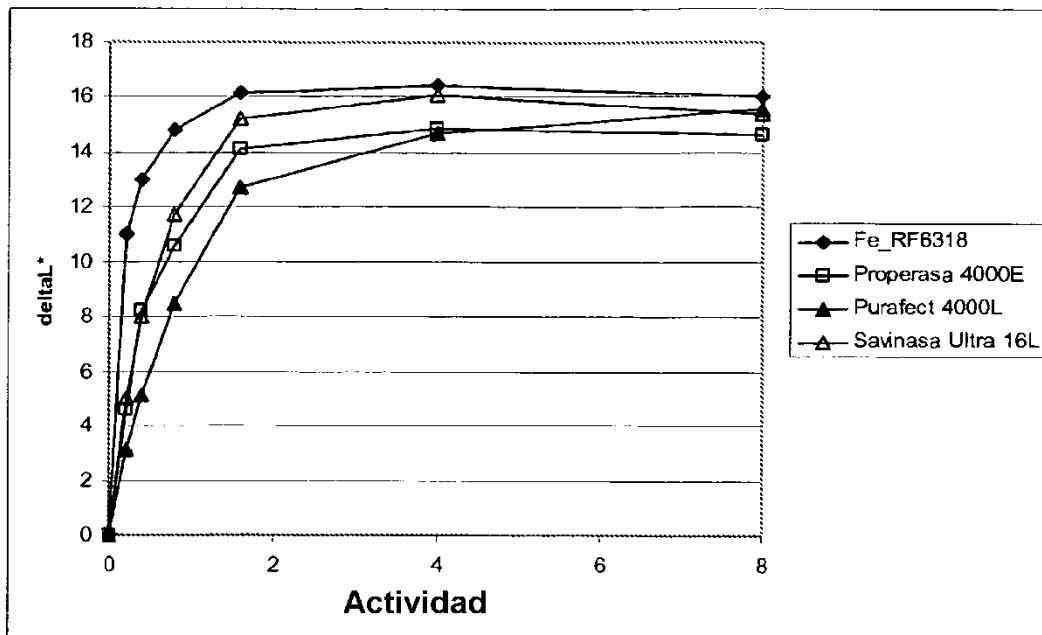


Fig. 16E

Eficacia de Fe_RF6318 recombinante
Mancha de sangre-leche-tinta
50°C, pH 9, 60 min.

**Fig. 16F**

Eficacia de Fe_RF6318 recombinante
Mancha de sangre-leche-tinta
60°C, pH 9, 60 min.

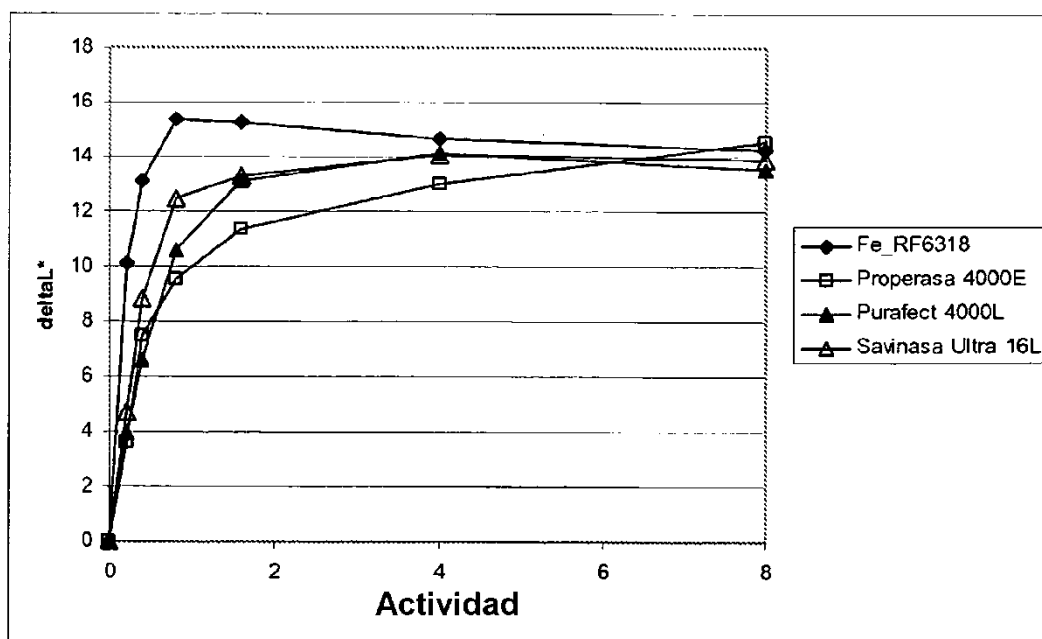
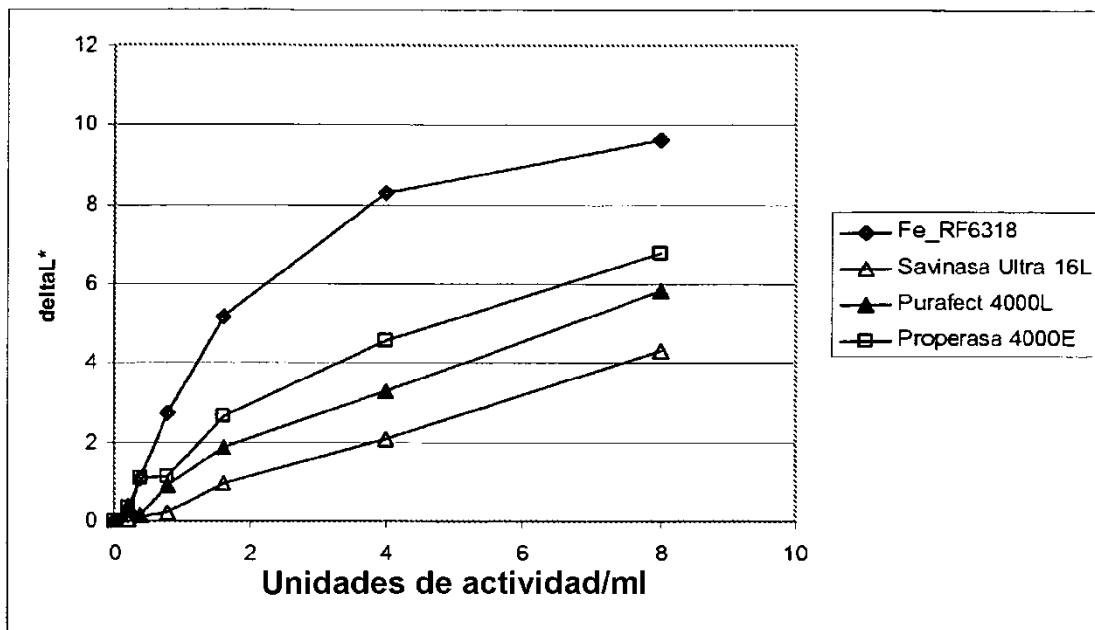


Fig. 17A**Eficacia de Fe_RF6318 recombinante****Mancha de sangre-leche-tinta****Detergente líquido principal 10°C, Concentración de detergente 3,3 g/l****Fig. 17B****Eficacia de Fe_RF6318 recombinante****Mancha de sangre-leche-tinta****Detergente líquido principal 20°C, Concentración de detergente 3,3 g/l**