

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 416 457**

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 10718152 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.04.2013 EP 2424993**

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

30 Prioridad:

**30.04.2009 FI 20095499**

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

**01.08.2013**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

**CURELL AGUILÁ, Mireia**

**ES 2 416 457 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

Serina 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 de 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<sup>®</sup>, Novozymes, DK), subtilisina 309 (Savinase<sup>®</sup>, Novozymes, DK), subtilisina 147 (Esperase<sup>®</sup>, Novozymes, DK), Purafect<sup>®</sup> (Genencor Inc., US), Kannase<sup>®</sup> (Novozymes, DK), Purafect Ox<sup>®</sup>, Properase<sup>®</sup> (Genencor Inc., US) y la BLAP de las series S y X (Henkel, DE).

Se han sido 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 nº 3.652.399 y EP 519 229 (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. saubinetti* (ATCC 20193, IFO 6608), útil en la formulación de detergentes y otras composiciones limpiadoras. La patente US nº 5.288.627 (NovoNordisk A/S, DK) divulga un preparado de endoproteasa que comprende una serina proteasa aislada que presenta identidad inmunoquímica con una proteasa procedente de *F. oxysporum* DSM 2672. 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*.

Debido a la necesidad de ahorrar energía están disminuyendo las temperaturas de lavado. Además, las exigencias del consumidor actual y el aumento en la utilización de fibras sintéticas que no pueden tolerar altas temperaturas han cambiado los hábitos de lavado hacia la utilización de bajas temperaturas de lavado. Los documentos EP 0 290 567 y EP 0 290 569 (Novo Nordisk A/S, DK) dan a conocer proteasa alcalinas a baja temperatura provenientes de actinomicetos (*Nocardioopsis dassonvillei*) y microorganismos fúngicos (*Paecilomyces marquandii*).

Los retos socioeconómicos y las reglamentos 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 de detergentes, en particular las proteasas, son ingredientes importantes en composiciones de 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 han creado una exigencia 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 (*Nocardioopsis 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 exigencias y que cambian rápidamente. Para el cumplimiento de todas las diferentes exigencias de la industria de detergentes y de los reglamentos 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 Fa\_RF7182 madura tal como se define en la SEC. ID. n°: 18 o una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 81% de identidad con la secuencia de aminoácidos de la enzima Fa\_RF7182 madura definida en la SEC. ID. n°: 18.

La enzima de la invención puede obtenerse a partir de *Fusarium acuminatum*, más preferentemente de la cepa CBS 124084 depositada.

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 12 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 pALK2530 que comprende la secuencia nucleotídica SEC. ID. n°: 12 depositada en RF7803 de *E. coli* con el número de registro DSM 22208.

Dicha enzima es codificada por una secuencia polinucleotídica aislada, que codifica un polipéptido que comprende

una secuencia de aminoácidos del polipéptido de la enzima Fa\_RF7182 madura tal como se define en la SEC. ID. nº: 18 o una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 81% de identidad con la secuencia de aminoácidos de la Fa\_RF7182 madura definida en la SEC. ID. nº: 18. Preferentemente, dicha enzima es codificada por una molécula de ácido nucleico aislada que comprende la secuencia nucleotídica SEC. ID. nº: 17.

5 La enzima serina proteasa fúngica completa de la invención está codificada por la secuencia polinucleotídica incluida en pALK2531 depositada en RF7879 de *Escherichia coli* con el número de registro DSM 22209.

10 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 *Mortiriella*.

15 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:

20 (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: 18;

25 (b) una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad de serina proteasa y por lo menos 81% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. nº: 18;

(c) una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de codificación de la secuencia nucleotídica representada en la SEC. ID. nº: 13;

30 (d) una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de codificación de la secuencia polinucleotídica contenida en DSM 22208 o DSM 22209;

(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

35 (f) una molécula de ácido nucleico que se hibrida en condiciones severas con una molécula de ácido nucleico contenida en DSM 22208, y que codifica un polipéptido que tiene actividad de serina proteasa y una secuencia de aminoácidos que presenta por lo menos 81% de identidad con la secuencia de aminoácidos representada en la SEC. ID. nº: 18.

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

45 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 *Mortiriella*. Más preferentemente, el anfitrión es *Trichoderma* o *Aspergillus*, más preferentemente un hongo filamentoso *T. reesei*.

50 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. Está comprendido asimismo en la invención 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.

55 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. Está comprendidos asimismo en la invención un preparado enzimático que puede obtenerse por el procedimiento descrito anteriormente.

60 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, xilanasas, 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 anticorrosión, constructores, agentes contra la reprecipitación, abrillantadores ópticos, productos cáusticos, abrasivos, colorantes, pigmentos, 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 para detergente en detergentes líquidos y detergentes en polvo.

### Breve descripción de los dibujos

La figura 1 presenta la secuencia nucleotídica del gen *Fa prtS8A* de RF7182 de *Fusarium acuminatum* y la secuencia deducida de aminoácidos. 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 *Fa\_RF7182* 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 *Fa\_RF7182* se destacan en fondo gris.

La figura 1A presenta la secuencia nucleotídica del gen *Fa prt8A* (nucleótidos 1 a 900), la región de la secuencia que codifica la secuencia de aminoácidos desde Met1 a Val278 de la proteína *Fa\_RF7182*.

La figura 1B presenta la secuencia nucleotídica del gen *Fa prt8A* (nucleótidos 901 a 1261), la región de la secuencia que codifica los aminoácidos Leu279 a Ala415 de la proteína *Fa\_RF7182*.

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

La figura 3 presenta la proteína *Fa\_RF7182* parcialmente purificada recombinante analizada en gel de SDS-PAGE al 12%. Banda 1. Muestra de la *Fa\_RF7182* parcialmente purificada, Banda 2. Marcador MW (Bench Mark Global Protein, Invitrogen).

La figura 4A describe el perfil de temperatura de la proteína *Fa\_RF7182* 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 *Fa\_RF7182* recombinante. El tampón utilizado fue el tampón Britton-Robinson 40 mM, a pH entre 6 y 12 y la temperatura de reacción fue de 50°C. El tiempo de reacción fue de 15 min, se utilizó caseína como sustrato. Los puntos de datos son los promedios de tres mediciones independientes.

La figura 5 describe la eficacia de la proteína *Fa\_RF7182* 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<sup>®</sup> 16L (Novozymes A/S, DK) y Purafect<sup>®</sup> 4000L (Genencor Inc., US).  $\Delta L^*$  (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 *Fa\_RF7182* 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<sup>®</sup> Ultra 16L y Purafect<sup>®</sup> 4000L.  $\Delta L^*$  (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 7 describe la eficacia de *Fa\_RF7182* recombinante con manchas de sangre/leche/tinta (Art. 117, EMPA) en presencia de detergente en polvo (Art. 601, EMPA) a 40°C y pH 10. Se utilizó preparado comercial Purafect<sup>®</sup> 4000L para comparación. En el eje x se muestra la dosis de enzima (actividad/ml), en el eje y  $\Delta L^*$  (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 8 muestra la eficacia de la proteína *Fa\_RF7182* recombinante con manchas de sangre/leche/tinta (Art.

117, EMPA) y detergente líquido Ariel Sensitive (con enzimas) a 40°C, aproximadamente a pH 7,9, 60 minutos. Se utilizó preparado comercial Purafect® 4000L para comparación.  $\Delta L^*$  (delta L\*) = valor L\* de luminosidad del tejido tratado con enzima - valor L\* de luminosidad del tejido tratado solo con tampón (blanco enzimático).

5 La figura 9 muestra la eficacia de la proteína Fa\_RF7182 recombinante con manchas de sangre/leche/tinta (Art 117, EMPA) con diferentes concentraciones de detergente de base líquido para tejidos coloreados a 30°C. Se utilizaron preparados comerciales Purafect® 4000L y Savinase® Ultra 16L para comparación.  $\Delta L^*$  (delta L\*) = valor L\* de luminosidad del tejido tratado con enzima - valor L\* de luminosidad del tejido tratado solo con tampón (blanco enzimático).

10 La figura 9A presenta la eficacia con una concentración de detergente de 5 g/l y pH 7,5.  
La figura 9B presenta la eficacia con la concentración de detergente de 5 g/l (dosis de enzima calculada como cantidad de proteína).

15 La figura 9C presenta la eficacia con una concentración de detergente de 3,3 g/l y pH 7,4.  
La figura 9D presenta la eficacia con una concentración de detergente de 1 g/l y pH 7,3.

20 La figura 10 presenta la eficacia de la proteína Fa\_RF7182 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.  $\Delta L^*$  (delta L\*) = valor L\* de luminosidad del tejido tratado con enzima - valor L\* de luminosidad del tejido tratado solo con tampón (blanco enzimático).

25 La figura 10A presenta la eficacia con la concentración de detergente de 5 g/l y pH 8.  
La figura 10B presenta la eficacia con una concentración de detergente de 5 g/l (dosis de enzima calculada como proteína).

30 La figura 10C presenta la eficacia con una concentración de detergente de 3,3 g/l y pH 7,9  
La figura 10D presenta la eficacia con una concentración de detergente de 1 g/l y pH 7,6.

35 La figura 11 presenta la eficacia de la proteína Fa\_RF7182 recombinante en diferentes manchas en las pruebas en Launder Ometer con detergente base líquido para tejidos de color a 30°C.

40 Se utilizaron para comparación preparados comerciales Savinase Ultra 16L y Purafect® 4000 L.  $\Delta L^*$  (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 en PE-algodón con manchas de sangre/leche/tinta (Art. 117, EMPA).

La figura 11B presenta la eficacia en algodón con manchas de sangre/leche/tinta (Art. 116, EMPA)

45 La figura 11C presenta la eficacia en manchas de hierba (Art. 164, EMPA).

La figura 11D presenta la eficacia en manchas de cacao (Art. 112, EMPA).

50 La figura 12 describe la eficiencia de eliminación de todas las manchas (delta% SR) del preparado enzimático Fa\_RF7182 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.

55 La figura 12A presenta la eficiencia de la eliminación de todas las manchas cuando los preparados de proteasa se administraban según la actividad.

La figura 12B presenta la eficiencia total de la eliminación de todas las manchas cuando los preparados de proteasa se administraban según la cantidad de proteína.

60 La figura 13 describe el efecto de eliminación de manchas con detergente líquido base para tejidos de color en la prueba a gran escala a 30°C.

La figura 13A presenta el efecto de eliminación de manchas de chocolate leche/pigmento en algodón (C-03-030/CFT).

65 La figura 13B presenta el efecto de eliminación de manchas de sangre/leche/tinta en algodón (C-05-059b/CFT).

La figura 13C presenta el efecto de eliminación de manchas de sangre/leche/tinta en PE-algodón (C-05-014/CFT).

5 La figura 13D presenta el efecto de eliminación de manchas de aceite de cacahuete/leche en algodón (C-05-014/CFT).

La figura 13E presenta el efecto de eliminación de manchas de yema de huevo/pigmento en algodón (CS-38-010/CFT).

10 La figura 14 describe la eficacia de la proteína Fa\_RF7182 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<sup>®</sup> 16L (Novozymes A/S, DK), Purafect<sup>®</sup> 4000L (Genencor Inc., US) y Properase<sup>®</sup> 4000E (Genencor Inc., US).  $\Delta L^*$  (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 14A presenta la eficacia de la proteína Fa\_RF7182 recombinante y preparados comerciales de proteasas a 10°C.

20 La figura 14B presenta la eficacia de la proteína Fa\_RF7182 recombinante y preparados comerciales de proteasas a 20°C.

La figura 14C presenta la eficacia de la proteína Fa\_RF7182 recombinante y preparados comerciales de proteasas a 30°C.

25 La figura 14D presenta la eficacia de la proteína Fa\_RF7182 recombinante y preparados comerciales de proteasas a 40°C.

30 La figura 14E presenta la eficacia de la proteína Fa\_RF7182 recombinante y preparados comerciales de proteasas a 50°C.

La figura 14F presenta la eficacia de la proteína Fa\_RF7182 recombinante y preparados comerciales de proteasas a 60°C.

35 La figura 15 presenta la eficacia de la proteína Fa\_RF7182 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 comparación los preparados comerciales Savinase<sup>®</sup> Ultra 16L, Purafect<sup>®</sup> 4000L y Properase<sup>®</sup> 4000 E.  $\Delta L^*$  (delta L\*) = valor L\* de luminosidad del tejido tratado con enzima - valor L\* de luminosidad del tejido tratado solo con tampón (blanco enzimático).

40 La figura 15A presenta la eficacia a 10°C.

La figura 15B presenta la eficacia a 20°C.

45 **LISTADO DE SECUENCIAS**

SEC. ID. nº: 1 Secuencia de un péptido aminoterminal nº 3811 de la proteasa RF7182 de *Fusarium acuminatum*.

50 SEC. ID. nº: 2 Secuencia de un péptido tríptico 1609.880 de la proteasa RF7182 de *Fusarium acuminatum*.

SEC. ID. nº: 3 Secuencia de un péptido tríptico 1793.957 de la proteasa RF7182 de *Fusarium acuminatum*.

SEC. ID. nº: 4 Secuencia de un péptido tríptico 743.494 de la proteasa RF7182 de *Fusarium acuminatum*.

55 SEC. ID. nº: 5 Secuencia de un péptido tríptico 2103.832 (inicio 2045.06) de la proteasa RF7182 de *Fusarium acuminatum*.

SEC. ID. nº: 6 Secuencia de un péptido tríptico 2103.832 (inicio 1406.57) de la proteasa RF7182 de *Fusarium acuminatum*.

60 SEC. ID. nº: 7 Secuencia de un péptido tríptico 3662.692 de la proteasa RF7182 de *Fusarium acuminatum*.

SEC. ID. nº: 8 Secuencia del cebador oligonucleotídico PRO123 procedente de la SEC. ID. nº: 3 peptídica.

65 SEC. ID. nº: 9 Secuencia del cebador oligonucleotídico PRO122 procedente de la SEC. ID. nº: 6 peptídica.

SEC. ID. nº: 10 Secuencia del cebador oligonucleotídico PRO60 con serina proteasa.

SEC. ID. nº: 11 Secuencia del cebador oligonucleotídico PRO61 con serina proteasa.

5 SEC. ID. nº: 12 Secuencia del fragmento de RCP obtenida utilizando los cebadores PRO123 (SEC. ID. nº: 8) y PRO61 (SEC. ID. nº: 11) y ADN genómico de RF7182 de *Fusarium acuminatum* como plantilla.

SEC. ID. nº: 13 Secuencia nucleotídica del gen (*Fa prtS8A*) de la proteasa RF7182 completa de *Fusarium acuminatum*.

10 SEC. ID. nº: 14 Secuencia de aminoácidos deducida de la proteasa RF7182 completa de *Fusarium acuminatum* (Fa\_RF7182) incluyendo los aminoácidos Met1 a Ala415.

15 SEC. ID. nº: 15 Secuencia nucleotídica que codifica la secuencia de aminoácidos de la forma proenzimática de la proteasa RF7182 de *Fusarium acuminatum*.

SEC. ID. nº: 16 Secuencia de amino ácidos de la forma proenzimática de la proteasa RF7182 de *Fusarium acuminatum* que incluye los aminoácidos Ala21 a Ala 415 de la Fa\_RF7182 completa definida en la SEC. ID. nº: 14.

20 SEC. ID. nº: 17 Secuencia nucleotídica que codifica la secuencia de aminoácidos de la forma madura de la proteasa RF7182 de *Fusarium acuminatum*.

SEC. ID. nº: 18 Secuencia de aminoácidos de la forma madura de la proteasa RF7182 de *Fusarium acuminatum*, que incluye los aminoácidos Ala127 a Ala415 de la Fa\_RF7182 completa definida en la SEC. ID. nº: 14.

25

#### Depósitos

RF7182 de *Fusarium acuminatum* se depositó en la Centraalbureau Voor Schimmelcultures at Uppsalaalan 8, 3508 AD, Utrecht, Holanda el 28 de enero de 2009 y se le asignó el número de registro CBS 124084.

30

La cepa RF7803 de *E. coli* que incluye el plásmido pALK2530 se depositó en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Inhoffenstrasse 7 b, D-38124 Braunschweig, Alemania 21 de enero de 2009 y se le asignó el número de registro DSM 22208.

35

La cepa RF7879 de *E. coli* que incluye el plásmido pALK2531 se depositó en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Inhoffenstrasse 7 b, D-38124 Braunschweig, Alemania 21 de enero de 2009 y se le asignó el número de registro DSM 22209.

#### **Descripción detallada**

40

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 70°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.

50

Por "serina proteasa" o "serina endopeptidasa" o "serina endoproteinasa" en relación con esta invención se entiende una enzima clasificada como EC 3.4.21 por la Nomenclatura de la International Union of Biochemistry Molecular Biology. 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, Washington University of Medicine, St. Louis, MO, US). 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.

60

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.

65

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.

5 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).

10 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).  
15 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.

20 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" hacen referencia a 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 es aproximadamente 60°C. (Rao *et al.*, 1998).

25 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.

35 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.

40 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.

50 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).

55 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.  
60 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.  
65

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 de 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 del pI para la enzima. El pH en la aplicación de detergente suele ser alcalino, pH 7-9 para detergentes líquidos y pH 9-10,5 cuando se utilizan detergentes en polvo. El pI puede determinarse por enfoque isoelectrico en un gel inmovilizado en gradiente de pH compuesto de poli(acrilamida), 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](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<sup>®</sup> 4000L (Genencor Inc., US).

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 15 es evidente que la eficacia de la serina proteasa fúngica Fa\_RF7182 en distintas condiciones y expuesta a distintos tratamientos, en multitud de diferentes manchas en distintos materiales textiles, medidos como delta L\* o suma de delta% SR, es, con mucho, mejor que la eficacia de los productos comerciales, Savinase<sup>®</sup> Ultra 16L (Novozymes A/S, DK), Purafect<sup>®</sup> 4000L (Genencor Inc, US) y Properase<sup>®</sup> 4000E (Genencor Inc., US). En particular, el efecto de la eliminación de manchas de dicha serina proteasa fúngica Fa\_RF7182 en intervalos de temperaturas bajas a moderadas tales como de 10°C a 40°C es notablemente mayor que con Savinase<sup>®</sup> Ultra 16L y Purafect<sup>®</sup> 4000L.

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 exigencias 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.

5 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 Fa\_RF7182 madura que tiene la secuencia de aminoácidos SEC. ID. nº: 18 o una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos el 81% de identidad con la secuencia de aminoácidos SEC. ID. nº: 18 o por lo menos 80% con la secuencia de aminoácidos SEC. ID. nº: 14. Las enzimas preferidas presentan por lo menos el 81%, preferentemente por lo menos el 83%, más preferentemente por lo menos el 85%, aún más preferentemente por lo menos el 87% de identidad. Aún más preferentemente las secuencias de aminoácidos muestran por lo menos el 89% o por lo menos el 91%, 92%, 93%, 95% o 97%, más preferentemente por lo menos el 98%, aún más preferentemente 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos SEC. ID. nº: 18. Las identidades de las dos enzimas se comparan dentro de las regiones de de secuencias correspondientes, por ejemplo, dentro de la región completa o madura de la serina proteasa.

15 La serina proteasa de la presente invención es la Fa\_RF7182 marcada, una serina proteasa aislada procedente de *Fusarium acuminatum* y es un miembro del clan SB, familia 8 de las serina endoproteinasas.

20 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](http://www.ebi.ac.uk/Tools/Clustalw)). La matriz utilizada es la siguiente: BLOSUM, Gap abierta: 10, extensión del hueco: 0,5.

30 Preferentemente, la serina proteasa fúngica puede obtenerse a partir de *Fusarium*, más preferentemente de *Fusarium acuminatum*. 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 124084.

35 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 Fa\_RF7182 madura tal como se define en la SEC. ID. nº: 18. 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 Ala127 a Ala415 de la proteasa completa caracterizada en la SEC. ID. nº: 13. Por lo tanto, dentro del alcance de la invención está también la enzima Fa\_RF7182 completa que tiene la SEC. ID. nº: 13, 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: 15.

45 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 Fa\_RF7182 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).

50 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 (de aproximadamente 10% de actividad máxima), preferentemente de 30°C a 60°C (por lo menos aproximadamente 30% de la actividad máxima), y más preferentemente entre 40°C y 50°C (por lo menos 60% de la actividad máxima), aún más preferentemente a 50°C (actividad máxima, Fa\_RF7182) cuando se mide a pH 9 utilizando un tiempo de reacción de 15 min y caseína como sustrato como se describe en el ejemplo 5.

55 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 12, lo que evidencia por lo menos el 10% de la actividad máxima a pH 7 a 50°C utilizando el tiempo de reacción de 15 min como se describe en el ejemplo 5. Preferentemente, En particular, la enzima tiene el pH óptimo en el intervalo de pH 6 a pH 11 (por lo menos el 40% de la actividad máxima). En particular, el pH óptimo está comprendido entre pH 6 y pH10 (aproximadamente 55% de la actividad máxima), y más preferentemente entre pH6 y pH 9 (por lo menos el 80% de la actividad máxima) y aún más preferentemente a pH 7 a 50°C utilizando un tiempo de reacción de 15 min como se describe en el ejemplo 5 cuando se utiliza caseína como sustrato.

65 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<sup>®</sup> 4000L (Genencor Inc., US). En presencia de un detergente la enzima de la invención funciona entre 10°C y 60°C, preferentemente entre 20°C y 50°C, más preferentemente a 50°C o inferior. La enzima Fa\_RF7182 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.

5 La enzima serina proteasa de la invención tiene un pl, que como se predijo a partir de la secuencia deducida de aminoácidos está entre pl 8,8 y pl 9,5, preferentemente entre pl 8,9 y pl 9,3. El pl predicho de la enzima Fa\_RF7182 de la invención es pl 9,1.

10 Los oligonucleótidos sintetizados en la secuencia de aminoácidos de los péptidos del terminal N o trópicos 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.

20 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 pALK2530 que comprende la secuencia nucleotídica SEC. ID. n°: 12 en RF7803 de *E. coli*, depositada en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) con el número de registro DSM 22208.

25 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.

30 La hibridación con una sonda de ADN, tal como, por ejemplo, la SEC. ID. n°: 12 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<sub>m</sub>) de un híbrido perfecto, la T<sub>m</sub> 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.

40 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. n°: 18, o un polipéptido que tiene por lo menos 81% para la secuencia de aminoácidos SEC. ID. n°: 18 o por lo menos 80% para la secuencia de aminoácidos SEC. ID. n°: 13. Las enzimas preferidas presentan por lo menos 81%, preferentemente por lo menos 83%, más preferentemente por lo menos 85%, aún más preferentemente por lo menos el 87% de identidad. Aún más preferentemente las secuencias de aminoácidos muestran por lo menos 89%, 91%, 93% o por lo menos 97%, más preferentemente por lo menos 98%, aún más preferentemente 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. n°: 18. 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.

50 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. n°: 14.

55 Además, dentro del alcance de la invención existe 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. n°: 16.

60 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 Fa\_RF7182 que tiene la SEC. ID. n°: 18.

65 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. n°: 17 que codifica la forma madura de la enzima Fa\_RF7182 (SEC. ID. n°: 18).

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: 13 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 regiones de intrón.

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: 15, que codifica la forma de proenzima Fa\_RF7182.

Según otra forma de realización preferida de la invención, la serina proteasa fúngica está codificada por la secuencia polinucleotídica incluida en el pALK2531 depositada en RF7879 de *E. coli* con el número de registro DSM 22209.

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*, *Chrysosporium*, *Neurospora*, *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 filamentosos del género *Trichoderma* o *Aspergillus*, tal como las cepas *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: 18;
- (b) una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad de serina proteasa y por lo menos 81% con la SEC. ID. nº: 18;
- (c) una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de codificación de la secuencia nucleotídica representada en la SEC. ID. nº: 13;
- (d) una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de codificación de la secuencia polinucleotídica contenida en DSM 22208 o DSM 22209;
- (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 DSM 22208, y que codifica un polipéptido que tiene actividad de serina proteasa y una secuencia de aminoácidos que presenta por lo menos 81% de identidad con la secuencia de aminoácidos representada en la SEC. ID. nº: 18.

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 *Fa prtS8A* que codifica el polipéptido Fa\_RF7182 se describe en el ejemplo 3. En resumen, el fragmento de RCP de 753 pb obtenido mediante la utilización de las secuencias de los cebadores PRO123 de

oligonucleótidos degenerados (SEC. ID. nº: 8) y PRO61 (SEC. ID. nº: 11) se utilizó para aislar el gen *Fa prt8A* proveniente de RF7182 de *Fusarium acuminatum* en el vector pBluescript II KS+. El gen *Fa prtS8A* completo de *Fusarium acuminatum* se incluyó en el plásmido pALK2531 depositado en *E. coli* para la colección de cultivos DSMZ con el número de registro DSM 22209. La secuencia de aminoácidos deducida de la serina proteasa se analizó a partir de la secuencia de ADN.

La secuencia nucleotídica de *Fa prtS8A* de serina proteasa de *Fusarium acuminatum* (SEC. ID. nº: 13) y la secuencia deducida (SEC. ID. nº: 14) se presentan en las figuras 1A y 1B. La longitud del gen es de 1353 pb (incluyendo el codón de terminación). Se encontraron dos supuestos intrones de 51 pb y 54 pb de longitud. La secuencia de proteína deducida se compone de 415 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 Arg126. La masa molecular predicha fue de 29 kDa para el polipéptido maduro y el pl predicho fue 9,1. 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 (Asn79 y Asn258), pero según CBS Server NetNGlyc V1.0 sólo es probable el sitio en la posición Asn79 (situado en el pro-péptido). Se buscaron las homologías con las secuencias de la proteasa publicadas utilizando el programa BLASTX, versión 2.2.9 en el NCBI (National Center for Biotechnology Information) (Altschul *et al.*, 1990). Los valores de identidad de la secuencia de *Fa\_RF7182* madura con las regiones maduras 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](http://www.ebi.ac.uk/Tools/Clustalw)) y se muestran en la Tabla 3.

La serina proteasa *Fa\_RF7182* de la presente invención presentó la mayor homología con la proteína hipotética PH-1 de *Gibberella zeae* (*Fusarium graminearum*), etiqueta de locus FG03315.1 (EMBL nº de registro XP\_383491, no publicada), con serina endopeptidasa CECT 2413 de *Hypocrea lixii* (*Trichoderma harzianum*) (EMBL nº de registro CAL25508, Suárez *et al.*, 2007) y con el precursor S08.066 de proteinasa alcalina de *T. atroviride*, ALP (EMBL nº de registro M87516, Geremia *et al.* 1993), este último dado a conocer como una secuencia SEC. ID. nº: 313 de aminoácidos en el documento US 60/818.910 (Catalyst Bioscience Inc.). La identidad con la proteína hipotética de *G. zeae* estaba en el 79% de toda la enzima. Cuando se alinearon los polipéptidos maduros que carecen de la secuencia señal y el propéptido, la identidad fue del 80%. La identidad con serina endopeptidasa CECT 2413 de *H. lixii* fue del 73% (enzima completa) y del 79% (enzima madura). La identidad con ALP de *T. atroviride* fue del 71% (enzima completa) y 76% (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 *Fa\_RF7182* caracterizada en la SEC. ID. nº: 18, es decir, aminoácidos Ala127 a Ala415 de la serina proteasa completa de SEC. ID. nº: 14.

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 81% de identidad con la secuencia de aminoácidos SEC. ID. nº: 18 o por lo menos 80% con la secuencia de aminoácidos SEC. ID. nº: 14. Las enzimas preferidas presentan por lo menos 81%, preferentemente por lo menos 83%, más preferentemente por lo menos 85%, aún más preferentemente por lo menos 87% de identidad. Aún más preferentemente las secuencias de aminoácidos presentan por lo menos 89% o por lo menos 91%, 92%, 93%, 95% o 97%, más preferentemente por lo menos 98%, aún más preferentemente 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. nº: 18. Las identidades de las dos enzimas se comparan dentro de las regiones de la secuencia correspondiente, por ejemplo, dentro de la región madura o completa de la serina proteasa.

La molécula de ácido nucleico es preferentemente una molécula que comprende la secuencia de codificación representada en la SEC. ID. nº: 13, 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 22208 o DSM 22209. DSM 22208 lleva la secuencia nucleotídica del fragmento de RCP (SEC. ID. nº: 12) utilizada en la clonación del gen *Fa prtS8A* completo. DSM 22209 lleva la secuencia nucleotídica del gen *Fa prtS8A* completo (SEC. ID. nº: 13).

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 pALK2530 depositado en *E. coli* con el número de registro DSM 22208 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 81% de identidad con la secuencia de aminoácidos representada en la SEC. ID. nº: 18. El ADN que se hibrida se puede originar a partir de un hongo que pertenece a la especie *Fusarium* o puede originarse a partir 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: 12, SEC. ID. nº: 13, SEC. ID. nº: 15 o SEC. ID. nº: 17 y análogos de las mismas.

5 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 procarionta 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.

20 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.

25 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.

30 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.

35 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.

40 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, bien conocidas en la técnica.

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

La proteasa Fa\_RF7182 de la invención se expresó con su propia secuencia señal procedente del activador *cbhI* (*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 *cbh1* y el marcador *amdS* para la selección de los transformantes de las células no transformadas.

60 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.

65 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. Los sistemas de anfitrión para la producción y expresión adecuados son, por ejemplo, el sistema de producción desarrollado para el hongo filamentosamente anfitrión *Trichoderma*

5 *reesei* (EP 244 234), o sistemas de producción de *Aspergillus*, tales como cepas del tipo *A. oryzae* o *A. niger* (documento WO 9708325, patentes US nº 5.843.745, 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*.

15 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.

20 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.

25 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.

30 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 las células del medio de cultivo y la obtención del sobrenadante que tiene actividad de serina proteasa.

35 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.

40 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.

45 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 anfitrion o pueden añadirse al sobrenadante de cultivo después del proceso de producción.

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

55 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.

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

65 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.

Para oxidar y degradar compuestos orgánicos se utiliza agente blanqueante. Los ejemplos de sistemas químicos blanqueantes adecuados son las fuentes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 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

5 enzimas oxidantes, tales como lacasas o peroxidasas. Muchas lacasas no funcionan eficazmente en ausencia de mediadores.

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

10 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.

Según una forma de realización preferida de la invención, dicho preparado enzimático está en la forma de líquido,

15 polvo o granulado.

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. Las proteasas se utilizan en panificación por ejemplo, en la destrucción de la red de gluten para producir masas no elásticas con muy poca retención de agua. En otras aplicaciones alimentarias, las proteínas alimentarias se hidrolizan utilizando proteasas con la ayuda de, por ejemplo, proteínas disolventes, derritiendo (extrayendo más proteínas de los huesos de animales), creando nuevos sabores, reduciendo el amargor, cambiando las propiedades emulsionantes, generando péptidos bioactivos y reduciendo el poder alérgico de las proteínas, tratando las levaduras o la leche. Los sustratos incluyen proteínas animales, vegetales y microbianas.

20 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. Las proteasas se utilizan en panificación por ejemplo, en la destrucción de la red de gluten para producir masas no elásticas con muy poca retención de agua. En otras aplicaciones alimentarias, las proteínas alimentarias se hidrolizan utilizando proteasas con la ayuda de, por ejemplo, proteínas disolventes, derritiendo (extrayendo más proteínas de los huesos de animales), creando nuevos sabores, reduciendo el amargor, cambiando las propiedades emulsionantes, generando péptidos bioactivos y reduciendo el poder alérgico de las proteínas, tratando las levaduras o la leche. Los sustratos incluyen proteínas animales, vegetales y microbianas.

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 ser próximo al 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.

40 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 ser próximo al 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.

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.

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.

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.

55 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.

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 las pruebas existen mezclas de manchas proteínicas comercializadas 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).

60 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 las pruebas existen mezclas de manchas proteínicas comercializadas 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).

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 las pruebas existen mezclas de manchas proteínicas comercializadas 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  $\Delta L^*$ , 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 mejor la mancha típica de sangre/leche/tinta a 50°C y especialmente a 30°C en tampón de pH 9 y se conserva mejor que los preparados comerciales de proteasa Savinase® Ultra 16L y Purafect® 4000L (figuras 5 y 6). Los preparados enzimáticos se administraron en unidades de actividad. Se probó también el efecto de eliminación de manchas en las manchas de sangre/leche/tinta en todo el intervalo de temperatura de 10°C a 60°C, tal como se describe en el ejemplo 12. El preparado de proteasa Fa\_RF7182 presentó mayor capacidad de eliminación de manchas en comparación que el preparado comercial de proteasa Savinase® Ultra 16L y Purafect® 4000L especialmente a bajas temperaturas de lavado en un intervalo de 10°C a 40°C (figura 14).

La eficacia de la proteasa Fa\_RF7182 se ensayó también en detergente en polvo a 40°C a pH 10 como se describe en el ejemplo 7. Se determinó la capacidad de la enzima en la eliminación de manchas de sangre/leche/tinta en material de poliéster-algodón (Art. 117, EMPA) en presencia de fosfato que contiene el detergente de referencia. Cada preparado enzimático se administró en unidades de actividad ( $\mu\text{mol}$  de tirosina/minuto). Como se muestra en la figura 7 la proteasa de la invención es adecuada también para detergentes en polvo en condiciones muy alcalinas. La eficacia de la enzima Fa\_RF7182 fue similar a la de la proteasa comercial Purafect® 4000L a 40°C.

La proteasa Fa\_RF7182 eliminó manchas típicas de sangre/leche/tinta en material de poliéster-algodón (Art. 117, EMPA) también en presencia de detergente líquido Ariel Sensitive (Procter & Gamble, Reino Unido) como se muestra en el ejemplo 8. La enzima se administró en unidades de actividad ( $\mu\text{mol}$  de tirosina/minuto/volumen). La dosis de 4 a 8 unidades de preparados de enzimas comerciales por ml de solución era igual a dosis de 0,2-0,5% de preparado enzimático por dosis de detergente, que es la concentración normal para la utilización de enzimas en detergentes. La Fa\_RF7182 presentaba excelente eficacia con detergente líquido (figura 8) y el aumento en luminosidad era considerablemente superior que con los preparados comerciales Savinase® Ultra 14L y Purafect® 4000L.

Resultados similares se observaron cuando se ensayó la eficacia de la enzima Fa\_RF7182 utilizando diferentes concentraciones de detergente líquido (ejemplo 9, figuras 9A-D y 10A-D) a 30°C. La eficacia de Fa\_RF7182 en manchas de leche/sangre/tinta fue considerablemente superior en comparación con los preparados comerciales Purafect® 4000L y Savinase® Ultra 14L con ambos detergentes y a todas las concentraciones de detergentes, cuando se administraba la misma cantidad de detergente. Además si la dosis se calculaba en cantidad de proteína añadida (figuras 9B y 10 B), la mayor eficacia de eliminación de las manchas fue con Fa\_RF7182. Los lavados se realizaron también a temperaturas inferiores con una concentración de detergente líquido de 3,3 g/l como se describe en el ejemplo 13. A 10°C y a 20°C el preparado de Fa\_RF7182 presentaba una eficacia superior sobre los preparados comerciales Savinase® Ultra 14L, Purafect® 4000L y Properase® 4000E (figura 15).

Además de las manchas de sangre/leche/tinta en tejidos de algodón o de poliéster con algodón, la serina proteasa Fa\_RF7182 fue eficaz en la eliminación de manchas, tales como de hierba (Art. 164, EMPA) y cacao (Art. 112, EMPA) cuando se probó en detergentes líquidos a 30°C. Los tratamientos se realizaron en ATLAS LP-2 Launder-Ometer. Los resultados (figura 11) demuestran que la Fa\_RF7182 fue eficaz en la eliminación de diferentes manchas a bajas temperaturas como 30°C.

La eficacia del preparado de la enzima Fa\_RF7182 recombinante producido en *T. reesei* se probó en presencia de detergente líquido de base a gran escala en una lavadora a 30°C (ejemplo 11) y se comparó con los preparados comerciales de proteasa Savinase® Ultra 16L y Purafect® 4000L. En la Tabla 5 se presentan ocho marcadores diferentes sensibles a la proteasa para probar los efectos secundarios y en la Tabla 6 las condiciones del proceso. Se calcularon las dosis de enzima utilizadas en los ensayos de prueba tanto en actividades enzimáticas como en cantidad de proteína enzimática. Los resultados con diferentes manchas presentados en las figuras 12 y 13 demuestran que la proteasa Fa\_RF7182 fue más eficaz que los preparados comerciales de enzimas. La Fa\_RF7182 fue más eficiente en manchas de sangre/leche/tinta, chocolate/leche, aceite de cacahuete/leche y de yema de huevo (figuras 13).

Como se observa en las figuras 5 a 11, la luminosidad L\* del material de prueba incrementó de manera notable en la presencia de la serina proteasa fúngica de la invención. Utilizando el preparado de la enzima Fa\_RF7182, se obtuvo mejor luminosidad en comparación con los productos de la competencia con dosis similares de actividad de la enzima o en otras palabras, se obtuvo luminosidad similar en comparación con productos de la competencia con las dosis más bajas de actividad de la enzima.

La proteasa Fa\_RF7182 también se probó en ensayos a gran escala a 30°C utilizando detergente líquido y una selección de marcadores sensibles a la proteasa (ejemplo 11). En estas pruebas, el efecto total de la eliminación de manchas, basándose en la suma de los resultados obtenidos con los ocho manchas diferentes sensibles a proteasa (manchas 1-8, Tabla 5) fue considerablemente mayor con Fa\_RF7182 en comparación con preparaciones comerciales de proteasa Purafect® 4000L y Savinase® Ultra 16L, cuando proteasas se administraron como cantidad de actividad (Figura 12A). Fa\_RF7182 fue eficaz, sobre todo en manchas de sangre/leche/tinta, chocolate/leche, aceite de cacahuete/leche y yema de huevo (Figures 13A-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 11. 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 RF7182 de *Fusarium acuminatum***

#### (a) Cultivo de proteasa RF7182 de *Fusarium acuminatum*

La cepa fúngica denominada al principio TUB F-2008 se aisló de una muestra de suelo como un hongo filamentoso que crece en placa de agarosa alcalina (pH 8,5). Se produjo actividad de proteasa, según la hidrólisis de la caseína y la hemoglobina incluidas en la placa de agar-agar. A medida que se realizaban los cultivos en placa entre 8 y 10°C este resultado sugería que TUB F-2008 produce una proteasa o proteasas que actúan a temperaturas frías. TUB F-2008 se identificó como Ellis & Everh *Fusarium acuminatum* (identificado por Arthur de Cock en Identification Services, Centralbureau Voor Schimmelcultures, P.O. Box 85167, 3508 AD Utrecht, Holanda) y se renombró como RF7182. La RF7182 de *F. acuminatum* se cultivó, se mantuvo y esporuló en agar-agar con dextrosa de patata (DP) (Difco) a +4°C. Para la producción de enzimas se inocularon esporas provenientes de tubos inclinados con RF7182 en un medio de cultivo que contenía: 30 g/l de harina de maíz (finamente molida), 5 g/l de polvo de maíz en remojo, 4 g/l de harina de soja (desgrasada), 2 g/l de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 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 trató en autoclave durante 30 minutos a 121°C. El microbio se cultivó en 50 ml de volumen en un agitador (200 rpm) a 28°C durante 7 días. El sobrenadante del cultivo gastado se demostró que contenía actividad de la proteasa alcalina, cuando se hicieron mediciones de la actividad (según los ejemplos 1c, 5 o 14) a diferentes valores de pH (pH 7-10). Debido a esta actividad alcalina, se seleccionó la cepa RF7182 como supuesta cepa donante de gen de proteasa.

#### (b) Purificación de la proteasa proveniente del medio de cultivo de RF7182 de *F. acuminatum*

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 (5 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 5 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 de base con un peso molecular de aproximadamente 29 kDa. Se agruparon las fracciones seleccionadas. Las fracciones agrupadas se utilizaron para la preparación de péptidos (ejemplo 2). Esta proteasa RF7182 purificada de *F. acuminatum* se denominó Fa\_RF7182.

#### (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 (101289) en 500 ml de Tris 100 mM, CaCl<sub>2</sub> 20 µM, MgCl<sub>2</sub> 0,7 µM, NaHCO<sub>3</sub> 2,5 µM. 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<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,5 en 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<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 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 15 o 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 (o g) de la mezcla de reacción por min.

### Ejemplo 2. Secuenciación de aminoácidos del terminal N e internos de la proteasa Fa\_RF7182 de *F. acuminatum* 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 µm × 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 Division, 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 Division, Foster City, CA)

Las secuencias peptídicas del terminal N e interna determinadas en la proteasa Fa\_RF7182 purificada se muestran en la Tabla 1. Las secuencias peptídicas presentaban homología con una secuencia de la supuesta proteasa publicada de serina de *Gibberella zeae* (*Fusarium graminearum*) con número de registro XP\_383491 en EMBL. Según la comparación de las secuencias, todas las secuencias de péptidos obtenidos estaban situadas cerca del extremo N de la proteína madura Fa\_RF7182.

Tabla 1. Secuencias peptídicas del N-terminal e internas determinadas en proteasa Fa\_RF7182 de RF7182 de *Fusarium acuminatum*

Péptido	Secuencia	SEC. ID. nº	Comentarios
nº 3811	A(L/I)TXQSNAPW	SEC. ID. nº 1	Secuencia del terminal N
1609.880	SGAPWG(L/I)Q(L/I)SHK	SEC. ID. nº 2	
1793.957	(A/L/I)(A/L/I)TTQSGAPWG(L/I)GA(L/I)SHK	SEC. ID. nº 3	
743.494	(A/N)(A/N)(L/I)(L/I)SVK	SEC. ID. nº: 4	
2103.832 (inicio en 2045,06)	GGAHTD	SEC. ID. nº 5	
2103.832 (inicio en 1406.57)	NGHGTHVAGT(L/I)NTK	SEC. ID. nº 6	
3662.692	TSY(L/I)YDTTAGSGSYGYVVDSDG(LI)N(LI) AHYS(L/I)NR	SEC. ID. nº 7	

### Ejemplo 3. Clonación del gen RF7182 de *F. acuminatum* que codifica la proteína Fa\_RF7182

(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 RF7182 de *F. acuminatum* se llevó a cabo como describen con detalle Raeder y Broda (1985).

#### 5 (b) Cebadores para la preparación de sondas

La sonda para la clonación del gen que codifica la proteína Fa\_RF7182 se sintetizó por RCP. Se programaron oligonucleótidos transcritos degenerados basándose en las secuencias de aminoácidos de los péptidos obtenidos de la RF7182 purificada (Tabla 1) y oligonucleótidos complementarios utilizando un área de consenso seleccionada de diferentes secuencias de serina proteasa tipo S8 publicadas. Las áreas de secuencias conservadas se determinaron a partir de alineación de secuencias con los números de registro AAR11460 (*Trichophyton rubrum*), CAD24010 (*Microsporium canis*), AAT65816 (*Penicillium nordicum*), Q5NDCO (*Penicillium chrysogenum*) y AAC27316 (*Fusarium oxysporum*). Las combinaciones de los cebadores en las reacciones de RCP se seleccionaron en función de la posición de los homólogos de péptidos en las secuencias de la proteasa publicadas. Las secuencias de los cebadores se muestran en la Tabla 2 (SEC. ID. n°: 8 a n°: 11).

Tabla 2. Oligonucleótidos (SEC. ID. n°: 8 a n°: 11) utilizados como cebadores de RCP en la amplificación de sondas. Oligos, las SEC. ID. n°, longitudes y degeneraciones de oligos, oligonucleótidos y aminoácidos del péptido utilizado en la planificación de la secuencia de oligonucleótidos.

Oligo	SEC. ID. n°:	Longitud (nts)	Degeneración	Secuencia <sup>(a)</sup>	Péptido <sup>(b)</sup>
PRO123	8	20	1024	CARWCNNGGNGCNCNTGGGG (s)	1793.957
PRO122	9	20	1024	CAYGGNACNCAYGTNGCNGG (s)	2103,832 (inicio en 1406,57)
PRO60	10	22	64	GMRGCCATRGAGGTWCCRGTSA (as)	
PRO61	11	20	32	GGMGMRGCCATRGAGGTWCC (as)	

<sup>(a)</sup> R = A o G, S = C o G, W = A o T, M = A o C, Y = T o C, N = A, C, T o G; "s" entre paréntesis = cadena transcrita, "as" entre paréntesis = cadena complementaria.

<sup>(b)</sup> Las secuencias peptídicas están incluidas en la Tabla 1.

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

Se utilizó ADN genómico de RF7182 de *F. acuminatum* como plantilla para la síntesis de sondas. Las mezclas de reacción de RCP contenían 1 x tampón Phusion<sup>TM</sup> GC, dNTP 0,25 mM, KCl 50 mM, DMSO al 5%, 1 µM de cada cebador y 2 unidades de Phusion<sup>TM</sup> ADN polimerasa (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: 1 min de desnaturalización inicial a 98°C, seguido por 29 ciclos de 10 sek a 98°C, 30 sek de hibridación a 48-58,5°C, 30 sek de ampliación a 72°C. y una ampliación final a 72°C durante 5 min. La combinación de cebadores PRO123 (SEC. ID. n°: 8) y PRO61 (SEC. ID. n°: 11) produjo un producto de ADN específico con el tamaño esperado (según los cálculos a partir de 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<sup>®</sup> 4-TOPO<sup>®</sup> según las instrucciones de los fabricantes (Invitrogen, US). El fragmento de ADN de 753 pb se secuenció a partir de este plásmido (SEC. ID. n°: 12). El plásmido pCR<sup>®</sup> 4-TOPO<sup>®</sup> que contiene este fragmento de ADN ampliado por RCP se denominó pALK2530. La cepa RF7803 de *E. coli* que incluye el plásmido pALK2530 se depositó en la colección DSM con el número de registro DSM 22208.

La secuencia de aminoácidos deducida del fragmento de RCP incluía las secuencias de los péptidos RF7182 internos SEC. ID. n°: 1 a n° 7 y los péptidos con la SEC. ID. n° 6 y n° 7 y la parte del terminal C del péptido SEC. ID. n° 2 era igual en parte a la secuencia de aminoácidos deducida. Los péptidos con la secuencia n° 4 y la SEC. ID. n° 5 y la parte del terminal C del péptido SEC. ID. n° 3 eran completamente iguales (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 Fa\_RF7182 y por lo tanto se utilizó como sonda para la detección del gen completo del ADN genómico RF7182 de *F. acuminatum*.

#### (d) Clonación del gen RF7182 de *F. acuminatum* que codifica la proteasa Fa\_RF7182

El ADN genómico de *F. acuminatum* se digirió con varias enzimas de restricción para el análisis de transferencia Southern. La hibridación se llevó a cabo con el fragmento EcoRI de 771 kb que incluye la SEC. ID. n°: 12, del plásmido pALK2530 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 RF7182 de *F. acuminatum*. Los productos de digestión de *Sall* genómicos contenían un fragmento de hibridación de tamaño aproximadamente 5 kb. El tamaño del fragmento de hibridación individual era lo suficientemente grande como para contener el gen completo que codifica la proteasa RF7182 según los cálculos que se basan en las secuencias de proteasa fúngica publicadas. Se aislaron fragmentos de ADN genómico del producto de digestión de *Sall* genómico de RF7182 del intervalo de tamaño del fragmento de hibridación. Los fragmentos genómicos aislados en gel de agarosa se clonaron a los vectores pBluescript II KS+ (Stratagene, US) escindidos con *Sall*. La mezcla de ligadura se transformó en células XL10-Gold de *Escherichia coli* (Stratagene) y se sembró 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 pALK2530 como sonda. La hibridación se realizó como se describió para los productos de digestión de ADN genómico de RF7182. Se recogieron de las placas varios clones claramente positivos y uno se confirmó con secuenciación. El gen completo que codifica la proteasa Fa\_RF7182 (SEC. ID. nº: 13) se secuenció a partir de la inserción *Sall* de 5 kb y el plásmido que contiene esta inserción se denominó pALK2531. La cepa RF7879 de *E. coli* que incluye el plásmido pALK2531 se depositó en la colección DSM con el número de registro DSM 22209. El gen que codifica la proteasa Fa\_RF7182 se denominó *Fa prtS8A*.

#### (e) Caracterización del gen que codifica la proteasa Fa\_RF7182 y la secuencia de aminoácidos deducida

La secuencia *Fa prtS8A* (SEC. ID. nº: 13) y la secuencia de aminoácidos deducida (SEC. ID. nº: 14) se muestran en las figuras 1A y 1B. La longitud del gen es de 1353 pb (incluyendo el codón de terminación). Se encontraron dos supuestos intrones que tienen las longitudes de 51 pb y 54 pb (secuencias de los límites 5' y 3' según las de los intrones fúngicos, según Gurr *et al* 1987). La secuencia de la proteína deducida (SEC. ID. nº 14) consta de 415 aminoácidos incluyendo una secuencia señal prevista de 20 aminoácidos (SignalP V3.0; Nielsen *et al*, 1997 y Nielsen y Krogh, 1998). Las partes del terminal N de los péptidos con las SEC. ID. nº: 1 a nº: 3 no incluidas en la secuencia de la sonda se incluyeron en la secuencia de aminoácidos deducida. El péptido con la SEC. ID. nº: 3 igualó la secuencia de aminoácidos deducida completamente. La masa molecular predicha fue 28568,64 Da para el polipéptido maduro y la pl predicha era 9,08. 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 Asn79 y Asn258 (figura 1), pero según CBS Server NetNGlyc V1.0 solamente es probable el sitio en la posición Asn79 (situado en el pro-péptido).

#### (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 *Hypocrea lixii* (*Trichoderma harzianum*) (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.), SEC. ID. nº: 313 en la solicitud. La secuencia RF7182 de aminoácidos maduros se alineó con las secuencias homólogas de aminoácidos maduros. Los valores de identidad obtenidos utilizando la alineación ClustalW (www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw, Matriz: BLOSUM, hueco abierto: 10, extensión del hueco: 0,5, EMBL-EBL) 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 la proteasa Fa\_RF7182. Se alinearon las secuencias de aminoácidos maduros excluyendo los péptidos señal y propéptidos. 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 solicitud.

	Fa_RF7182	<i>G. zeae</i>	<i>T. harz.</i>	US 60/818.910
Fa_RF7182	100	80	79	76
<i>G. zeae</i>		100	78	76
<i>T. harz.</i>			100	94
US 60/818.910				100

#### 50 Ejemplo 4. Producción de la proteasa Fa\_RF7182 recombinante en *Trichoderma reesei*

##### (a) Preparación del vector (anfitrión) de producción

Se construyó el plásmido de expresión pALK2536 para la producción de la proteasa RF7182 recombinante en *Trichoderma reesei*. El gen *Fa 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 *Fa prtS8A* a partir de su extremo 3'. Esto no mantiene ningún terminador *Fa prtS8A* original en el montaje antes de la secuencia del terminador de *cbh1*. Un gen marcador *amdS* se añadió al montaje incluyendo el activador *cbh1*, el gen *Fa prtS8A* 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 *EcoRI* 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 su esporulación 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  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  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 Fa\_RF7182 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. Las 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.

Los transformantes 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 Fa\_RF7182 recombinante.

#### **Ejemplo 5. Purificación y caracterización de la proteasa Fa\_RF7182 recombinante**

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. Todas las etapas 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  $\mu\text{m}$  (MILLEX HV Millipore) aplicando antes a la columna de desalado HiPrep 26/10 (de GE Healthcare) equilibrada en Tris 20 mM, pH 8,5. 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 8,5. 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 Fa\_RF7182 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 de aproximadamente 50°C.

#### Perfil de pH

El perfil de pH de la proteasa se determinó a 50°C u 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 Fa\_RF7182 recombinante presenta más del 85% de actividad relativa desde pH 6 a pH 9. El perfil de pH de la proteasa Fa\_RF7182 recombinante purificada correspondió al perfil de pH de la proteasa Fa\_RF7182 natural purificada como se ha descrito en el ejemplo 1a.

#### **Ejemplo 6. Eficacia de la proteasa Fa\_RF7182 recombinante en tampón de pH 9 a diferentes temperaturas**

Se probó la capacidad del preparado de proteína Fa\_RF7182 recombinante producido en *Trichoderma* (como se describe en el ejemplo 4) para quitar 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<sup>®</sup> Ultra 16 L (Novozymes) y Purafect<sup>®</sup> 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 administraron 0, 0,2, 0,4, 0,8, 1,6, 4, y 8 unidades de actividad ( $\mu\text{mol}$  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. c on 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 rejilla, se protegieron de la luz del día.

5 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  $\Delta L^*$ , 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).

10 Los resultados se muestran en las figuras 5 y 6. El preparado de proteasa Fa\_RF7182 mostró una capacidad de eliminación de manchas considerablemente superior a 30°C en tampón de pH 9 en comparación con los preparados comerciales de proteasa Savinase® Ultra 16L y Purafect® 4000L.

### 15 **Ejemplo 7. Eficacia de proteína Fa\_RF7182 recombinante con detergente en polvo a 40°C y pH 10**

Se probó la capacidad del preparado de proteína Fa\_RF7182 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 a 40°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 administraron 0, 0,2, 0,4, 0,8, 1,6, 4 y 8 unidades de actividad ( $\mu\text{mol}$  de tirosina/min) de cada enzima por ml de solución de lavado. La actividad se midió como se describe en el ejemplo 6.

20 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, dH  $\leq$  4), se mezclaron bien con un agitador magnético y se templó a 40°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 70  $\mu\text{l}$ ) en la parte superior de la tela. Las placas con las muestras se incubaron en agitador horizontal a 40°C durante 60 min. con 125 rpm. Una vez enjua gadas las muestras cuidadosamente con agua corriente (aproximadamente 45°C) y secadas durante la noche con aire del interior, en una rejilla, se protegieron de la luz diurna.

25 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  $\Delta L^*$  como se ha descrito en el ejemplo 6.

30 Los resultados (figura 7) demostraron que la proteasa Fa\_RF7182 también es adecuada con los detergentes en polvo en condiciones muy alcalinas. La eficacia fue similares que con la proteasa comercial Purafect® 4000L a 40°C.

### 35 **Ejemplo 8. Eficacia de la proteína Fa\_RF7182 recombinante con detergente líquido a 40°C**

Se probó la capacidad del preparado de proteína Fa\_RF7182 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 administraron 0, 0,2, 0,4, 0,8, 1,6, 4 y 8 unidades de actividad ( $\mu\text{mol}$  de tirosina/min) de cada enzima por ml de solución de lavado. La actividad se midió como se describe en el ejemplo 6.

40 Se disolvió una cantidad de 3,3 g de Ariel Sensitive en 1 litro de agua del grifo (dH  $\leq$  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 ( $<70 \mu\text{l}$ ). Las placas con las muestras se incubaron en un agitador horizontal a 40°C durante 60 min a 125 rpm. Una vez enjua gadas las muestras cuidadosamente con agua corriente (aproximadamente 45°C) y secadas durante la noche al aire del interior, en una rejilla, se protegieron de la luz diurna.

45 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  $\Delta L^*$  como se describe en el ejemplo 6.

50 Basándose en los resultados mostrados en la figura 8 la proteasa Fa\_RF7182 tiene una excelente eficacia con un detergente líquido a 40°C. La eficacia de Fa\_RF7182 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 administraba 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 aproximadamente 0,2 a 0,5% de preparado enzimático por peso de detergente, que es un nivel de utilización típico de enzimas de detergentes.

5 **Ejemplo 9. Eficacia de la proteína Fa\_RF7182 recombinante con diferentes concentraciones de detergente líquido a 30°C**

10 Se probó la capacidad del preparado de proteína Fa\_RF7182 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 de base 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 administraron 0, 0,2, 0,4, 0,8, 1,6, 4 y 8 unidades de actividad de cada enzima ( $\mu\text{mol}$  de tirosina/min) por ml de solución de lavado. La actividad se midió como se describe en el ejemplo 6.

20 Tabla 4. Composición de detergente líquido de base 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
<Tensioactivo total>	<25,30>
Poliol (Glicerina)	5
Fosfonato (32%) (ThermPhos)	2
PVP-Sokalan HP 53 (BASF)	1
Sokalan PA 15 (BASF)	1,56
Sorez-100 (ISP)	0,4
Agua hasta 100%	

25 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 de base 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 70  $\mu\text{l}$ ) 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 rejilla, se protegieron de la luz diurna.

35 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  $\Delta L^*$  como se ha descrito en el ejemplo 6.

40 Los resultados obtenidos con un detergente de base para tejidos de color se muestran en las figuras 9 A-D y los resultados obtenidos con Ariel Sensitive se muestran en las figuras 10 A-D. La eficiencia de Fa\_RF7182 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 administró la misma cantidad de actividad. Además, si la dosificación se calcula en cantidad de proteína añadida (figuras 9B y 10B), la eficiencia de eliminación de manchas es más alta con Fa\_RF7182. 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 Fa\_RF7182 tiene una excelente eficacia con detergentes líquidos a bajas temperaturas, como 30°C.

45 **Ejemplo 10. Eficiencia de la proteína Fa\_RF7182 recombinante en diferentes manchas con detergentes líquidos a 30°C (Lauder Ometer)**

50 Se probó la capacidad del preparado de proteína Fa\_RF7182 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 siguientes telas de ensayo artificialmente sucias de EMPA: sangre/leche/tinta Art. 117 (poliéster + algodón), sangre/leche/tinta Art. 116 (algodón), hierba Art. 164 y cacao Art. 112. La tela se cortó en muestras de 9 cm x 12 cm y los bordes se

arreglaron con puntadas en zig-zag. El detergente fue el mismo que se ha descrito en el ejemplo 9.

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 Art. 116 y Art. 117 con manchas o Art. 164 y Art.112 con manchas. Se administraron 0, 1 y/o 2, 5, 10 unidades de actividad de enzimas ( $\mu\text{mol}$  de tirosina/min) por ml de solución de lavado con manchas de sangre/leche/tinta y 0, 5, 10 y 20 unidades de actividad ( $\mu\text{mol}$  de tirosina/min) por ml de solución de lavado con manchas de hierba y cacao. La actividad se midió como se describe en el ejemplo 6. El Launder Ometer se realizó a 30°C durante 60 min y un pH de aproximadamente 7,5. Una vez enjuagadas las muestras cuidadosamente con agua corriente (aproximadamente 20°C) y secadas durante la noche en el aire interior, en una rejilla, 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  $\Delta L^*$  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 un detergente de base (5 g/l) para los tejidos de color (Fig. 11 A-D) demostraron que la eficiencia en manchas de sangre/leche/tinta, hierba y cacao fue considerablemente mayor con Fa\_RF7182 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 está en el nivel de utilización típico de enzimas de detergentes. Los resultados de estas pruebas indican que la proteasa Fa\_RF7182 es eficiente en varias manchas a bajas temperaturas como 30°C.

**Ejemplo 11. Evaluación de la eficacia de la proteína Fa\_RF7182 recombinante en detergente líquido para lavandería en ensayos en gran escala a 30°C**

La eficacia del preparado de la proteína Fa\_RF7182 recombinante producida en *Trichoderma* (descrita en el 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 de base para tejidos de color, como se ha descrito en el ejemplo 9, y 8 marcadores 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 marcadores procedían del CFT (Center of Testmaterials BV, Holanda). muestras de manchas 10 cm x 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 0-2,5 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.

45

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 marcador	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 (remisión), R 457 nm con espectrofotómetro Datacolor con un filtro UV y se calculó como efecto porcentual de eliminación de manchas (% SR):

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

5 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).

10 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.

15 Los resultados de las eficiencias totales de eliminación de la suciedad (% de delta de SR) se muestran en las figuras 12A-B y en las figuras 13A-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 5) fue considerablemente mayor con Fa\_RF7182 en comparación con los preparados comerciales de proteasas Purafect® 4000L y Savinase® Ultra 16L, cuando las proteasas se administraron como cantidad de actividad (figuras 12A). Fa\_RF7182 fue eficiente, sobre todo en las manchas de sangre/leche/tinta, chocolate/leche, aceite de cacahuete/leche y yema de huevo (figuras 13A-E).

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

#### 25 **Ejemplo 12. Eficacia de la proteína Fa\_RF7182 recombinante en tampón de pH 9 a temperaturas de 10°C a 60°C.**

30 Se probó la capacidad de la proteína Fa\_RF7182 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.

40 Los resultados se muestran en las figuras 14A-F. El preparado de proteasa Fa\_RF7182 mostró mayor capacidad de eliminación de manchas en todo el intervalo de temperatura de 10°C a 40°C en tampón de pH 9, en comparación con los preparados comerciales de proteasa Savinase® Ultra 16L y Purafect® 4000L y Properase® 4000E.

#### 45 **Ejemplo 13. Eficacia de la proteína Fa\_RF7182 recombinante con detergente líquido a temperaturas de lavado en frío (10°C y 20°C)**

50 Se probó la capacidad de la proteína Fa\_RF7182 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 de base 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.

55 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.

60 Los resultados obtenidos con la concentración de detergente líquido de base de 3,3 g/l a 10°C y 20°C se muestran en las figuras 15A y B. La eficacia de Fa\_RF7182 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 Fa\_RF7182 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, CaCl<sub>2</sub> 2,0 mM, MgCl<sub>2</sub> 0,7 mM, NaHCO<sub>3</sub> 2,5 mM. El pH de la solución de sustrato se ajustó a 8,5. 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 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 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

- Altschul SF, W Gish, W Miller, EW Myers y 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). Anwar A y M Saleemuddin. 1998. Alkaline proteases: A review. *Bioresource Technol.* 64:175-183.
- Chen, Y-J, y M Inouye, 2008. The intramolecular chaperone-mediated protein folding. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 18: 765-770.
- Cherry, J. R., y Fidantsef, A. L. 2003. Directed evolution of industrial enzymes: an update. *Curr. Opin. Biotechnol.* 14: 438-443.
- Edman P y G Begg. 1967. A protein sequenator. *Eur. J. Biochem.* 1:80-91.
- Gasteiger, E, A Gattiker, C Hoogland, I Ivanyi, RD Appel y A Bairoch. 2003. ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res.* 31:3784-3788.
- Geremia RA, Goldman GH, Ardiles W, Vila SB, Van Montagu M, Herrera-Estrella A. 1993) Molecular characterization of the proteinase-encoding gene, *prb1*, related to mycoparasitism by *Trichoderma harzianum*. *Mol. Microbiol.* 8(3):603-613.
- Gupta, R, QK Beg, S Khan y 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, y 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.
- Joutsjoki, W, TK Torkkeli, y KMH Nevalainen. 1993. Transformation of *Trichoderma reesei* with the *Hormoconis resiniae* glucoamylase P (*gamP*) gene: production of a heterologous glucoamylase by *Trichoderma reesei*. *Curr. Genet.* 24:223-228.
- Kalisz HM. 1988. Microbial proteinases. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 36:1-65.
- Karhunen T, A Mäntylä, KMH Nevalainen, y PL Suominen. 1993. High frequency one-step gene replacement in *Trichoderma reesei*. I. Endoglucanase I overproduction. *Mol. Gen. Genet.* 241:515-522.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Malardier L, MJ Daboussi, J. Julien, F Roussel, C. Scazzocchio y Y Brygoo. 1989. Cloning of the nitrate reductase gene (*niaD*) of *Aspeigillus nidulans* and its use for transformation of *Fusarium oxysporum*. *Gene* 78:147-156.
- Maurer, K-H. 2004. Detergent proteases. *Curr. Opin. Biotechnol.* 15: 330-334.
- Nielsen H, J Engelbrecht, S Brunak y G von Heijne. 1997. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides

and prediction of their cleavage sites. Protein Engineering 10:1-6.

Nielsen H y 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.

Paloheimo M, A Mäntylä, J Kallio, y 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.

Penttilä M, H Nevalainen, M Rättö, E Salminen, y 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 y 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 y P Broda. 1985. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. Lett. Appl. Microbiol. 1:17-20.

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

Sambrook J y 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 y M Irie. 1991. Purification and properties of a novel surface protease from *Bacillus* sp. Y. Agric. Biol. Chem. 55:2251-2258.

Suarez MB, Vizcaino JA, Lobell A, y 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> Serina proteasa fúngica y utilización de la misma

<130> A9360PC

<150> FI 20095499  
<151> 2009-04-30

<160> 18

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> *Fusarium acuminatum*

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> Secuencia de un péptido aminoterminal nº 3811 de la proteasa RF7182 de *Fusarium acuminatum*.

<220>

<221> VARIANTE

<222> (2)..(2)

<223> /replace= "Ile"

<220>

<221> misc\_feature  
 <222> (4)..(4)  
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

5 <400> 1

A1a Leu Thr Xaa Gln Ser Asn A1a Pro Trp  
 1 5 10

<210> 2  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Fusarium acuminatum

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Secuencia de un péptido tríptico 1609.880 de la proteasa RF7182 de *Fusarium acuminatum*.

<220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (7)..(7)  
 <223> /replace= "Ile"

<220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (9)..(9)  
 <223> /replace= "Ile"

20 <400> 2

Ser Gly A1a Pro Trp Gly Leu Gln Leu Ser His Lys  
 1 5 10

<210> 3  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> Fusarium acuminatum

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Secuencia de un péptido tríptico 1793.957 de la proteasa RF7182 de *Fusarium acuminatum*

<220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (1)..(1)  
 <223> /replace= "Leu"

<220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (1)..(1)  
 <223> /replace= "Ile"

<220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (2)..(2)  
 <223> /replace= "Leu"

<220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (2)..(2)  
 <223> /replace= "Ile"

<220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (12)..(12)  
 <223> /replace= "Ile"

<220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (15)..(15)  
 5 <223> /replace= "Ile"  
  
 <400> 3  
  
 Ala Ala Thr Thr Gln Ser Gly Ala Pro Trp Gly Leu Gly Ala Leu Ser  
 1 5 10 15  
  
 His Lys  
 10  
 <210> 4  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Fusarium acuminatum  
 15  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Secuencia de un péptido tríptico 743.494 de la proteasa RF7182 de *Fusarium acuminatum*  
 20  
 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (1)..(1)  
 <223> /replace= "Asn"  
 25  
 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (2)..(2)  
 <223> /replace= "Asn"  
 30  
 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (3)..(3)  
 <223> /replace= "Ile"  
 35  
 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (4)..(4)  
 <223> /replace= "Ile"  
 40  
 <400> 4  
  
 Ala Ala Leu Leu Ser Val Lys  
 1 5  
 45  
 <210> 5  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Fusarium acuminatum  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Secuencia de un péptido tríptico 2103.832 (inicio 2045,06) de la proteasa RF7182 de *Fusarium acuminatum*  
 50  
 <400> 5  
  
 Gly Gly Ala His Thr Asp  
 55 1 5  
  
 <210> 6  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 60 <213> Fusarium acuminatum

ES 2 416 457 T3

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Secuencia de un péptido tríptico 2103.832 (inicio 1406,57) de la proteasa RF7182 de *Fusarium acuminatum*

5 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (11)..(11)  
 <223> /replace= "Ile"

10 <400> 6

Asn Gly His Gly Thr His Val Ala Gly Thr Leu Asn Thr Lys  
 1 5 10

<210> 7  
 <211> 31  
 <212> PRT  
 <213> Fusarium acuminatum

20 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Secuencia de un péptido tríptico 3662. 692 de la proteasa RF7182 de *Fusarium acuminatum*

25 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (4)..(4)  
 <223> /replace= "Ile"

30 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (22)..(22)  
 <223> /replace= "Ile"

35 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (24)..(24)  
 <223> /replace= "Ile"

40 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (29)..(29)  
 <223> /replace= "Ile"

<400> 7

Thr Ser Tyr Leu Tyr Asp Thr Thr Ala Gly Ser Gly Ser Tyr Gly Tyr  
 1 5 10 15

45 Val Val Asp Ser Gly Leu Asn Leu Ala His Tyr Ser Leu Asn Arg  
 20 25 30

<210> 8  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial

50 <220>  
 <223> Secuencia del cebador oligonucleotídico PRO123 procedente de la SEC. ID. nº: 3 del péptido

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

60 <220>  
 <221> misc\_feature

<222> (4)..(4)  
 <223> w e s a o t  
  
 <220>  
 5 <221> misc\_feature  
 <222> (6)..(6)  
 <223> n e s a , c , g , o t  
  
 <220>  
 10 <221> misc\_feature  
 <222> (9)..(9)  
 <223> n e s a , c , g , o t  
  
 <220>  
 15 <221> misc\_feature  
 <222> (12)..(12)  
 <223> n e s a , c , g , o t  
  
 <220>  
 20 <221> misc\_feature  
 <222> (15)..(15)  
 <223> n e s a , c , g , o t  
  
 <400> 8  
 25 carwcnngng cncCNTggg  
  
 <210> 9  
 <211> 20  
 30 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 35 <223> Secuencia del cebador oligonucleotídico PRO122 procedente de la SEC. ID. nº: 6 del péptido  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (3)..(3)  
 <223> y e s t o c  
 40  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (6)..(6)  
 <223> n e s a , c , g , o t  
 45  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (9)..(9)  
 <223> n e s a , c , g , o t  
 50  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (12)..(12)  
 <223> y e s t o c  
 55  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (15)..(15)  
 <223> n e s a , c , g , o t  
 60  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (18)..(18)  
 <223> n e s a , c , g , o t  
 65  
 <400> 9

20

cayggnacnc aygtngcngg 20

5 <210> 10  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Secuencia del cebador oligonucleotídico PRo60 de consenso con serina proteasa

15 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (2)..(2)  
 <223> m es a o c

20 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (3)..(3)  
 <223> r es a o g

25 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (9)..(9)  
 <223> r es a o g

30 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (15)..(15)  
 <223> w es a o t

35 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (18)..(18)  
 <223> r es a o g

40 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (21)..(21)  
 <223> s es c o g

<400> 10

45 gmrccatrg aggtwccrgt sa 22

50 <210> 11  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

55 <220>  
 <223> Secuencia del cebador oligonucleotídico PRO61 de consenso con serina proteasa.

60 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (3)..(3)  
 <223> m es a o c

65 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (5)..(5)  
 <223> m es a o c

70 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (6)..(6)

ES 2 416 457 T3

<223> r e s a o g

<220>  
 <221> misc\_feature  
 5 <222> (12)..(12)  
 <223> r e s a o g

<220>  
 <221> misc\_feature  
 10 <222> (18)..(18)  
 <223> w e s a o t

<400> 11

15 ggmgmrgcca trgaggtwcc 20

<210> 12  
 <211> 753  
 <212> ADN  
 20 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Secuencia del fragmento de RCP obtenida utilizando los cebadores PRO123 (SEC. ID. nº: 8) y PRO61 (SEC. ID. nº: 11) y ADN genómico de RF7182 de *Fusarium acuminatum* como plantilla

25 <400> 12

cagtctggtg	cgccctgggg	tctcgggtgcc	atctcccaca	agtcgtctgg	ctccaccagc	60
tacatctacg	acaccactgc	cggtagcggc	tcttacggat	atgtcgtaga	tagtggtatc	120
aacatcgccc	ataccgactt	tggtggccgt	gctactctcg	gctacaacgc	tgctggtggt	180
gctcacaccg	ataccctcgg	ccacggaacc	cacgttgctg	gtaccatcgg	tggcaccaag	240
tatggtgtct	ccaagaaggc	caacctcadc	tctgtcaagg	tcttcgccgg	taaccaggct	300
gctacatctg	ttatccttga	tggctttaac	tgggccgtca	aacgacatca	cctccaaggg	360
ccgtgctggc	aagtcggtta	tcaacatgtc	tctcggtaag	tagtttcgca	ctcagaccta	420
tacatggaaa	tcactaacca	agacaccagg	cggaccttct	tctgctactt	ggaccactgc	480
catcaacgct	ggatacaacg	ctggtgtcct	ctccgttgtc	gctgccggta	acggtgatgt	540
caatggcaac	cctctccccg	tctctagcca	gtctcctgcc	aacgccccca	acgccctgac	600
cgtcgctgcc	attgactcca	actggcgcac	tgccctcttc	accaactacg	gtgccggtgt	660
tgatatcttc	ggccccggtg	tcaacattct	gtccgcctgg	atcggctcca	gcaccgctac	720
caacaccatc	agcggaacct	ccatggcctc	gcc			753

30 <210> 13  
 <211> 1353  
 <212> ADN  
 <213> *Fusarium acuminatum*

35 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <223> Secuencia nucleotídica del gen de la proteasa RF7182 de *Fusarium acuminatum* completo (Fa prtS8A)

40 <400> 13

ES 2 416 457 T3

```

atgactagca tccgccgctt cgctctctac cttggagctc tgctccctgc agtgcttgct      60
gctcctgctg gcgtctccaa ggtcgctaag ctcgactctg tgcccgacaa gtacatcatc      120
accctcaagc ctgattcctc tgacgccaaag gtcgaggttc acttgagctg ggtcgagggc      180
gtccaccgcc gcagccttgc taagcgcgac accgtcgggtg ttgagaagac tttcaacatc      240
agcagctgga gcgcttactc tggcaggttc gaccaggcta ccattgatga gatcaagaag      300
agccctgagg taagccttcc ggtactggcc taagtaacac aaatcaccaa catgccatag      360
gttgcttttc ttgagcctga ctacactgtc tacctggact atgaggagtc atctgagctg      420
tctgaccgcg ctctgaccac ccagtctggt gctccctggg gtctcgggtc catctcccac      480
aagtcgtctg gctccaccag ctacatctac gacaccactg ccggtagcgg ctcttacgga      540
tatgtcgtag atagtggat caacatcgcc cataccgact ttgggtggccg tgctactctc      600
ggctacaacg ctgctggtgg tgctcacacc gataccctcg gccacggaac ccacgttgct      660
ggtaccatcg gtggcaccaa gtatgggtgc tccaagaagg ccaacctcat ctctgtcaag      720
gtcttcgccc gtaaccaggc tgctacatct gttatccttg atggctttaa ctgggcccgc      780
aacgacatca cctccaaggg ccgtgctggc aagtcggtta tcaacatgct tctcggtaa      840
tagtttcgca ctcagacctc tacatggaaa tcaactaaca agacaccagg cggaccttct      900
tctgtacttt ggaccactgc catcaacgct ggatacaacg ctgggtgctc ctccgttgct      960
gctgccggta acggtgatgt caatggcaac cctctccccg tctctagcca gtctcctgcc     1020
aacgccccca acgcccctgac cgctcgtgcc attgactcca actggcgcac tgccctcttc     1080
accaactacg gtgccgggtg tgatatcttc ggccccgggtg tcaacattct gtccgcctgg     1140
atcggctcca gcaccgctac caacaccatc agcggaaact ccatggctc cccccacctt     1200
gctggctctg ctctctacct ccaggtcctt gagggcttta gcactcctgc tgctgtcacc     1260
aaccgcatca aggctcttgg tacctctggc aaggctactg gtagcctcag cggcagcccc     1320
aacctcgttg cctacaacgg taacggtgct tag                                     1353

```

<210> 14

5 <211> 415

<212> PRT

<213> *Fusarium acuminatum*

<220>

10 <221> misc\_feature

<223> Secuencia de aminoácidos deducida de la proteasa RF7182 (Fa\_RF7182) completa de *Fusarium acuminatum*, que incluye los aminoácidos Met1 a Ala415.

<400> 14

15

Met Thr Ser Ile Arg Arg Leu Ala Leu Tyr Leu Gly Ala Leu Leu Pro  
1 5 10 15

Ala Val Leu Ala Ala Pro Ala Gly Val Ser Lys Val Ala Lys Leu Asp  
20 25 30

Ser Val Pro Asp Lys Tyr Ile Ile Thr Leu Lys Pro Asp Ser Ser Asp  
35 40 45

Ala Lys Val Glu Ala His Leu Ser Trp Val Glu Gly Val His Arg Arg  
50 55 60

Ser Leu Ala Lys Arg Asp Thr Val Gly Val Glu Lys Thr Phe Asn Ile  
65 70 75 80

Ser Ser Trp Ser Ala Tyr Ser Gly Glu Phe Asp Gln Ala Thr Ile Asp  
85 90 95

ES 2 416 457 T3

Glu Ile Lys Lys Ser Pro Glu Val Ala Phe Val Glu Pro Asp Tyr Thr  
 100 105 110

Val Tyr Leu Asp Tyr Glu Glu Ser Ser Glu Leu Ser Asp Arg Ala Leu  
 115 120 125

Thr Thr Gln Ser Gly Ala Pro Trp Gly Leu Gly Ala Ile Ser His Lys  
 130 135 140

Ser Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Ile Tyr Asp Thr Thr Ala Gly Ser Gly  
 145 150 155 160

Ser Tyr Gly Tyr Val Val Asp Ser Gly Ile Asn Ile Ala His Thr Asp  
 165 170 175

Phe Gly Gly Arg Ala Thr Leu Gly Tyr Asn Ala Ala Gly Gly Ala His  
 180 185 190

Thr Asp Thr Leu Gly His Gly Thr His Val Ala Gly Thr Ile Gly Gly  
 195 200 205

Thr Lys Tyr Gly Val Ser Lys Lys Ala Asn Leu Ile Ser Val Lys Val  
 210 215 220

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

Trp Ala Val Asn Asp Ile Thr Ser Lys Gly Arg Ala Gly Lys Ser Val  
 245 250 255

Ile Asn Met Ser Leu Gly Gly Pro Ser Ser Ala Thr Trp Thr Thr Ala  
 260 265 270

Ile Asn Ala Gly Tyr Asn Ala Gly Val Leu Ser Val Val Ala Ala Gly  
 275 280 285

Asn Gly Asp Val Asn Gly Asn Pro Leu Pro Val Ser Ser Gln Ser Pro  
 290 295 300

Ala Asn Ala Pro Asn Ala Leu Thr Val Ala Ala Ile Asp Ser Asn Trp  
 305 310 315 320

Arg Thr Ala Ser Phe Thr Asn Tyr Gly Ala Gly Val Asp Ile Phe Gly  
 325 330 335

Pro Gly Val Asn Ile Leu Ser Ala Trp Ile Gly Ser Ser Thr Ala Thr  
 340 345 350

Asn Thr Ile Ser Gly Thr Ser Met Ala Ser Pro His Leu Ala Gly Leu  
 355 360 365

Ala Leu Tyr Leu Gln Val Leu Glu Gly Leu Ser Thr Pro Ala Ala Val  
 370 375 380

Thr Asn Arg Ile Lys Ala Leu Gly Thr Ser Gly Lys Val Thr Gly Ser  
 385 390 395 400

Leu Ser Gly Ser Pro Asn Leu Val Ala Tyr Asn Gly Asn Gly Ala  
 405 410 415

- 5 <210> 15
- <211> 1293
- <212> ADN
- <213> Fusarium acuminatum

- 10 <220>
- <221> misc\_feature

ES 2 416 457 T3

<223> Secuencia nucleotídica que codifica la secuencia de aminoácidos de la forma proenzimática de la proteasa RF7182 de *Fusarium acuminatum*.

<400> 15

5  
gctcctgctg gcgctctcaa ggtcgctaag ctcgactctg tgccccgaaa gtacatcatc 60  
acctcaagc ctgattcctc tgacgccaag gtcgaggctc acttgagctg ggtcgagggc 120  
gtccaccgcc gcagccttgc taagcgcgac accgtcgggt ttgagaagac tttcaacatc 180  
agcagctgga gcgcttactc tggcgagtcc gaccaggcta ccattgatga gatcaagaag 240  
agccctgagg taagccttcc ggtactggcc taagtaacac aaatcaccaa catgccatag 300  
gttgctttcg ttgagcctga ctacactgtc tacctggact atgaggagtc atctgagctg 360  
tctgaccgcg ctctgaccac ccagtctggt gctccctggg gtctcgggtc catctcccac 420  
aagtcgtctg gctccaccag ctacatctac gacaccactg ccggtagcgg ctcttacgga 480  
tatgtcgtag atagtggat caacatcgcc cataccgact ttggtggccg tgctactctc 540  
ggctacaacg ctgctggtgg tgctcacacc gataccctcg gccacggaac ccacgttgct 600  
ggtaccatcg gtggcaccia gtatggtgtc tccaagaagg ccaacctcat ctctgtcaag 660  
gtcttcgccc gtaaccaggc tgctacatct gttatccttg atggctttaa ctgggcccgc 720  
aacgacatca cctccaaggg ccgtgctggc aagtcggtta tcaacatgct tctcggtaag 780  
tagtttcgca ctcagacctc tacatggaaa tcaactaaca agacaccagg cggaccttct 840  
tctgctactt ggaccactgc catcaacgct ggatacaacg ctggtgtcct ctccgttgct 900  
gctgccggta acggtgatgt caatggcaac cctctccccg tctctagcca gtctcctgcc 960  
aacgccccca acgcccctgac cgtcgtgccc attgactcca actggcgcac tgcctctttc 1020  
accaactacg gtgccgggtg tgatatcttc ggccccgggt tcaacattct gtccgcctgg 1080  
atcggctcca gcaccgtac caacaccatc agcggaactt ccatggcctc cccccacctt 1140  
gctggtcttg ctctctacct ccaggtcctt gagggcttta gactcctgc tgctgtcacc 1200  
aacgcatca aggctcttgg tacctctggc aaggctactg gtaccctcag cggcagcccc 1260  
aacctcgttg cctacaacgg taacgggtgct tag 1293

<210> 16

<211> 395

10 <212> PRT

<213> *Fusarium acuminatum*

<220>

<221> MISC\_FEATURE

15 <223> Secuencia de aminoácidos de la forma proenzimática de la proteasa RF7182 de *Fusarium acuminatum*, que incluye los aminoácidos Ala21 a Ala415 de la proteasa completa.

<400> 16

ES 2 416 457 T3

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

ES 2 416 457 T3

210 215 220

Asp Ile Thr Ser Lys Gly Arg Ala Gly Lys Ser Val Ile Asn Met Ser  
 225 230 235 240

Leu Gly Gly Pro Ser Ser Ala Thr Trp Thr Thr Ala Ile Asn Ala Gly  
 245 250 255

Tyr Asn Ala Gly Val Leu Ser Val Val Ala Ala Gly Asn Gly Asp Val  
 260 265 270

Asn Gly Asn Pro Leu Pro Val Ser Ser Gln Ser Pro Ala Asn Ala Pro  
 275 280 285

Asn Ala Leu Thr Val Ala Ala Ile Asp Ser Asn Trp Arg Thr Ala Ser  
 290 295 300

Phe Thr Asn Tyr Gly Ala Gly Val Asp Ile Phe Gly Pro Gly Val Asn  
 305 310 315 320

Ile Leu Ser Ala Trp Ile Gly Ser Ser Thr Ala Thr Asn Thr Ile Ser  
 325 330 335

Gly Thr Ser Met Ala Ser Pro His Leu Ala Gly Leu Ala Leu Tyr Leu  
 340 345 350

Gln Val Leu Glu Gly Leu Ser Thr Pro Ala Ala Val Thr Asn Arg Ile  
 355 360 365

Lys Ala Leu Gly Thr Ser Gly Lys Val Thr Gly Ser Leu Ser Gly Ser  
 370 375 380

Pro Asn Leu Val Ala Tyr Asn Gly Asn Gly Ala  
 385 390 395

<210> 17  
 <211> 924  
 5 <212> ADN  
 <213> Fusarium acuminatum

<220>  
 <221> misc\_feature

10 <223> Secuencia nucleotídica que codifica la secuencia de aminoácidos de la forma madura de la proteasa de *Fusarium acuminatum* RF7182.

<400> 17

gctctgacca cccagtctgg tgctccctgg ggtctcggtg ccatctccca caagtcgtct	60
ggctccacca gctacatcta cgacaccact gccggtagcg gctcttacgg atatgctgta	120
gatagtggta tcaacatcgc ccataccgac tttggtggcc gtgctactct cggtacaac	180
gctgctggtg gtgctcacac cgataccctc ggccacggaa cccacgttgc tggtagcatc	240
15 ggtggcacca agtatggtgt ctccaagaag gccaacctca tctctgtcaa ggtcttcgcc	300

ES 2 416 457 T3

```

ggtaaccagg ctgctacatc tgttatcctt gatggcttta actgggccgt caacgacatc      360
acctccaagg gccgtgctgg caagtccggt atcaacatgt ctctcggtaa gtagtttcgc      420
actcagacct atacatggaa atcactaacc aagacaccag gcggaccttc ttctgctact      480
tggaccactg ccatcaacgc tggatacaac gctggtgtcc tctccgttgt cgctgccggt      540
aacggtgatg tcaatggcaa cctctcccc gtctctagcc agtctcctgc caacgcccc      600
aacgccctga ccgctcgtgc cattgactcc aactggcgca ctgcctcttt caccaactac      660
ggtgccggtg ttgatatctt cggccccggt gtcaacattc tgtccgcctg gatcggctcc      720
agcaccgcta ccaacacccat cagcggaaact tccatggcct cccccacct tgctggtctt      780
gctctctacc tccaggtcct tgagggtcct agcactcctg ctgctgtcac caaccgcatc      840
aaggctcttg gtacctctgg caaggctact ggtagcctca gcggcagccc caacctcgtt      900
gcctacaacg gtaacggtgc ttag                                             924

```

<210> 18  
 <211> 289  
 5 <212> PRT  
 <213> Fusarium acuminatum

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE

10 <223> Secuencia de aminoácidos de la forma madura de la proteasa de *Fusarium acuminatum* RF7182, que comprende los aminoácidos Ala127 a Ala415 de la proteasa de longitud completa

```

<400> 18
Ala Leu Thr Thr Gln Ser Gly Ala Pro Trp Gly Leu Gly Ala Ile Ser
 1          5          10          15

His Lys Ser Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Ile Tyr Asp Thr Thr Ala Gly
          20          25          30

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

Thr Asp Phe Gly Gly Arg Ala Thr 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

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

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

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

```

ES 2 416 457 T3

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

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

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

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

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

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

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

Gly Leu Ala Leu Tyr Leu Gln Val Leu Glu Gly Leu Ser Thr Pro Ala  
 245 250 255

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

Gly Ser Leu Ser Gly Ser Pro Asn Leu Val Ala Tyr Asn Gly Asn Gly  
 275 280 285

Ala

---

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Enzima serina proteasa fúngica, caracterizada porque dicha enzima presenta actividad de serina proteasa y comprende una secuencia de aminoácidos de la enzima Fa\_RF7182 madura tal como se define en SEC. ID. nº: 18 o una secuencia de aminoácidos que presenta por lo menos 81% de identidad con la secuencia de aminoácidos de la enzima Fa\_RF7182 madura definida en la SEC. ID. nº: 18.
- 10 2. Enzima serina proteasa fúngica según la reivindicación 1, caracterizada porque dicha enzima puede obtenerse a partir de *Fusarium acuminatum*.
- 15 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: 18.
- 20 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.
- 25 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 caseína como sustrato es de 30°C a 70°C.
- 30 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 caseína como sustrato en el intervalo de pH de pH 6 a pH 12 por lo menos.
- 35 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.
- 40 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 pALK2530 que comprende la secuencia nucleotídica SEC. ID. nº: 12 depositada en RF7803 de *Escherichia coli* con el número de registro DSM 22208.
- 45 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 Fa\_RF7182 madura tal como se define en SEC. ID. nº: 18 o una secuencia de aminoácidos que presenta por lo menos 81% de identidad con la secuencia de aminoácidos de la Fa\_RF7182 madura definida en la SEC. ID. nº: 18.
- 50 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: 18.
- 55 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: 17.
- 60 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 el pALK2531 depositado en RF7879 de *Escherichia coli* con el número de registro DSM 22209.
- 65 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 operativamente unida a 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*.
- 5 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:
- 10 (a) una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que presenta actividad de serina proteasa y que comprende la secuencia de aminoácidos representada en la SEC. ID. nº: 18;
- 15 (b) una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que presenta actividad de serina proteasa y presenta por lo menos 81% de identidad con la secuencia de aminoácidos SEC. ID. nº: 18;
- (c) una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de codificación de la secuencia nucleotídica representada en la SEC. ID. nº: 13;
- 20 (d) una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de codificación de la secuencia polinucleotídica contenida en DSM 22208 o DSM 22209;
- (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
- 25 (f) una molécula de ácido nucleico que se hibrida en condiciones severas con una molécula de ácido nucleico contenida en DSM 22208, y que codifica un polipéptido que presenta actividad de serina proteasa y una secuencia de aminoácidos que presenta por lo menos 81% de identidad con la secuencia de aminoácidos como es representada en la SEC. ID. nº: 18.
- 30 20. Vector de expresión recombinante que comprende la secuencia nucleotídica según la reivindicación 19 operativamente unida a unas secuencias reguladoras que pueden dirigir la expresión de dicho gen que codifica la serina proteasa en un anfitrión adecuado.
- 35 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.
- 40 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*.
- 45 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*.
- 50 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.
- 55 29. Procedimiento para obtener 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, ya sea recuperar el polipéptido de las células o separar las células del medio de cultivo y obtener el sobrenadante.
- 60 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.
- 65 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, xilanasa, 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 anticorrosión, agentes contra la reprecipitación, 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 la forma de líquido, polvo o granulado.

15 35. Utilización de la enzima serina proteasa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18 o el 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 proteico.

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 para detergente.

37. Utilización según la reivindicación 36 en detergentes líquidos.

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

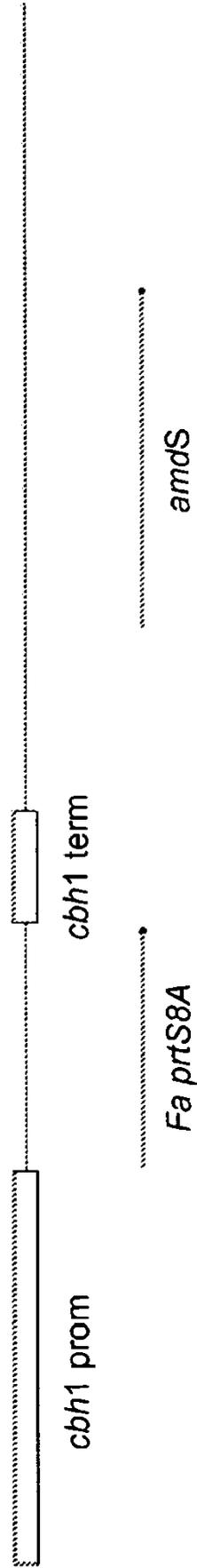
**Fig. 1A**

1 atgactagca tccgccgct cgctctctac cttggagctc tgetccctgc agtgcttgct gctcctgctg gctctccaa ggtcgtctaaag  
 1 l m t s i r r l a l y l g a l l p a v l a a p a g v s k v a k  
 91 ctgactctg tgcccgacaa gtacatcatc accctcaagc ctgattcctc tgacgccaag gtcgaggctc acttgagctg ggtcgtcggg  
 31 l d s v p d k y i i t l k p d s s d a k v e a h l s w v e g  
 181 gtccaccgcc gcagccttgc taagcgcgac accgtcgggt ttgagaagac tttcaacatc agcagctgga gcgcttactc tggcgagttc  
 61 v h r r s l a k r d t v g v e k t f n i s s w s a y s g e f  
 271 gaccaggcta ccattgatga gatcaagaag agccctgagg taagccttcc ggtactggcc taagtaaacac aaatcaccaa catgccatag  
 91 d q a t i d e i k k s p e.....  
 361 gttgctttcg ttgagcctga ctacactgtc tacctggact atgaggagtc atctgagctg tctgaccgcg ctctgaccac ccagctctggt  
 104 v a f v e p d y t v y l d y e e s s e l s d r A L F F Q S G  
 451 GCTCCCTGGG GTCTCGSTGC CATCTCCCAC AAGTCGCTGT GCTCCACCAG CTACATCTAC GACACCACCTG CCGGTAGCGG CTCTTACGGA  
 134 A P W G L G A I S H K S S G S F S Y I Y D T I A G S G S Y G  
 541 TAGTTCGTAG ATAGTGGTAT CAACATCGCC CATAACCGACT TTGGTGGCCG TGCTACTCTC GGCTACAACG CTGCTGGTGG TGCTCACACC  
 164 Y V V b S G I N I A H T D F G G R A T L G Y N A A G G A H H  
 631 GATACCCCTCG GCCACGGAC CCACGTTGCT GGTAACCATCG GTGGCACCAA GTATGGTGC TCCAAGRAGG CCAACCTCAT CTCTGTCAAG  
 194 D T L G H G T H V A G T I G G T K Y G V S K K A N L I S V K  
 721 GTCTTCGCCG GTAACCAGGC TGCTACATCT GTTATCCTTG ATGGCTTTAA CTGGGCCGTC AACGACATCA CCTCCAAGGG CCGTGTGCTGGC  
 224 V F A G N Q A A T S V I L D G F N W A V N D I T S K G R A G  
 811 AAGTCCGTTA TCAACATGTC TCTCGGtaag tagtttcgca ctcagacctc tacatggaaa tcaactaacca agacaccagG CGGACCTTCT  
 254 K S V I N M S L.....  
 901 TCTGCTACTT GGACCACTGC CATCAACGCT GGATACAACG CTGGTGTCTCT CCGGTTGTC GCTGCCGGTA ACGGTGATGT CAATGGCAAC  
 266 S A T W T T A I N A G Y N A G V L S V V A A G N G D V N G N

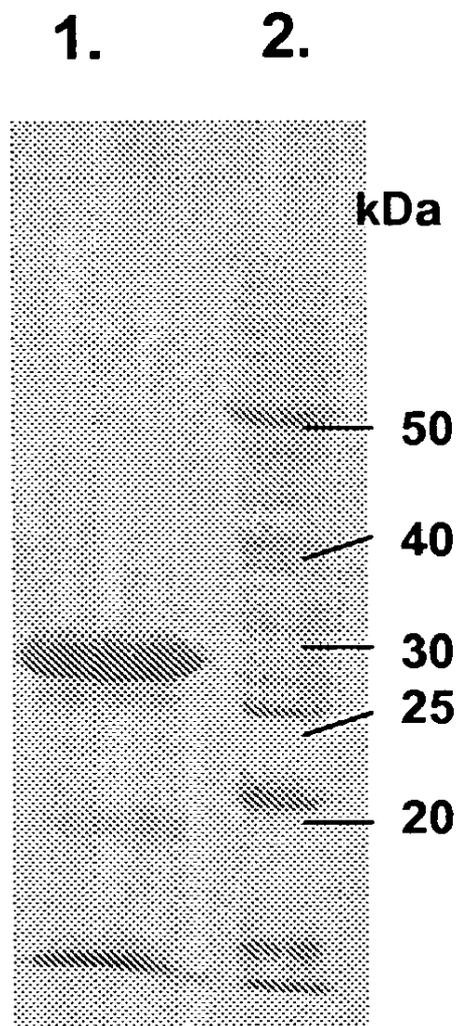
Fig. 1B

991 CCTCTCCCCG TCTCTAGCCA GTCTCCTGCC AACGCCCCCA ACGCCCTGAC CGTCGGTGCC ATTGACTCCA ACTGGGCGCAC TGCCTCTTTC  
 296 P L P V S S Q S P A N A P N A L T V A A I D S N W R T A S F  
  
 1081 ACCAACTACG GTGCCGGTGT TGATATCTTC GGCCCCGGTG TCAACATTCT GTCCGCCTGG ATCGGCTCCA GCACCGCTAC CAACACCATC  
 326 T N Y G A G V D I F G P G V N I L S A W I G S S T A T N T I  
  
 1171 AGCGGAACCT CCATGGCCTC CCCCACCTT GCTGGTCTTG CTCTCTACCT CCAGGTCTTT GAGGTCTTA GCACCTCCTGC TGCITGCACC  
 356 S G T S M A S P H L A G L A L Y L Q V L E G L S T P A A V T  
  
 1261 AACCGCATCA AGGCTCTTGG TACCTCTGGC AAGGTCAC TGAGCCTCAG CGGCAGCCCC AACCTCGTTG CCTACAACGG TAACGGTGCT  
 386 N R I K A L G T S G K V T G S L S G S P N L V A Y N G N G A  
  
 1351 TAG  
 416 \*

Fig. 2

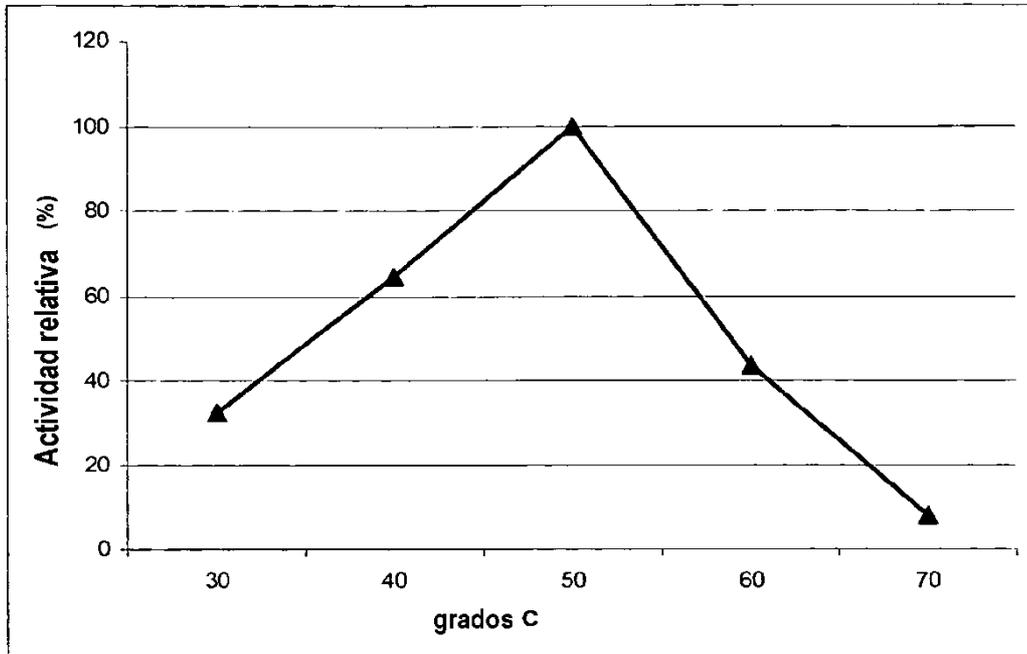


**Fig. 3**



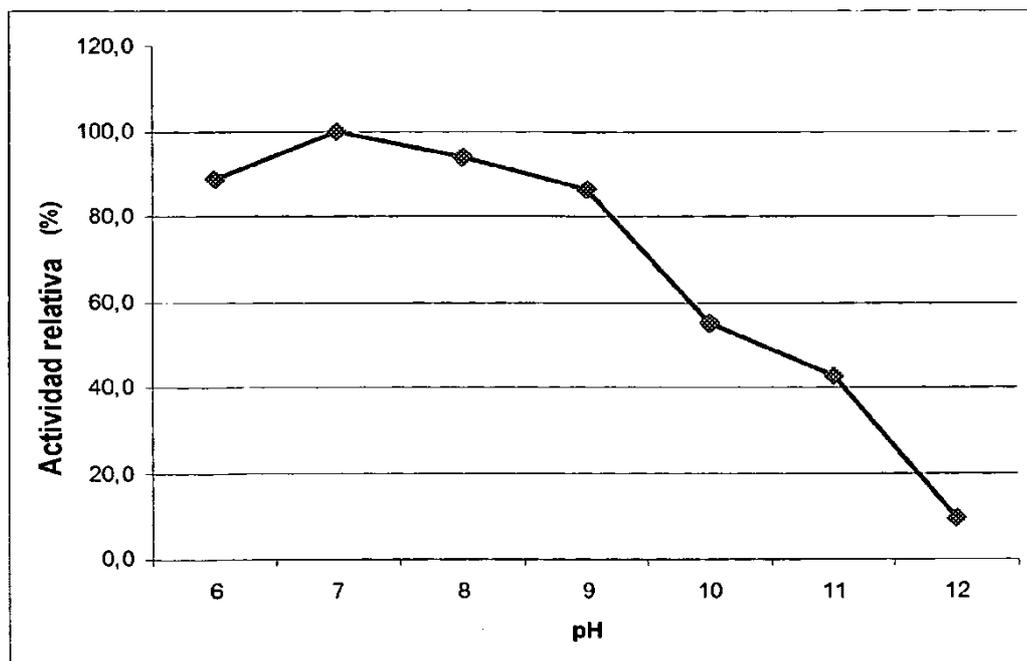
**Fig. 4A**

Perfil de temperatura de la proteína Fa\_RF7182 recombinante  
pH usando 15 min.



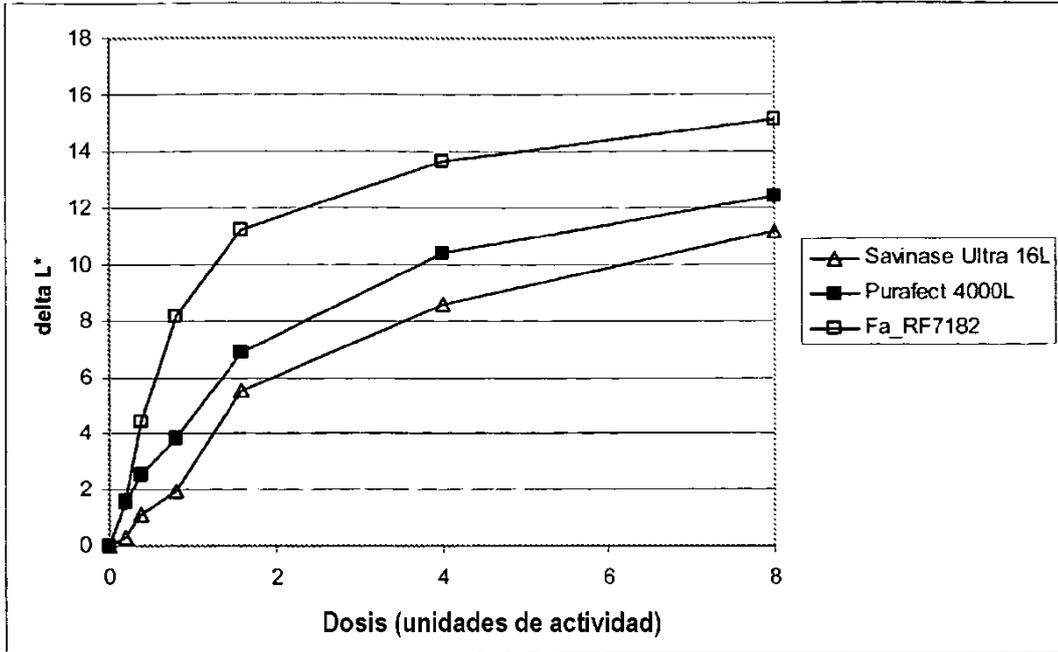
**Fig. 4B**

Efecto del pH sobre la actividad de la proteína Fa\_RF7182 recombinante  
Tampón Britton-Robinson 40 mM  
pH 6 a pH 12 y la temperatura de reacción fue 50°C, 15 min.



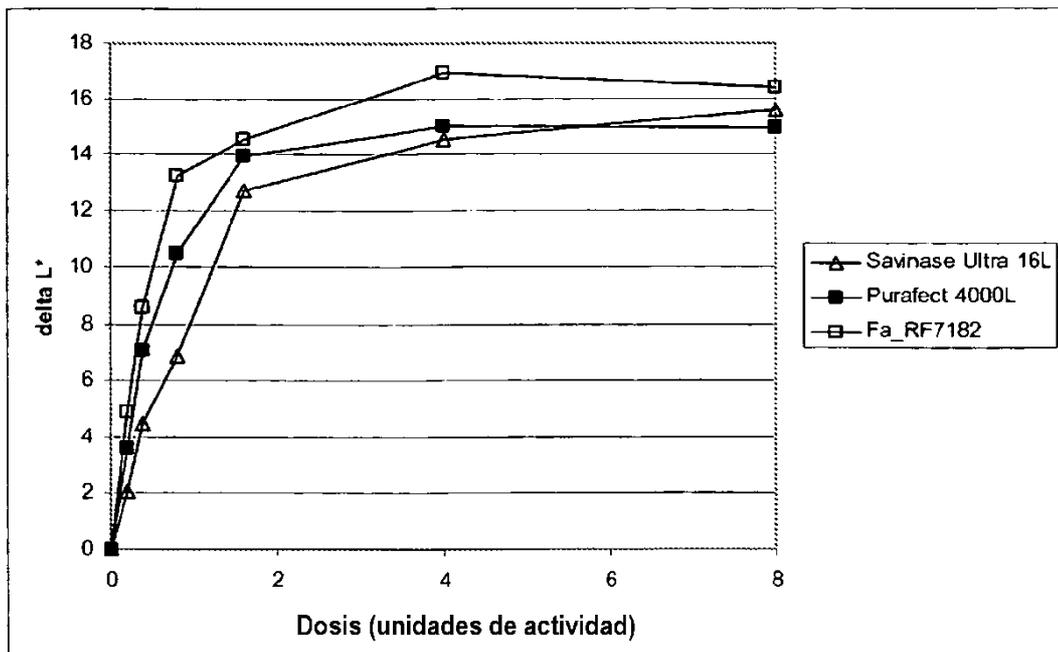
**Fig. 5**

Eficacia de la proteína Fa\_RF7182 recombinante  
 Mancha de sangre-leche-tinta  
 30°C, pH 9, 60 min.



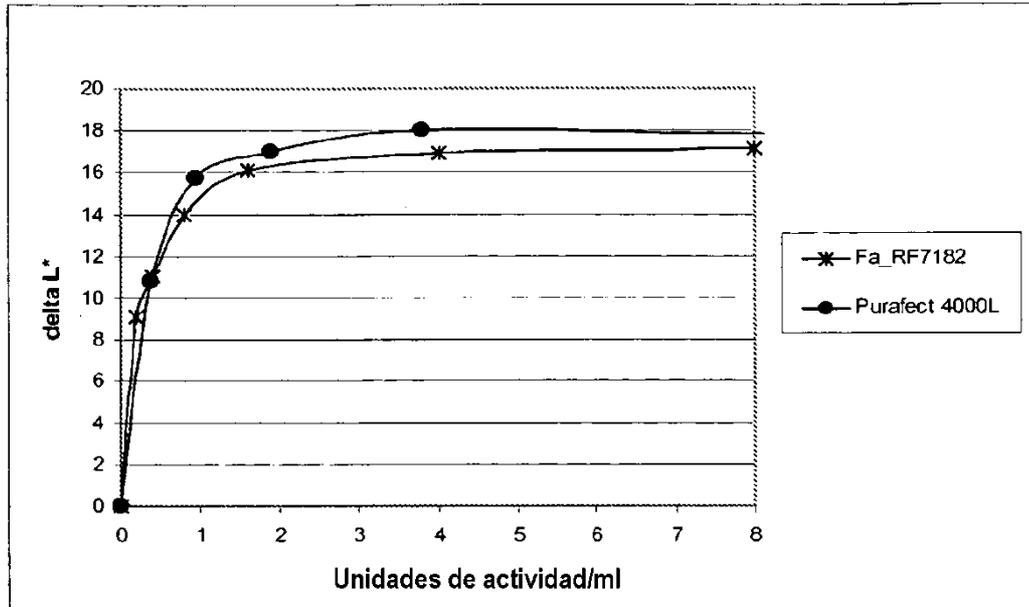
**Fig. 6**

Eficacia de la proteína Fa\_RF7182  
 Mancha de sangre-leche-tinta  
 50°C, pH 9, 60 min.



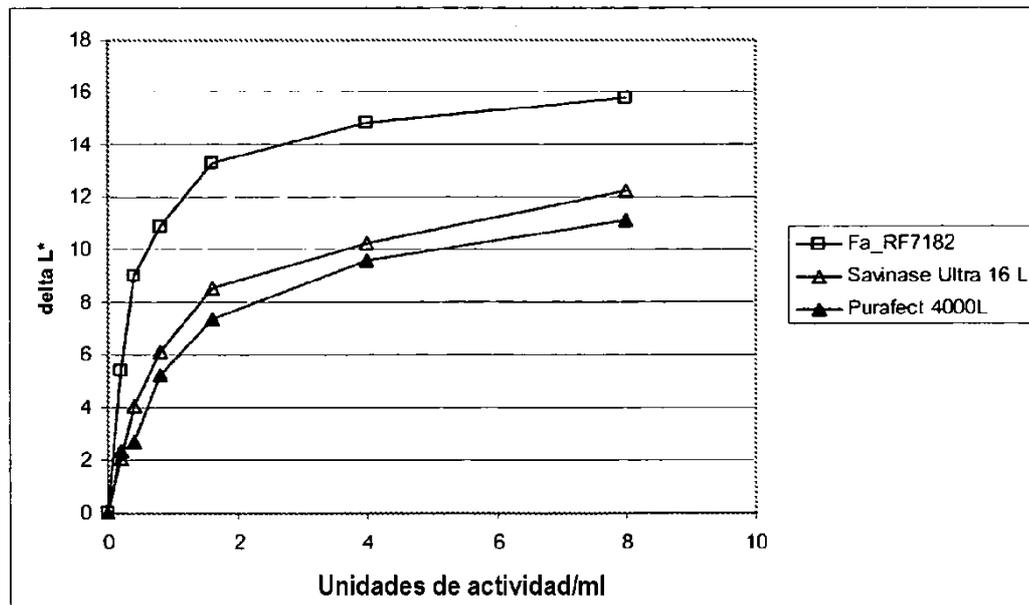
**Fig. 7**

Eficacia de la proteína Fa\_RF7182 recombinante  
 Mancha de sangre-leche-tinta  
 Detergente en polvo  
 40°C y pH 10



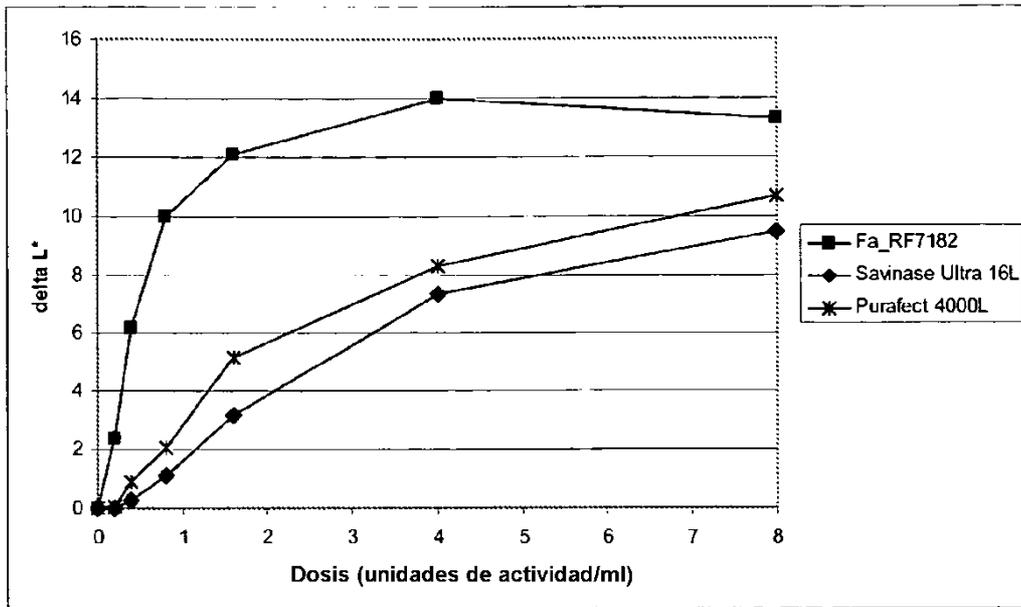
**Fig. 8**

Eficacia de la proteína Fa\_RF7182 recombinante  
 Mancha de sangre-leche-tinta  
 Detergente líquido Ariel Sensitive  
 40°C, pH aprox. 7.9, 60 min.



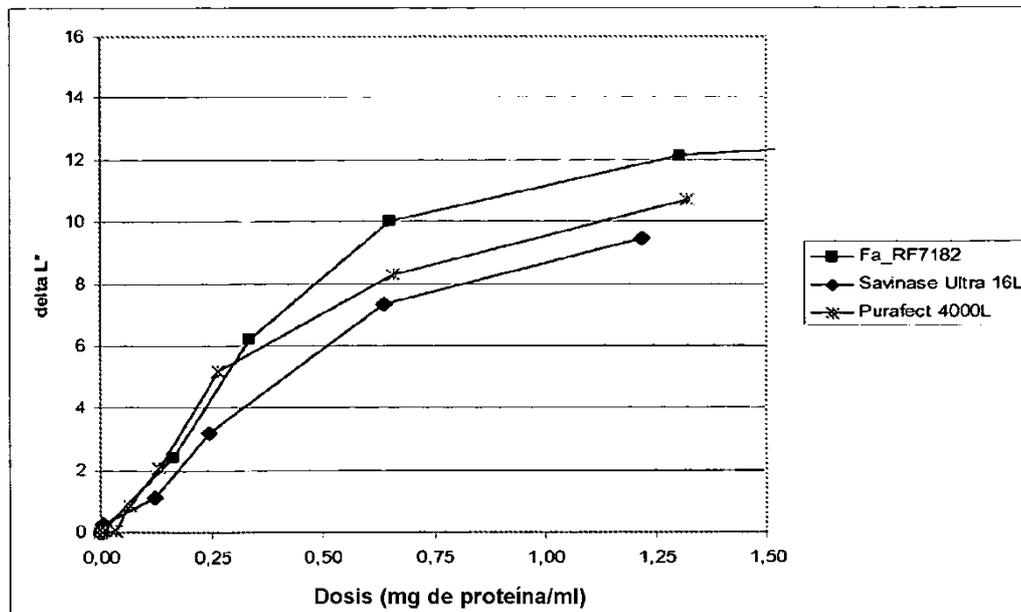
**Fig. 9A**

Eficacia de la proteína Fa\_RF7182 recombinante  
 Mancha de sangre-leche-tinta  
 Detergente líquido de base para tejidos de color  
 30°C, concentración de detergente 5 g/l y pH 7,5



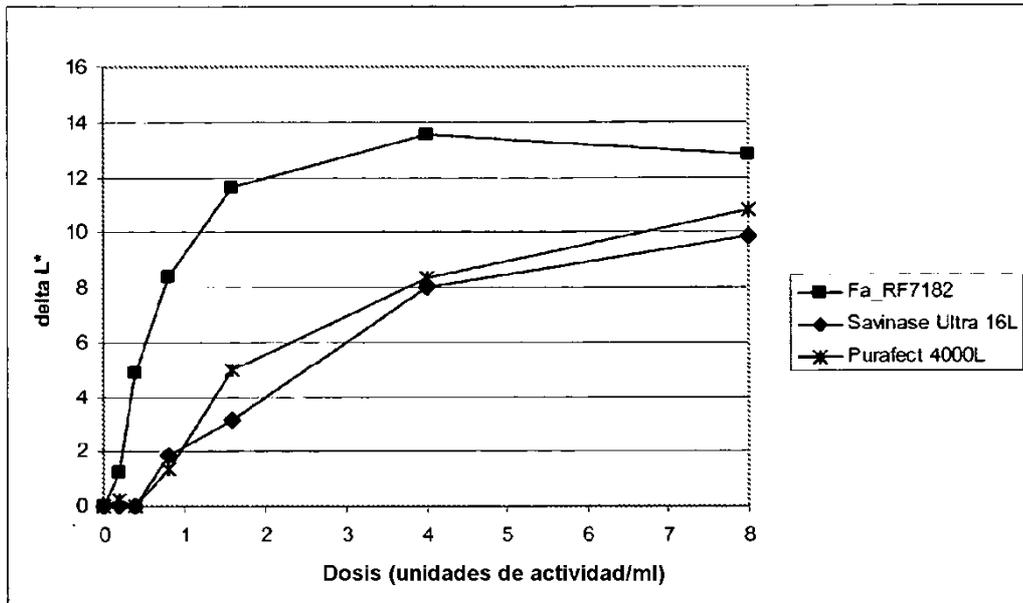
**Fig. 9B**

Eficacia de la proteína Fa\_RF7182 recombinante  
 Mancha de sangre-leche-tinta  
 Detergente líquido de base para tejidos de color  
 30°C, concentración de detergente 5 g/l (dosis de enzima calculada como proteína)



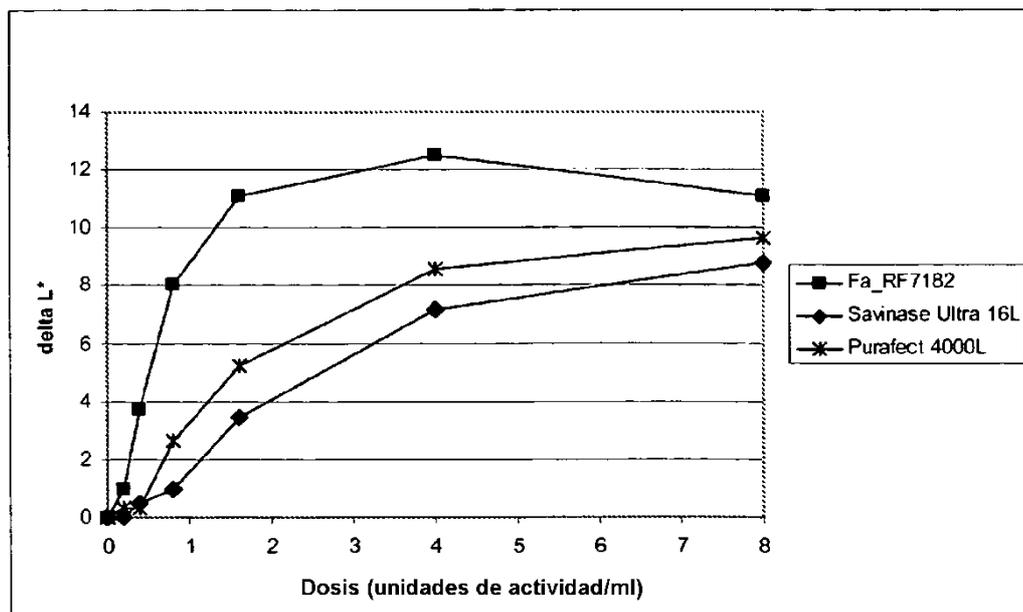
**Fig. 9C**

Eficacia de la proteína Fa\_RF7182 recombinante  
 Mancha de sangre-leche-tinta  
 Detergente líquido de base para tejidos de color  
 30°C, concentración de detergente 3,3 g/l y pH 7,4



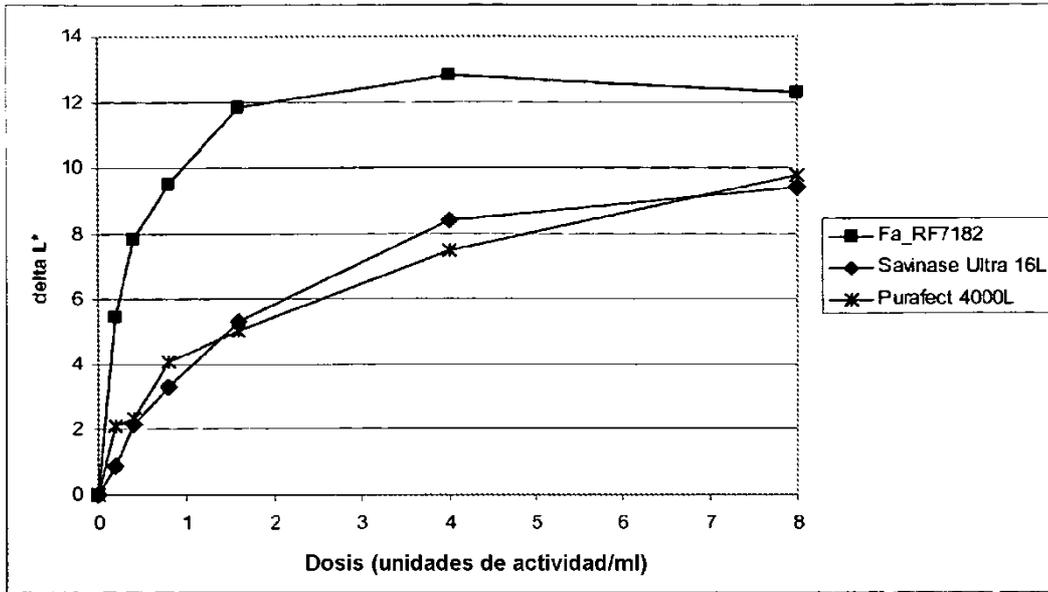
**Fig. 9D**

Eficacia de la proteína Fa\_RF7182 recombinante  
 Mancha de sangre-leche-tinta  
 Detergente líquido de base para tejidos de color  
 30°C, concentración de detergente 1 g/l y pH 7,3



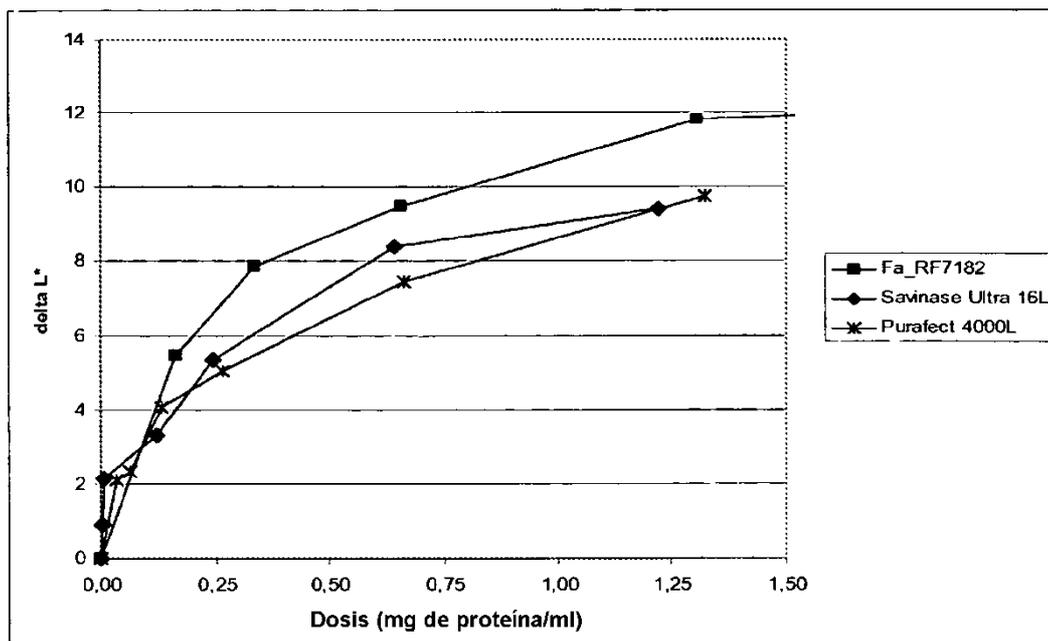
**Fig. 10A**

Eficacia de la proteína Fa\_RF7182 recombinante  
 Mancha de sangre-leche-tinta  
 Ariel Sensitive  
 30°C, concentración de detergente 5 g/l y pH 8



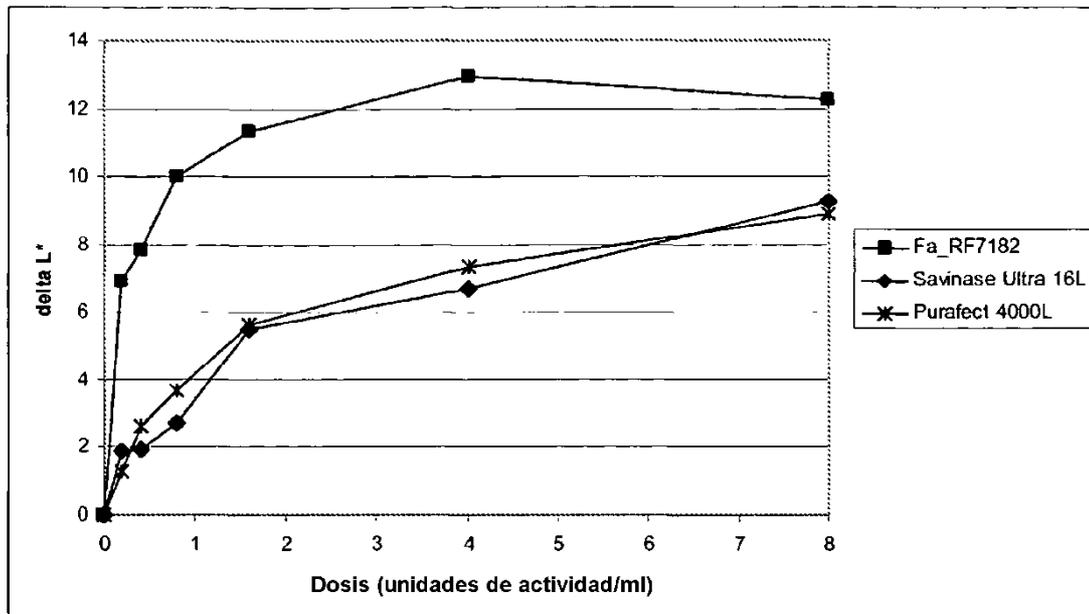
**Fig. 10B**

Eficacia de la proteína Fa\_RF7182 recombinante  
 Mancha de sangre-leche-tinta  
 Ariel Sensitive  
 30°C, concentración de detergente 5 g/l (dosis de enzima calculada como proteína)



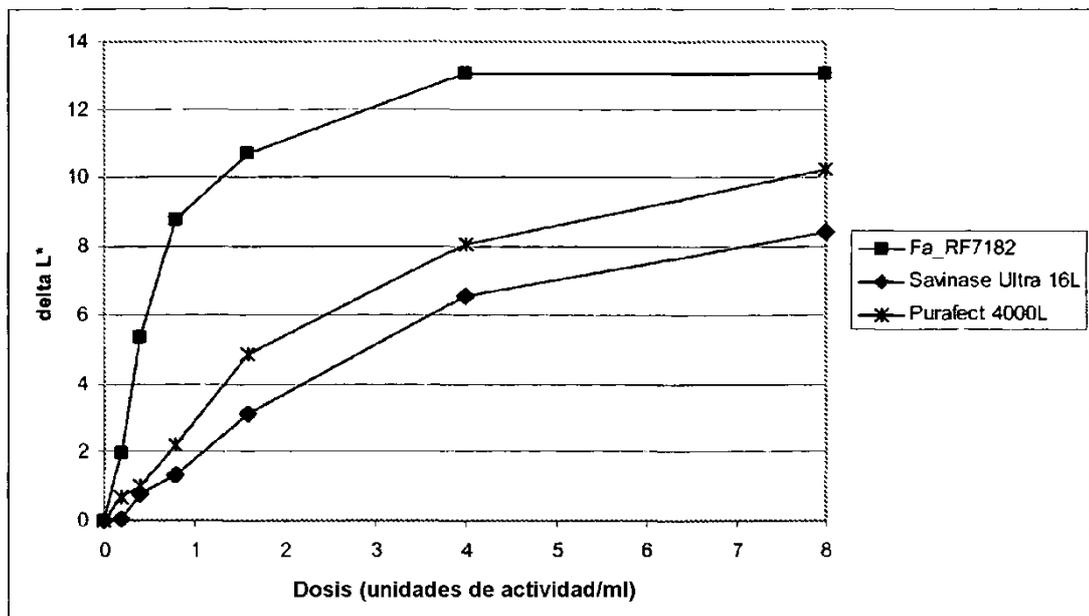
**Fig. 10C**

Eficacia de la proteína Fa\_RF7182 recombinante  
 Mancha de sangre-leche-tinta  
 Ariel Sensitive  
 30°C, concentración de detergente 3,3 g/l y pH 7,9



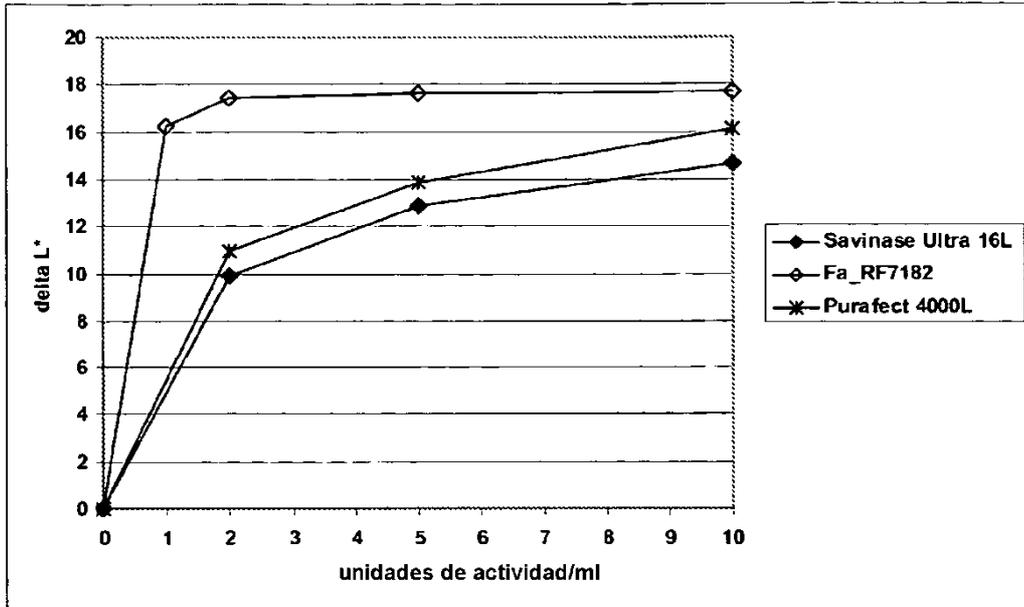
**Fig. 10D**

Eficacia de la proteína Fa\_RF7182 recombinante  
 Mancha de sangre-leche-tinta  
 Ariel Sensitive  
 30°C, concentración de detergente 1 g/l y pH 7,6



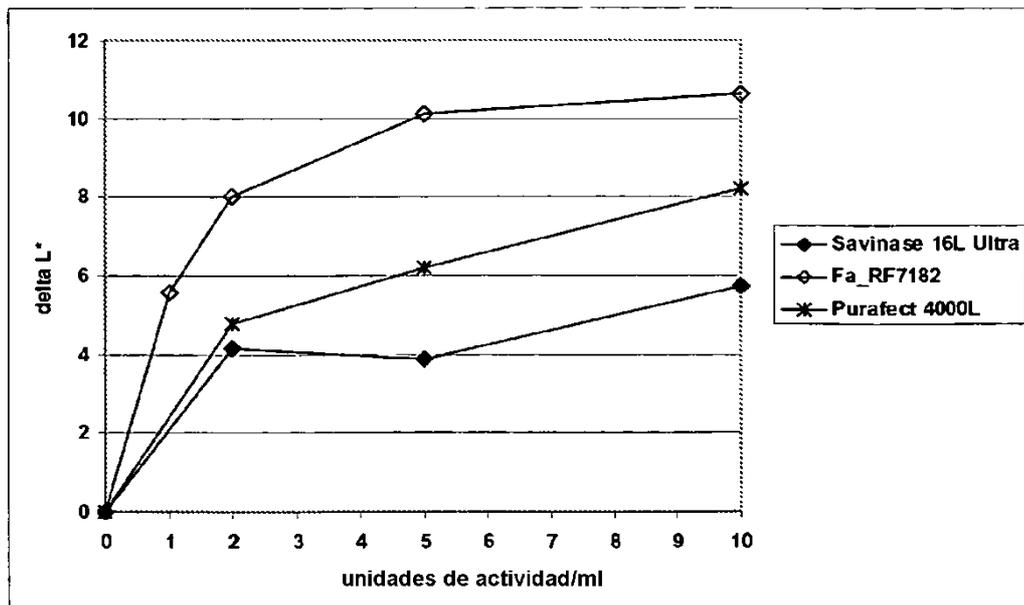
**Fig. 11A**

Eficacia de la proteína Fa\_RF7182 recombinante  
 Prueba Launder Ometer  
 Detergente líquido de base para tejidos de color, 30°C  
 Sangre-leche-tinta / PE-algodón



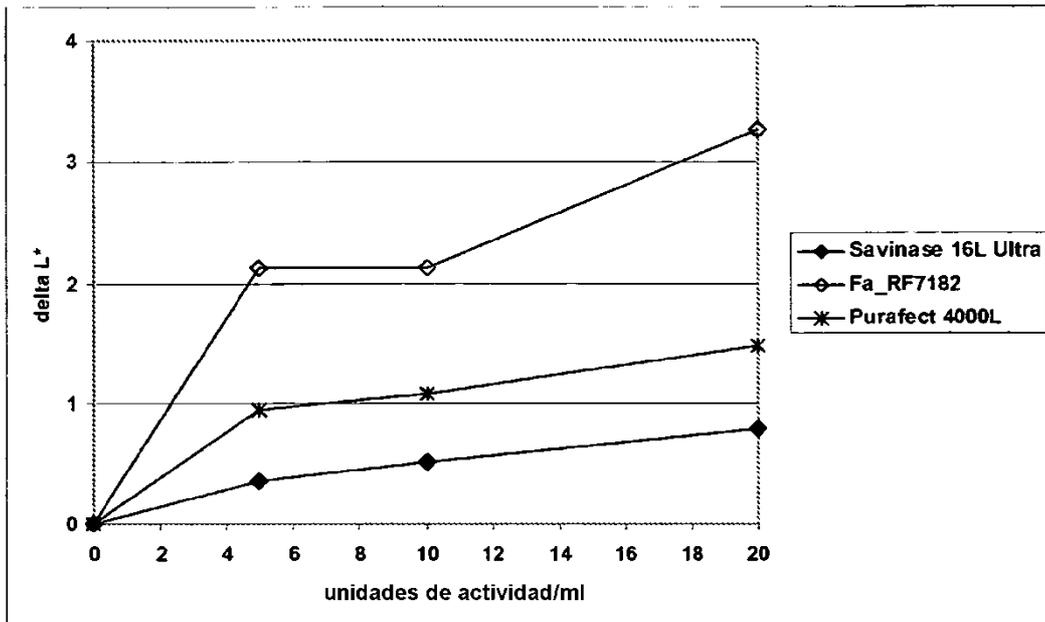
**Fig. 11B**

Eficacia de la proteína Fa\_RF7182 recombinante  
 Prueba Launder Ometer  
 Detergente líquido de base para tejidos de color, 30°C  
 Sangre-leche-tinta / PE-algodón



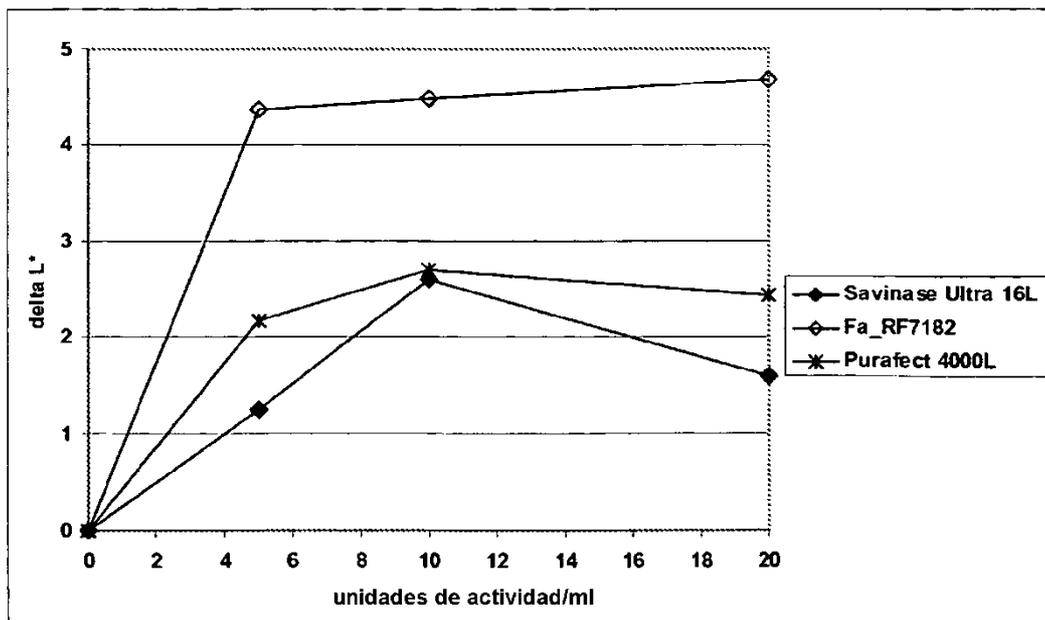
**Fig. 11C**

Eficacia de la proteína Fa\_RF7182 recombinante  
 Prueba Launder Ometer  
 Detergente líquido de base para tejidos de color, 30°C  
**Grasa**



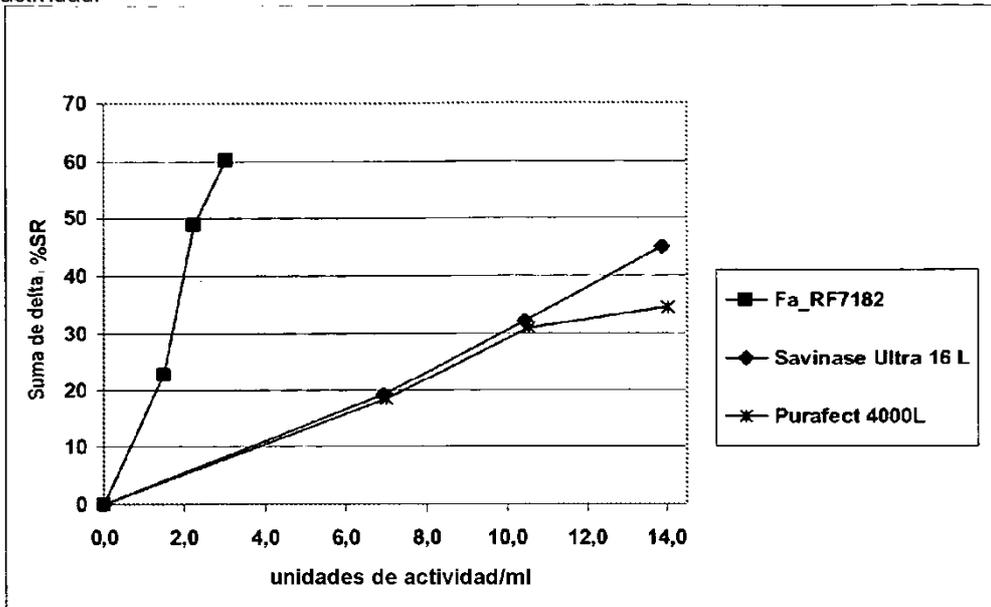
**Fig. 11D**

Eficacia de la proteína Fa\_RF7182 recombinante  
 Prueba Launder Ometer  
 Detergente líquido de base para tejidos de color, 30°C  
**Cacao**



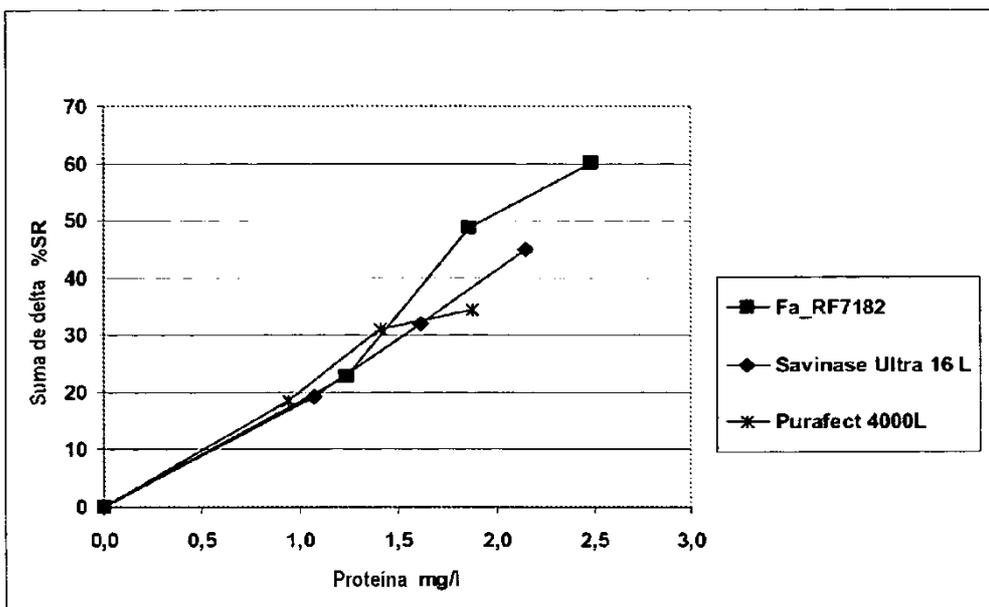
**Fig. 12A**

Eficiencia de eliminación de todas las manchas (delta %SR) del preparado de la enzima Fa\_RF7182 en ocho cepas sensibles a proteasa en pruebas a gran escala.  
 Eficiencia de eliminación de todas las manchas cuando los preparados de proteasa se administran según la actividad.



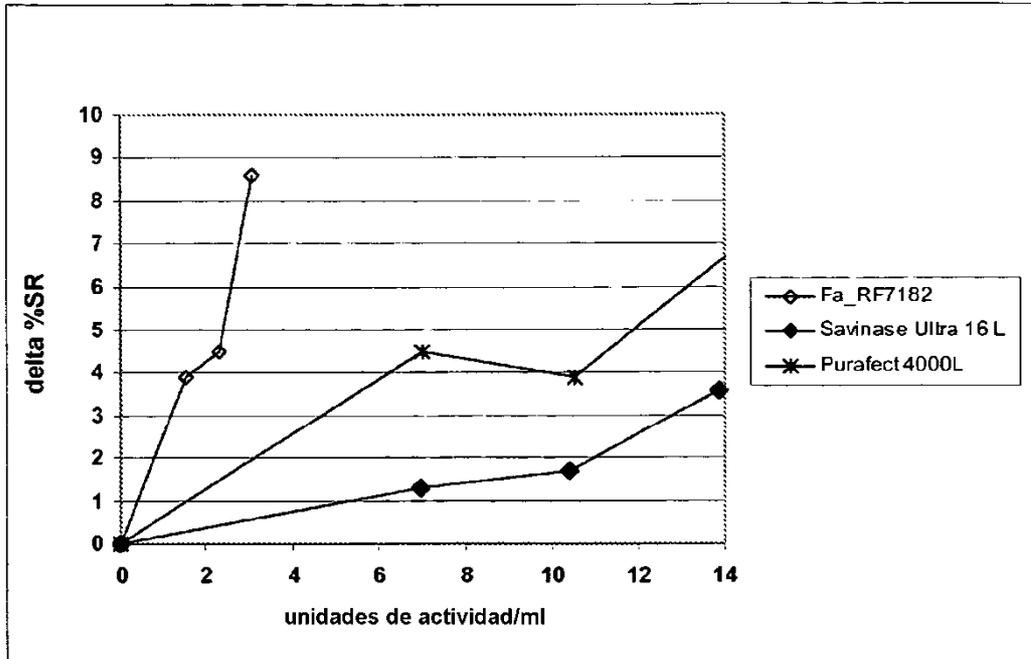
**Fig. 12B**

Eficiencia de eliminación de todas las manchas (delta %SR) del preparado de la enzima Fa\_RF7182 en ocho cepas sensibles a proteasa en pruebas a gran escala.  
 Eficiencia de eliminación de todas las manchas cuando los preparados de proteasa se administran según la cantidad de proteína.



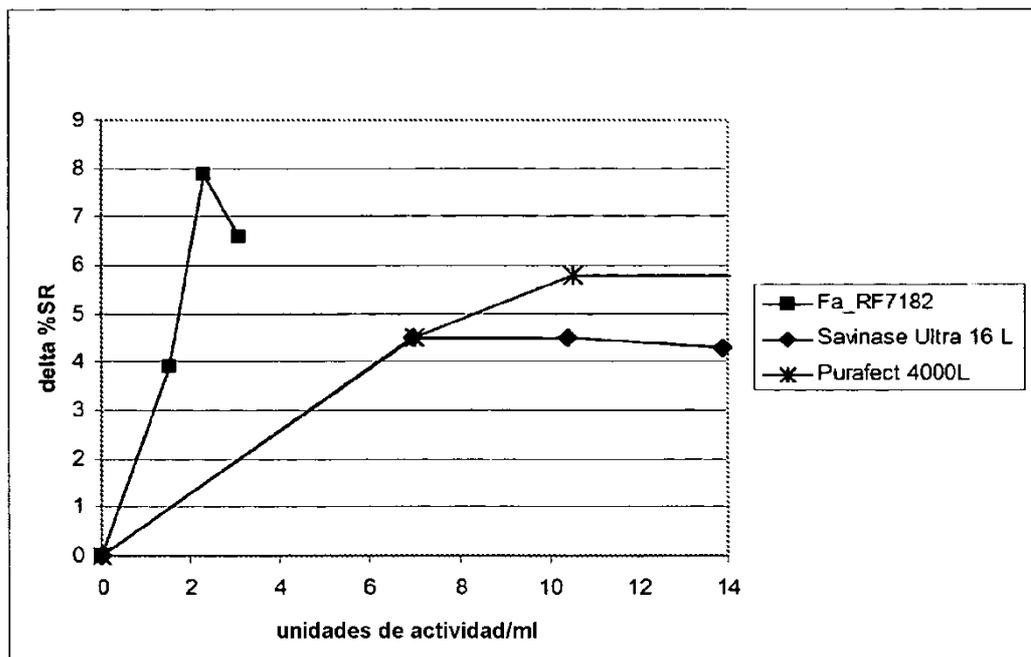
**Fig. 13A**

Eliminación de manchas efectuada detergente líquido de base para tejidos de color en prueba a gran escala a 30°C. Chocolate leche/pigmento/algodón (C-03-030/CFT)



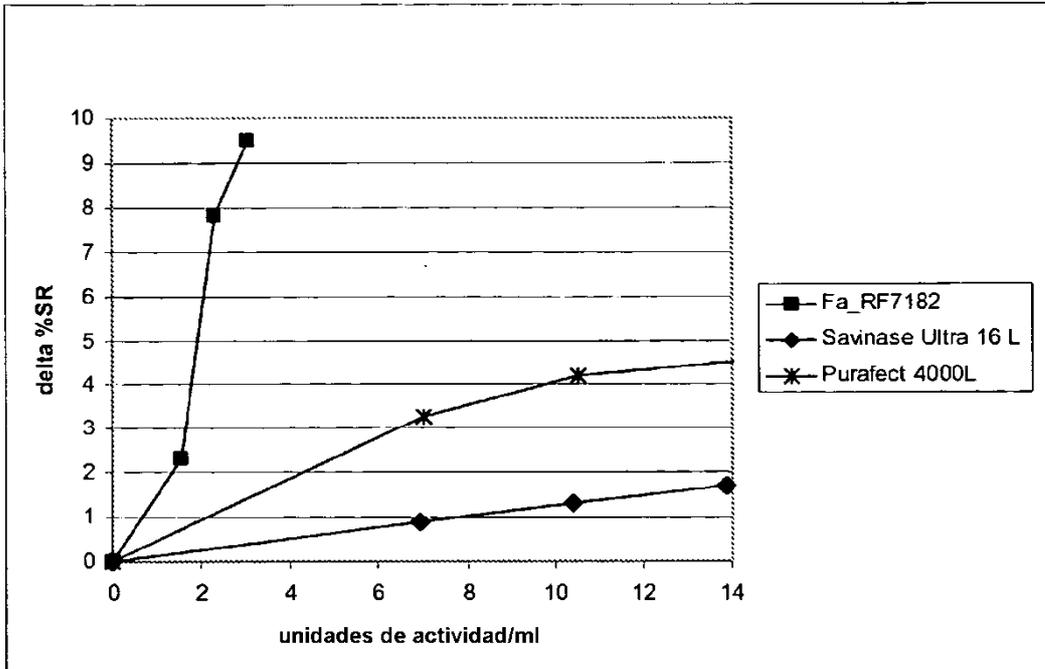
**Fig. 13B**

Eliminación de manchas efectuada detergente líquido de base para tejidos de color en prueba a gran escala a 30°C. Chocolate-leche-tinta//algodón (C-05-059b/CFT)



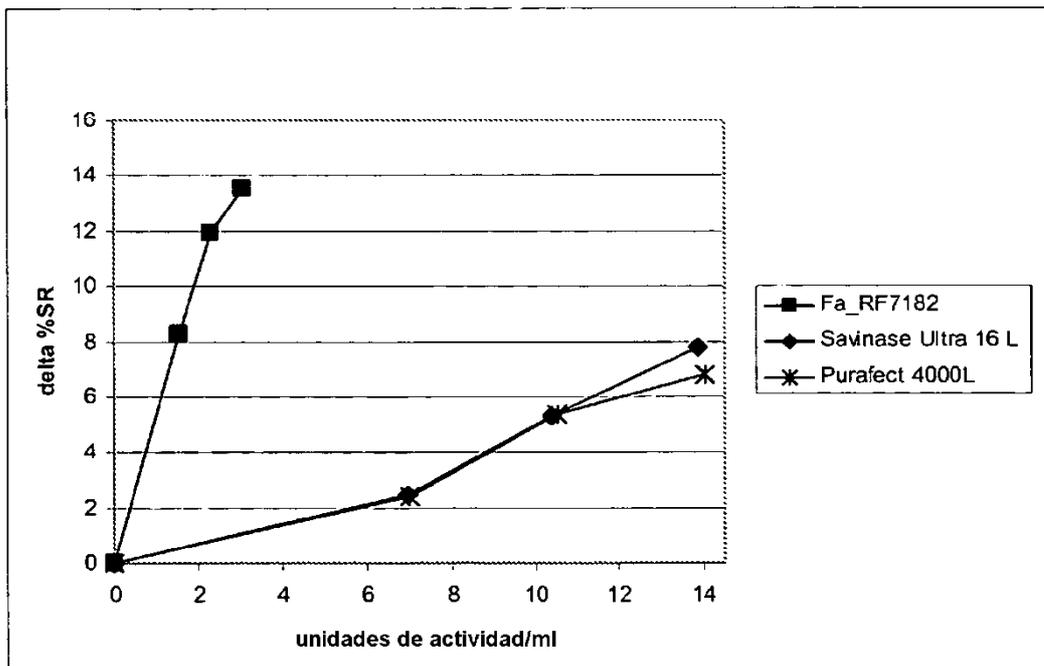
**Fig. 13C**

Eliminación de manchas efectuada detergente líquido de base para tejidos de color en prueba a gran escala a 30°C. Sangre/leche/tinta/PE-algodón (C-05-014/CFT)



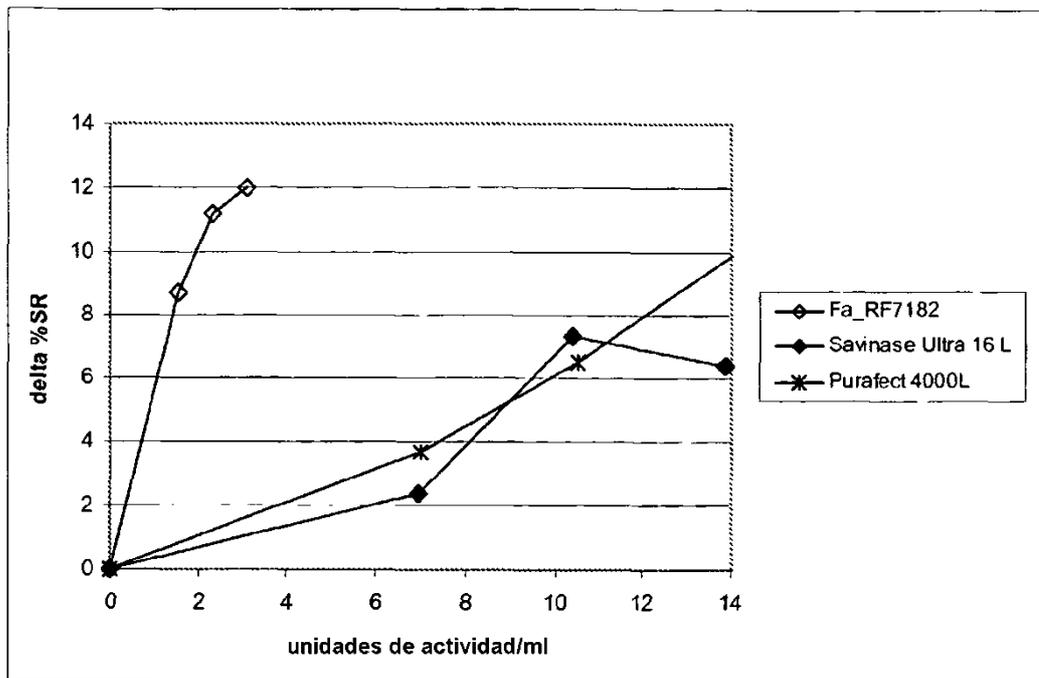
**Fig. 13D**

Eliminación de manchas efectuada detergente líquido de base para tejidos de color en prueba a gran escala a 30°C. Aceite de cacahuete/leche/algodón (C-05-014/CFT)



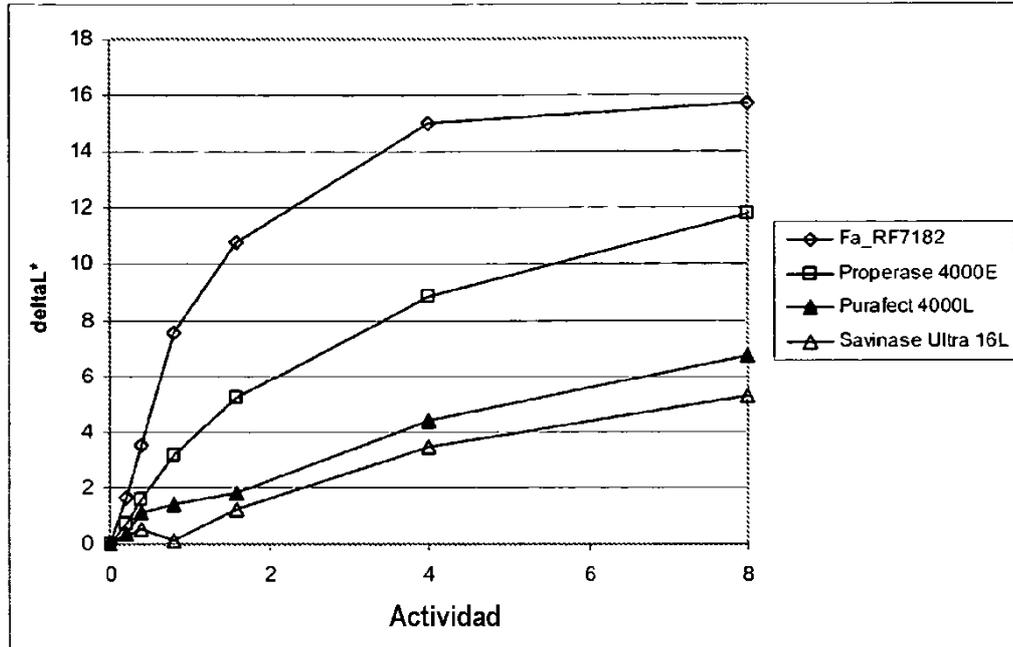
**Fig. 13E**

Eliminación de manchas efectuada detergente líquido de base para tejidos de color en prueba a gran escala a 30°C.  
Yema de huevo/pigmento/algodón (CS-38-010/CFT)



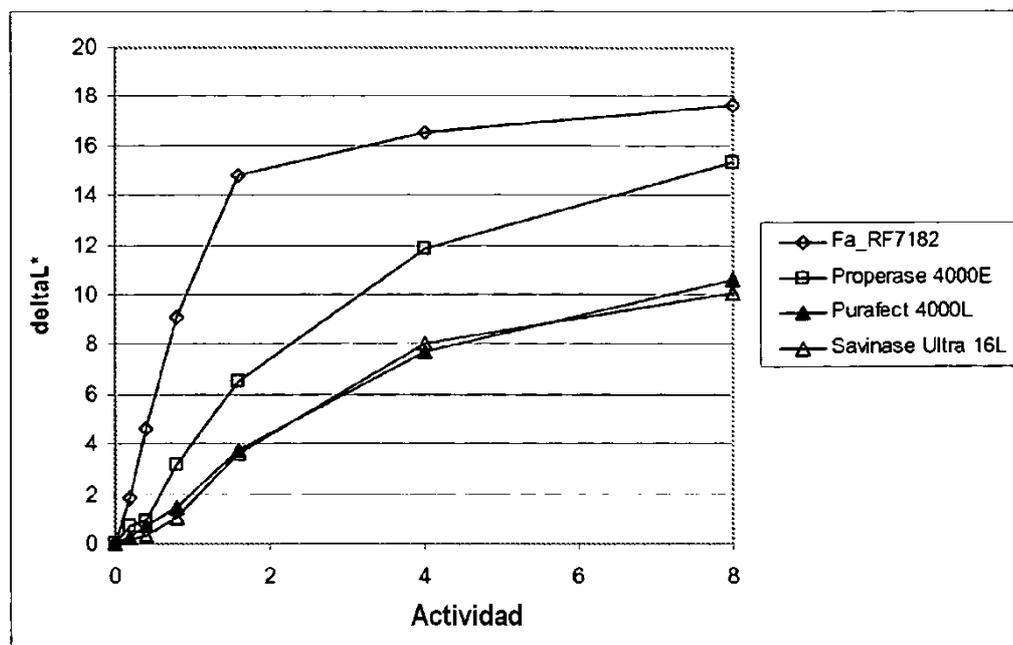
**Fig. 14A**

Eficacia de la proteína Fa\_RF7182 recombinante  
 Mancha de sangre-leche-tinta  
 10°C, pH 9, 60 min



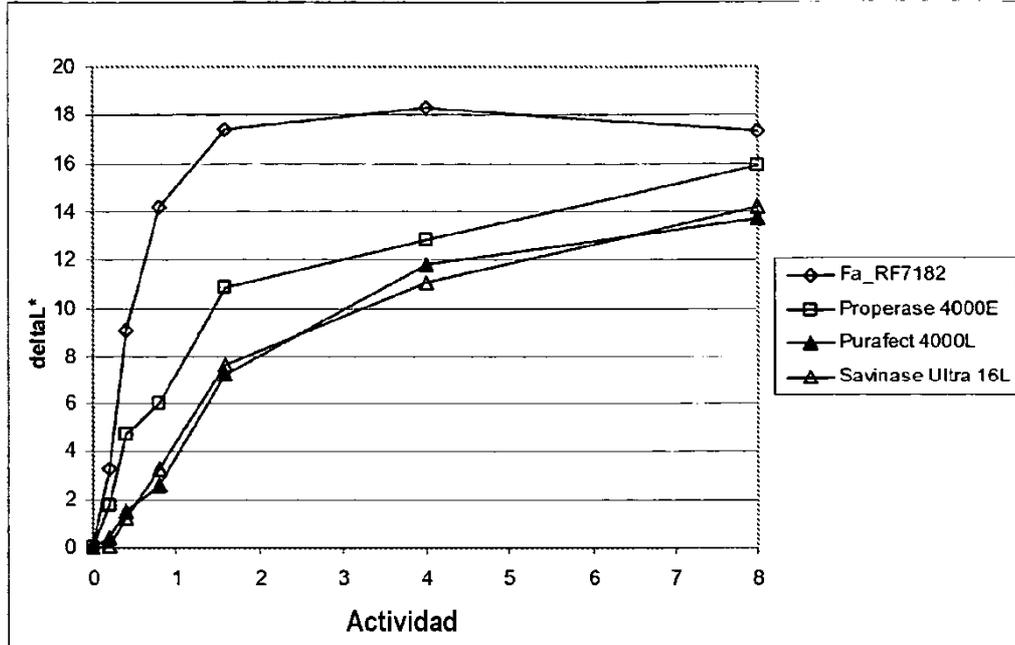
**Fig. 14B**

Eficacia de la proteína Fa\_RF7182 recombinante  
 Mancha de sangre-leche-tinta  
 20°C, pH 9, 60 min



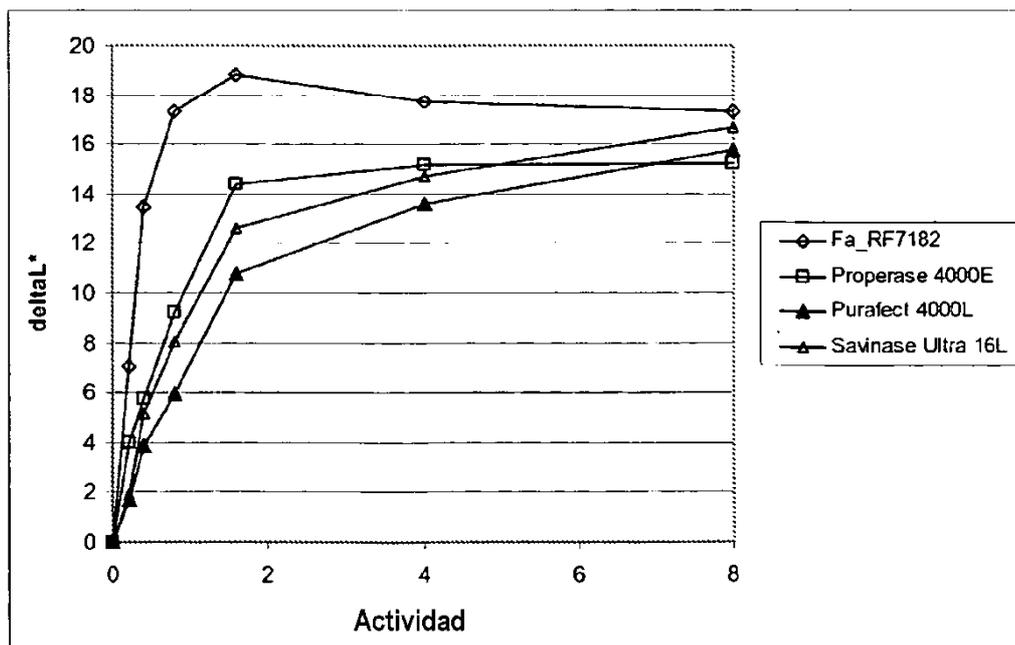
**Fig. 14C**

Eficacia de la proteína Fa\_RF7182 recombinante  
 Mancha de sangre-leche-tinta  
 30°C, pH 9, 60 min



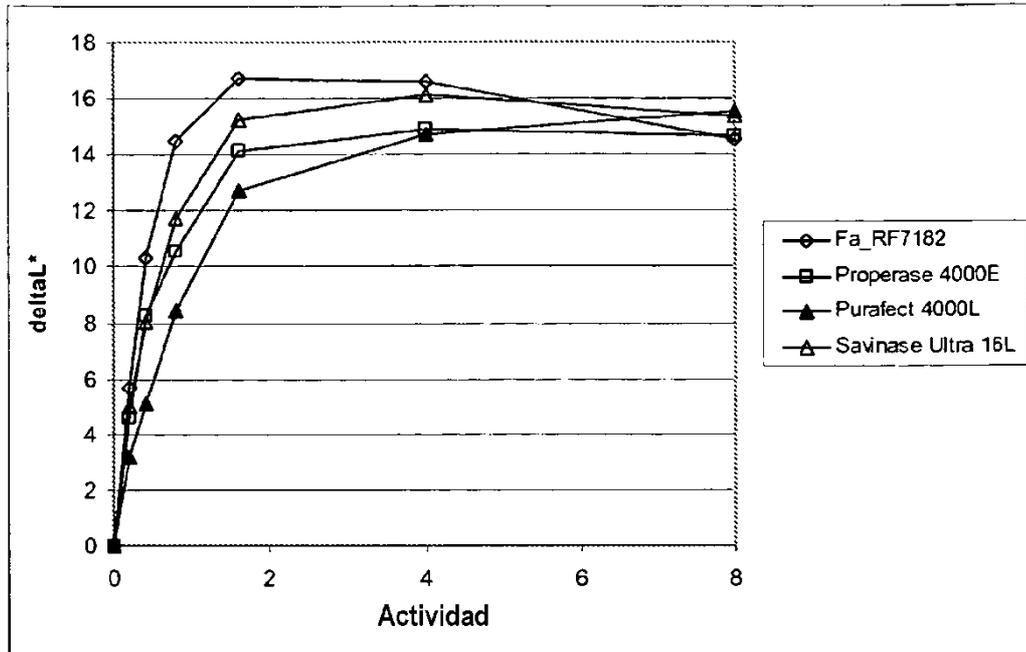
**Fig. 14D**

Eficacia de la proteína Fa\_RF7182 recombinante  
 Mancha de sangre-leche-tinta  
 40°C, pH 9, 60 min



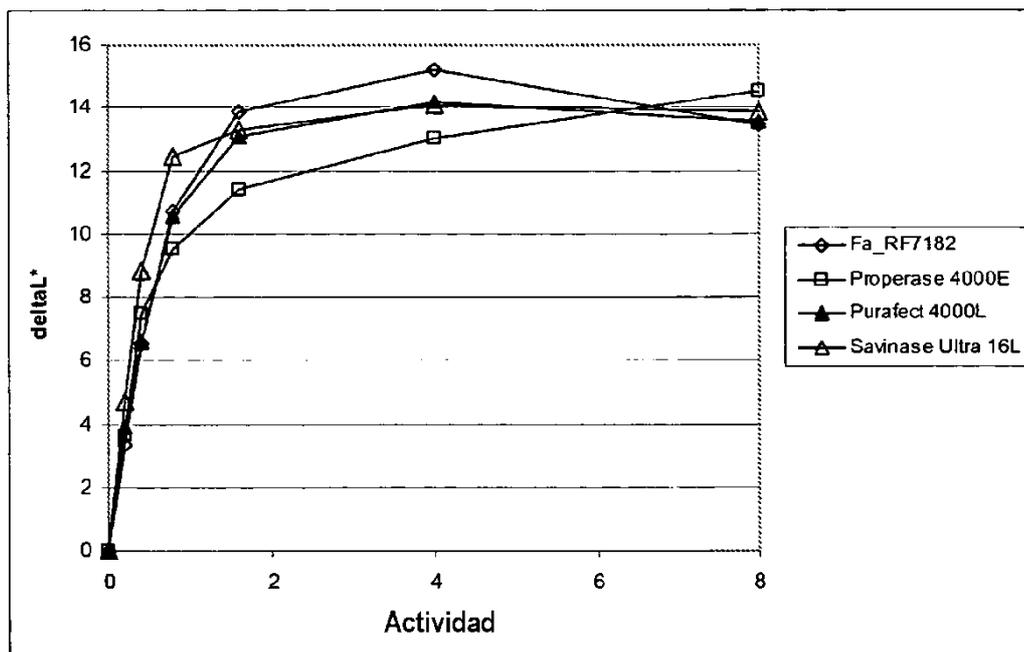
**Fig. 14E**

Eficacia de la proteína Fa\_RF7182 recombinante  
 Mancha de sangre-leche-tinta  
 50°C, pH 9, 60 min



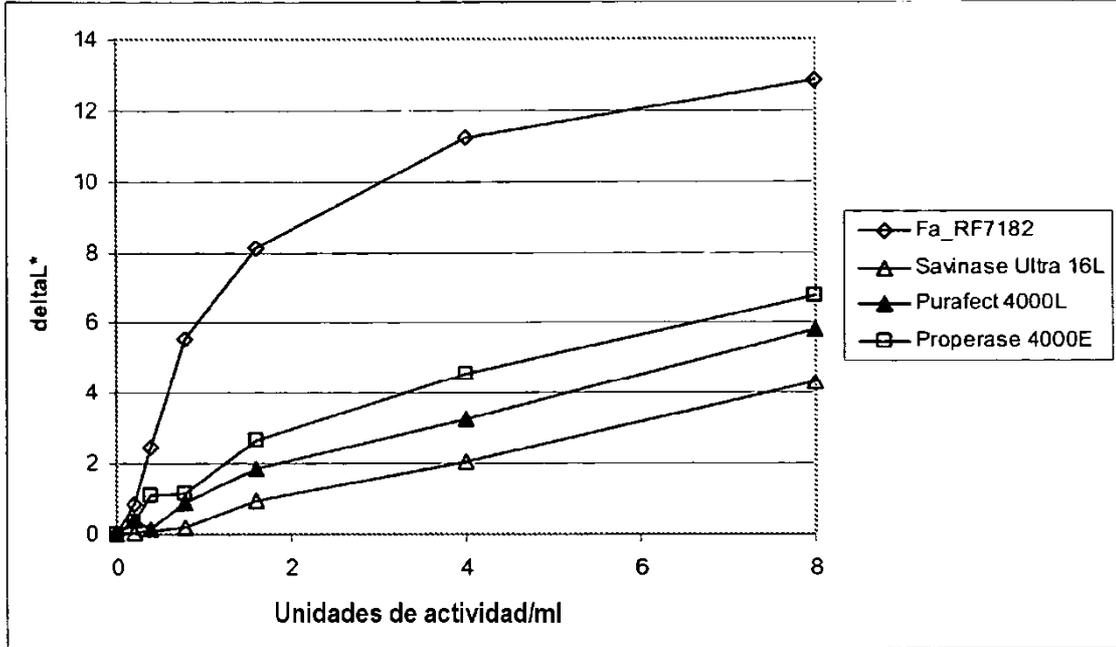
**Fig. 14F**

Eficacia de la proteína Fa\_RF7182 recombinante  
 Mancha de sangre-leche-tinta  
 60°C, pH 9, 60 min



**Fig. 15A**

Eficacia de la proteína Fa\_RF7182 recombinante  
 Mancha de sangre-leche-tinta  
 Detergente líquido de base  
 10°C, concentración de detergente 3,3 g/l



**Fig. 15B**

Eficacia de la proteína Fa\_RF7182 recombinante  
 Mancha de sangre-leche-tinta  
 Detergente líquido de base  
 20°C, concentración de detergente 3,3 g/l

