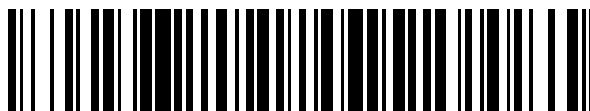


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 628 190**

51 Int. Cl.:

C12N 9/52 (2006.01)

C11D 3/386 (2006.01)

A23K 20/189 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.09.2012** **PCT/EP2012/068676**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.03.2013** **WO13041689**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.09.2012** **E 12759776 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.03.2017** **EP 2751266**

54 Título: **Polipéptidos con actividad de proteasa y polinucleótidos que codifican los mismos**

30 Prioridad:

22.09.2011 EP 11182325

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

02.08.2017

73 Titular/es:

**NOVOZYMES A/S (100.0%)
Krogshoejvej 36
2880 Bagsvaerd, DK**

72 Inventor/es:

**TAMS, JEPPE, WEGENER;
HOFF, TINE;
GJERMANSSEN, MORTEN;
OESTERGAARD, PETER, RAHBK;
OLINSKI, ROBERT, PIOTR;
PONTOPPIDAN, KATRINE y
SJOEHOLM, CARSTEN**

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 628 190 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

Polipéptidos con actividad de proteasa y polinucleótidos que codifican los mismos

5 REFERENCIA A UN LISTADO DE SECUENCIAS

[0001] Esta solicitud contiene un listado de secuencias en formato legible por ordenador.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

10 Campo de la invención

[0002] La presente invención se refiere a polipéptidos aislados que tienen actividad de proteasa y secuencias de ácidos nucleicos aisladas que codifican las proteasas. La invención también se refiere a constructos de ácidos nucleicos, vectores, y células huésped, incluyendo células vegetales y animales, que comprenden las secuencias de ácidos nucleicos, al igual que a métodos para producir y utilizar las proteasas, en particular el uso de las proteasas en pienso para animales y detergentes.

DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA RELACIONADA

[0003] La presente invención proporciona polipéptidos con actividad de proteasa y polinucleótidos que codifican los polipéptidos.

[0004] La industria de los detergentes ha implementado durante más de 30 años diferentes enzimas en formulaciones detergentes, las enzimas usadas más frecuentemente incluyen proteasas, amilasas y lipasas cada una adaptada para eliminar varios tipos de manchas. Además de las enzimas, las composiciones detergentes incluyen típicamente una combinación compleja de ingredientes. Por ejemplo, muchos productos de limpieza incluyen sistemas tensioactivos, agentes blanqueantes o constructores. A pesar de la complejidad de los detergentes actuales, sigue habiendo una necesidad de desarrollar nuevas composiciones detergentes que comprendan nuevas enzimas y/o mezclas enzimáticas.

[0005] Generalmente, el lavado se ha hecho a temperaturas elevadas y se ha seleccionado los detergentes ampliamente conocidos de modo que funcionen a temperaturas más altas.

[0006] El aumento del interés en la mejora de los procesos de lavado para hacerlos más respetuosos con el medioambiente ha resultado en una tendencia global hacia la reducción el tiempo de lavado, el pH y la temperatura y hacia la disminución de la cantidad de componentes detergentes que puedan influir negativamente en el medio ambiente.

[0007] Por lo tanto, existe el deseo de lavar a temperaturas inferiores y, por lo tanto, una necesidad de proteasas detergentes con un rendimiento alto a bajas temperaturas.

[0008] En el uso de proteasas en pienso para animales (*in vivo*) y/o el uso de tales proteasas para tratar proteínas vegetales (*in vitro*), cabe señalar que las proteínas son factores nutricionales esenciales para los animales y los seres humanos. Muchos animales de ganadería y muchos seres humanos obtienen las proteínas necesarias de fuentes de proteína vegetales. Las fuentes de proteína vegetales importantes son, por ejemplo, las plantas de cultivo oleaginosas, las legumbres y los cereales.

[0009] Cuando, por ejemplo, se incluye harina de soja en el pienso de animales monogástricos tales como cerdos y aves, una proporción significativa de los sólidos de la harina de soja no se digiere eficazmente (la digestibilidad ileal aparente de proteínas en lechones, cerdos en crecimiento y aves tales como broilers, gallinas ponedoras y gallos es sólo de alrededor del 80%).

[0010] El tubo digestivo de los animales consiste en una serie de segmentos cada uno de los cuales representa entornos de pH distinto. En animales monogástricos tales como los cerdos y las aves y muchos peces, el estómago muestra un pH fuertemente ácido tan bajo como pH 1-2, mientras que el intestino muestra un pH más neutro en el rango de pH 6-7. Las aves, además del estómago y el intestino, también tienen un buche que precede al estómago, y el pH del buche está determinado en su mayor parte por el pienso ingerido y, por lo tanto, típicamente está en el rango de pH 4-6. La digestión de proteínas por una proteasa puede ocurrir a lo largo de todo el tubo digestivo, suponiendo que la proteasa esté activa y sobreviva a las condiciones del tubo digestivo. Por lo tanto, las proteasas que son altamente estables al ácido para su supervivencia en el entorno gástrico y al mismo tiempo son activas de manera eficaz a un amplio pH fisiológico del animal en cuestión son especialmente deseables.

[0011] Asimismo, el pienso para animales frecuentemente se formula en forma granulada, donde se aplica vapor en el proceso de granulación. Por lo tanto, también es deseable que las proteasas usadas en pienso para animales sean capaces de permanecer activas después de la exposición a un tratamiento con vapor.

[0012] El uso de proteasas en pienso para animales para mejorar la digestión de las proteínas presentes en el pienso es conocido. WO 95/28850 divulga la combinación de una fitasa y una o más enzimas proteolíticas microbianas para mejorar la solubilidad de las proteínas vegetales. WO 01/58275 divulga el uso de proteasas estables al ácido de la familia de la subtilisina en pienso para animales. WO 01/58276 divulga el uso en pienso para animales de proteasas estables al ácido relacionadas con la proteasa derivada de *Nocardia* sp. NRRL 18262 (la proteasa 10R), al igual que una proteasa derivada de *Nocardia* alba DSM 14010. WO 04/072221, WO 04/111220, WO 04/111223, WO 05/035747, y WO 05/123911 divulgan proteasas relacionadas con la proteasa 10R y su uso en pienso para animales.

Asimismo, WO 04/072279 divulga el uso de otras proteasas.

[0013] WO 04/034776 divulga el uso de una subtilisina/queratinasa, PWD-1 de *B. Licheniformis* en pienso para aves. WO 04/077960 divulga un método para aumentar la digestibilidad del forraje o grano en rumiantes aplicando una proteasa bacteriana o fúngica.

[0014] Los productos comerciales que comprenden una proteasa y están comercializados para usar en pienso para animales incluyen RONOZYME® ProAct (DSM NP/Novozymes), Axtra® (Danisco), Avizyme® (Danisco), Porzyme® (Danisco), Allzyme™ (Alltech), Versazyme® (BioResources, Int.), Poultrygrow™ (Jefo) y Cibenza® DP100 (Novus). La base de datos UniProt del 2 de marzo de 2010 divulga una proteína de prodominio alfa-lítico de peptidasa de *Kribbella flavida*, cepa DSM17836/JCM10339/NBRC14399.

RESUMEN DE LA INVENCION

[0015] La presente invención se refiere a un polipéptido aislado con actividad de proteasa, seleccionado del grupo consistente en:

(a) un polipéptido con al menos 85% de identidad de secuencia con el polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2, donde el polipéptido maduro corresponde a los aminoácidos 189 a 374 de la SEQ ID NO: 2;

(b) un polipéptido codificado por un polinucleótido con al menos 85% de identidad de secuencia con la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 1, donde el polinucleótido maduro corresponde a los nucleótidos 665 a 1222 de la SEQ ID NO: 1;

y
(c) un fragmento del polipéptido de (a) o (b) que tiene actividad de proteasa, donde el polipéptido tiene actividad mejorada de proteasa entre 37°C y 60°C, en comparación con la proteasa 10R (SEQ ID NO 7).

[0016] La presente invención también se refiere a polinucleótidos aislados que codifican los polipéptidos de la presente invención; constructos de ácidos nucleicos; vectores de expresión recombinantes; células huésped recombinantes que comprenden los polinucleótidos; y métodos de producción de los polipéptidos.

[0017] La presente invención también se refiere al uso de las proteasas de la invención en pienso para animales y en detergentes, métodos de producción de las composiciones de pienso para animales y composiciones detergentes, y composiciones de pienso para animales y composiciones detergentes

[0018] La presente descripción también se refiere a un polinucleótido que codifica un péptido señal que comprende o consiste en los aminoácidos 1 a 29 de la SEQ ID NO: 2, un polinucleótido que codifica un propéptido que comprende o consiste en los aminoácidos 30 a 188 de la SEQ ID NO: 2, o un polinucleótido que codifica un péptido señal y un propéptido que comprende o consiste en los aminoácidos 1 a 188 de la SEQ ID NO: 2, cada uno de los cuales está operativamente enlazado a un gen que codifica una proteína; constructos de ácidos nucleicos, vectores de expresión, y células huésped recombinantes que comprenden los polinucleótidos; y métodos de producción de una proteína.

BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

[0019] La Figura 1 muestra la actividad en harina de soja-maíz de la proteasa S1 de *Saccharothrix australiensis* en comparación con la proteasa 10R.

Definiciones

Polipéptidos con actividad de proteasa

[0020] Los polipéptidos con actividad de proteasa, o proteasas, a veces también se designan peptidasas, proteinasas, péptido hidrolasas o enzimas proteolíticas. Las proteasas pueden ser de tipo exo que hidrolizan péptidos empezando por cada extremo de los mismos, o del endotipo que actúa internamente en las cadenas de polipéptidos (endopeptidasas). Las endopeptidasas muestran actividad en sustratos peptídicos bloqueados en el extremo N- y C-terminal que son pertinentes para la especificidad de la proteasa en cuestión.

[0021] El término "proteasa" se define aquí como una enzima que hidroliza enlaces peptídicos. Esta definición de

proteasa también se aplica a la parte de proteasa de los términos "proteasa progenitora" y "variante de proteasa," según se usan en el presente documento. El término "proteasa" incluye cualquier enzima del grupo enzimático EC 3.4 (incluyendo cada una de las trece subclases del mismo). El número EC se refiere a Enzyme Nomenclature 1992 de NC-IUBBM, Academic Press, San Diego, California, incluyendo los suplementos 1-5 publicados en Eur. J. Biochem. 1994, 223,1-5; Eur. J. Biochem. 1995, 232,1-6; Eur. J. Biochem. 1996, 237,1-5; Eur. J. Biochem. 1997, 250,1-6; y Eur. J. Biochem. 1999, 264,610-650; respectivamente. La nomenclatura se complementa y actualiza regularmente; véase, por ejemplo, internet (WWW) en <http://www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/enzyme/index.html>.

[0022] Las proteasas de la invención y para uso según la invención se seleccionan del grupo consistente en:

- (a) proteasas del grupo enzimático EC 3.4.21. ; y/o
- (b) serina proteasas de la familia de la peptidasa S1;

como se describe en Biochem.J. 290:205-218 (1993) y en la base de datos de proteasas MEROPS , versión 9.4 (www.merops.ac.uk). La base de datos se describe en Rawlings, N.D., Barrett, A.J. & Bateman, A. (2010) MEROPS: the peptidase database. Nucleic Acids Res 38, D227-D233.

[0023] Para determinar si una proteasa dada es una serina proteasa, y una proteasa de la familia S1, se hace referencia al manual anterior y los principios indicados en él. Tal determinación puede llevarse a cabo para todo tipo de proteasas, ya sea proteasas de origen natural o de tipo salvaje, o proteasas genéticamente modificadas o sintéticas.

[0024] Las peptidasas de la familia S1 contienen la tríada catalítica en el orden His, Asp, Ser. La mutación de cualquiera de los aminoácidos de la tríada catalítica dará lugar a un cambio o pérdida de la actividad enzimática. Los aminoácidos de la tríada catalítica de la proteasa S1 de *Saccharothrix australiensis* (SEQ ID NO: 2) son probablemente las posiciones His-32, Asp-56 y Ser-136.

[0025] La actividad de proteasa se puede medir utilizando cualquier ensayo, donde se emplee un sustrato, que incluya enlaces peptídicos pertinentes para la especificidad de la proteasa en cuestión. El pH de ensayo y la temperatura de ensayo también se han de adaptar a la proteasa en cuestión. Ejemplos de valores de pH de ensayo son pH 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, o 12. Ejemplos de temperaturas de ensayo son 15, 20, 25, 30, 35, 37, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 80, 90, o 95°C. Ejemplos de sustratos de proteasa son caseína, tal como caseína entrecruzada con azurina (caseína AZCL) , o suc-AAPF-pNA, y ejemplos de ensayos de proteasa adecuados se describen en la parte experimental.

[0026] Actividad de proteasa: el término "actividad de proteasa" significa una actividad proteolítica (EC 3.4.21.) que cataliza la hidrólisis de enlaces amida o una proteína por hidrólisis del enlace peptídico que enlaza aminoácidos en una cadena polipeptídica. Varios ensayos para determinar la actividad de proteasa están disponibles en la técnica. Para los fines de la presente invención, la actividad de proteasa se puede determinar utilizando comprimidos Protazyme AK (caseína reticulada y teñida; de Megazyme) como se describe en los ejemplos de la presente solicitud. Los polipéptidos de la presente invención tienen al menos 20%, por ejemplo, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%, o al menos 100% de la actividad de proteasa del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2.

[0027] Variante alélica: el término "variante alélica" significa cualquiera de dos o más formas alternativas de un gen que ocupan el mismo locus cromosómico. La variación alélica surge de manera natural a través de la mutación, y puede resultar en polimorfismo dentro de poblaciones. Las mutaciones del gen pueden ser silenciosas (sin cambios en el polipéptido codificado) o pueden codificar polipéptidos con secuencias de aminoácidos alteradas. Una variante alélica de un polipéptido es un polipéptido codificado por una variante alélica de un gen.

[0028] Dominio catalítico: el término "dominio catalítico" significa la región de una enzima que contiene la maquinaria catalítica de la enzima.

[0029] ADNc: el término "ADNc" significa una molécula de ADN que se puede preparar por transcripción inversa a partir de una molécula de ARNm maduro empalmado obtenida de una célula eucariota o procariota. El ADNc carece de secuencias de intrones que pueden estar presentes en el ADN genómico correspondiente. El ARN transcrito primario inicial es un precursor del ARNm que se procesa a través de una serie de pasos, incluyendo corte y empalme, antes de aparecer como ARNm maduro empalmado.

[0030] Composiciones de limpieza: el término "composiciones de limpieza" y "formulaciones de limpieza," se refiere a composiciones que se pueden usar para la eliminación de compuestos no deseados de artículos que se desea limpiar, tales como tejidos, alfombras, vajilla incluyendo cristalería, lentes de contacto, superficies duras tales como placas, planchas de zinc, suelos y superficies de tablas, cabello (champú), piel (jabones y cremas), dientes (enjuagues bucales y dentífricos), etc. Los términos abarcan cualquier material/compuesto seleccionado para el tipo particular de composición de limpieza deseado y la forma del producto (por ejemplo, composiciones líquidas, en gel, granuladas o en spray), siempre y cuando la composición sea compatible con la proteasa según la invención y otra(s) enzima(s) usada(s) en la composición. La selección específica de materiales de la composición de limpieza se hace fácilmente teniendo en cuenta la superficie, el artículo o el tejido que se ha de limpiar y la forma deseada de

la composición para las condiciones de limpieza durante el uso. Estos términos también se refieren a cualquier composición que sea adecuada para limpiar, blanquear, desinfectar y/o esterilizar cualquier objeto y/o superficie.

Se pretende que los términos incluyan, pero de forma no limitativa, composiciones detergentes (por ejemplo, detergentes para ropa líquidos y/o sólidos y detergentes de tejidos delicados; formulaciones de limpieza de superficies duras, tales como para mostradores y ventanas de vidrio, madera, cerámica y metal; limpiadores de alfombras; limpiadores de hornos; ambientadores de tejidos; suavizantes de tejidos; y quitamanchas textiles y de lavado de ropa, así como lavavajillas).

[0031] Secuencia codificante: el término "secuencia codificante" significa un polinucleótido, que especifica directamente la secuencia de aminoácidos de un polipéptido. Los límites de la secuencia codificante están determinados generalmente por un marco de lectura abierto, que empieza con un codón inicial tal como, ATG, GTG o TTG y termina con un codón de terminación tal como tAA, TAG o TGA. La secuencia codificante puede ser un ADN genómico, ADNc, ADN sintético o una combinación de los mismos.

[0032] Secuencias de control: el término "secuencias de control" significa secuencias de ácidos nucleicos necesarias para la expresión de un polinucleótido que codifica un polipéptido maduro de la presente invención. Cada secuencia de control puede ser nativa (es decir, del mismo gen) o extraña (es decir, de un gen diferente) al polinucleótido que codifica el polipéptido o nativas o extrañas entre sí. Tales secuencias de control incluyen, pero de forma no limitativa, una secuencia líder, secuencia de poliadenilación, secuencia de propéptido, promotor, secuencia de péptidos señal, y terminador de transcripción. Como mínimo, las secuencias de control incluyen un promotor, y señales de parada de transcripción y de traducción. Las secuencias de control pueden estar provistas de enlazadores con el fin de introducir sitios de restricción específicos que faciliten el ligamiento de las secuencias de control con la región codificadora del polinucleótido que codifica un polipéptido.

[0033] Composición detergente: el término "composición detergente" incluye, a menos que se indique lo contrario, agentes de lavado granulosos o en forma de polvo multiusos o de limpieza de alta potencia, especialmente detergentes de limpieza; agentes de lavado multiusos líquidos, en gel o en forma de pasta, especialmente los tipos de líquido de limpieza de alta potencia denominados HDL; detergentes líquidos para tejidos delicados; agentes lavavajillas a mano o agentes lavavajillas de baja potencia, especialmente los del tipo de alta formación de espuma; agentes lavavajillas a máquina, incluyendo los distintos tipos en comprimidos, gránulos, líquidos y de aclarado para uso doméstico e institucional; agentes de limpieza y desinfectantes líquidos, incluyendo los tipos de lavado de manos antibacteriano, pastillas de limpieza, enjuagues bucales, limpiadores de dentadura, limpiadores para vehículos o alfombras, limpiadores para baños; champús para el cabello y agentes de enjuague del cabello; geles de ducha, baños de espuma; limpiadores de metal; así como productos auxiliares de limpieza tales como aditivos blanqueadores y "pastillas antimanchas" o pretratamientos. Los términos "composición detergente" y "formulación detergente" se usan en referencia a mezclas que están destinadas para usarse en un medio de lavado para la limpieza de objetos sucios. En algunas formas de realización, el término se usa en referencia al lavado de tejidos y/o prendas (por ejemplo, "detergentes para ropa"). En formas de realización alternativas, el término se refiere a otros detergentes, tales como los usados para limpiar platos, cubtería, etc. (por ejemplo, "detergentes lavavajillas").

No se pretende que la presente invención se limite a ninguna formulación o composición detergente particular. Se pretende que, además de la proteasa según la invención, el término abarque detergentes que contienen, por ejemplo, tensioactivos, constructores, queladores o agentes quelantes, sistemas de blanqueamiento o componentes blanqueantes, polímeros, acondicionadores de tejidos, potenciadores de espuma, supresores de espuma, colorantes, perfumes, inhibidores del reteñido, blanqueadores ópticos, bactericidas, fungicidas, agentes de suspensión de residuos, agentes anticorrosión, inhibidores o estabilizadores enzimáticos, activadores enzimáticos, transferasa(s), enzimas hidrolíticas, oxidorreductasas, agentes de azulado y colorantes fluorescentes, antioxidantes y solubilizantes.

[0034] Composición lavavajillas: el término "composición lavavajillas" se refiere a todos los tipos de composiciones para limpiar superficies duras. La presente invención no está restringida a ningún tipo particular de composición lavavajillas o a ningún detergente particular.

[0035] Beneficio de la detergencia enzimática: el término "beneficio de la detergencia enzimática" o "detergencia" se define en este documento como el efecto ventajoso que una enzima puede aportar a un detergente en comparación con el mismo detergente sin la enzima. Los beneficios de la detergencia importantes que pueden proporcionar las enzimas son la eliminación de manchas sin residuos visibles o con pocos residuos visibles después del lavado y o limpieza, la prevención o la reducción del redepósito de residuos liberados durante el proceso de lavado, efecto que también es denominado anti-redepósito, la restauración completa o parcial de la blancura de textiles que originalmente eran blancos pero después de usos y lavados repetidos han adoptado una apariencia grisácea o amarillenta, efecto que también es denominado blanqueamiento. Los beneficios del cuidado de los textiles, que no están directamente relacionados con la eliminación catalítica de manchas o con la prevención del redepósito de residuos, también son importantes para los beneficios de la detergencia enzimática. Ejemplos de tales beneficios del cuidado de los textiles son la prevención o reducción de la transferencia de tinte de un tejido a otro tejido o a otra parte del mismo tejido, efecto que también se denomina inhibición de transferencia de tinte o anti-teñido residual, la eliminación de fibras salientes o rotas de una superficie de un tejido para reducir la tendencia al frisado o para eliminar bolitas o frisados ya existentes, efecto que también se denomina anti-frisado, la mejora de la suavidad del

tejido, la clarificación del color de los tejidos y la eliminación de residuos particulados que quedan retenidos en las fibras del tejido o prenda. El blanqueo enzimático es otro beneficio de la detergencia enzimática en el que la actividad catalítica generalmente se utiliza para catalizar la formación del componente de blanqueo tal como peróxido de hidrógeno u otros peróxidos.

5 [0036] Expresión: el término "expresión" incluye cualquier paso implicado en la producción de un polipéptido incluyendo, pero no limitado a, la transcripción, modificación postranscripcional, traducción, modificación postraduccional y secreción.

10 [0037] Vector de expresión: el término "vector de expresión" significa una molécula de ADN lineal o circular que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido y está operativamente enlazado a secuencias de control que permiten su expresión.

15 [0038] Tejido: el término "tejido" abarca cualquier material textil. De este modo, se pretende que el término abarque prendas, así como tejidos, hilados, fibras, materiales no tejidos, materiales naturales, materiales sintéticos y cualquier otro material textil.

20 [0039] Fragmento: el término "fragmento" significa un polipéptido con uno o más (por ejemplo, varios) aminoácidos ausentes del terminal amino y/o carboxilo de un polipéptido maduro o dominio; donde el fragmento tiene actividad de proteasa.

25 [0040] Limpieza de superficies duras: el término "limpieza de superficies duras" se define en el presente documento como la limpieza de superficies duras, donde las superficies duras pueden incluir suelos, tablas, paredes, techos etc. así como superficies de objetos duros tales como coches (limpiador de vehículos) y vajilla (lavavajillas). El lavado de vajilla incluye, pero de forma no limitativa, la limpieza de platos, tazas, vasos, cuencos y cubertería tal como cucharas, cuchillos, tenedores, utensilios para servir, objetos de cerámica, de plástico, de metal, de porcelana, de vidrio y acrílicos.

30 [0041] Condiciones de alta astringencia: el término "condiciones de alta astringencia" significa, para sondas de al menos 100 nucleótidos de longitud, prehibridación e hibridación a 42°C en 5X SSPE, SDS al 0,3 %, 200 microgramos/ml de ADN de esperma de salmón cortado y desnaturalizado, y formamida al 50%, siguiendo procedimientos Southern Blot estándar durante 12 a 24 horas. El material portador finalmente se lava tres veces, cada una durante 15 minutos, utilizando 2X SSC, SDS al 0,2% a 65°C.

35 [0042] Célula huésped: el término "célula huésped" significa cualquier tipo de célula que sea susceptible a transformación, transfección, transducción, o similar con un constructo de ácidos nucleicos o vector de expresión que comprende un polinucleótido de la presente invención. El término "célula huésped" abarca cualquier descendiente de una célula progenitora que no sea idéntico a la célula progenitora debido a mutaciones que ocurren durante la replicación.

40 [0043] Rendimiento de lavado mejorado: el término "rendimiento de lavado mejorado" se define en este documento como una enzima (variante) (también una mezcla de enzimas, no necesariamente sólo variantes sino también esqueletos, y en combinación con determinadas composiciones de limpieza, etc.) que muestra una alteración del rendimiento de lavado de una variante de proteasa respecto al rendimiento de lavado de la variante de proteasa progenitora, por ejemplo por una eliminación de manchas aumentada. El término "rendimiento de lavado" incluye el rendimiento en el lavado de ropa pero también, por ejemplo, en el lavado de vajilla.

45 [0044] Aislado: el término "aislado" significa una sustancia en una forma o ambiente que no ocurre en la naturaleza. Los ejemplos no limitativos de sustancias aisladas incluyen (1) cualquier sustancia que no ocurra de forma natural, (2) cualquier sustancia que incluya, pero sin limitarse a, cualquier enzima, variante, ácido nucleico, proteína, péptido o cofactor, que es al menos parcialmente eliminado/a de uno o más o todos los constituyentes de origen natural con los que está asociada en la naturaleza; (3) cualquier sustancia modificada por el hombre con respecto a esa sustancia encontrada en la naturaleza; o (4) cualquier sustancia modificada mediante el aumento de la cantidad de la sustancia con respecto a otros componentes con los cuales está asociada de forma natural (por ejemplo, copias múltiples de un gen que codifica la sustancia; uso de un promotor más fuerte que el promotor asociado de manera natural al gen que codifica la sustancia). Una sustancia aislada puede estar presente en una muestra de caldo de fermentación.

60 [0045] Condiciones de baja astringencia: el término "condiciones de baja astringencia" significa, para sondas de al menos 100 nucleótidos de longitud, prehibridación e hibridación a 42°C en 5X SSPE, SDS al 0,3%, 200 microgramos/ml de ADN de esperma de salmón cortado y desnaturalizado, y formamida al 25%, siguiendo procedimientos Southern Blot estándar durante 12 a 24 horas. El material portador finalmente se lava tres veces, cada una durante 15 minutos, utilizando 2X SSC, SDS al 0,2% a 50°C.

65 [0046] Polipéptido maduro: el término "polipéptido maduro" significa un polipéptido en su forma final después de la traducción y cualquier modificación postraduccional, tal como procesamiento del extremo N-terminal, truncamiento

del extremo C-terminal, glicosilación, fosforilación, etc. En un aspecto, el polipéptido maduro corresponde a los aminoácidos 189 a 374 de la SEQ ID NO: 2 basándose en la secuenciación de aminoácidos utilizando la química de la degradación de Edman. En la técnica se sabe que una célula huésped puede producir una mezcla de dos o más polipéptidos maduros diferentes (es decir, con un aminoácido C-terminal y/o N-terminal diferentes) expresados por el mismo polinucleótido.

[0047] Secuencia codificante de polipéptido maduro: el término "secuencia codificante de polipéptido maduro" significa un polinucleótido que codifica un polipéptido maduro que tiene actividad de proteasa. En un aspecto, la secuencia codificante de polipéptido maduro corresponde a los nucleótidos 665 a 1222 de la SEQ ID NO: 1.

[0048] Condiciones de astringencia intermedia: el término "condiciones de astringencia intermedia" significa, para sondas de al menos 100 nucleótidos de longitud, prehibridación e hibridación a 42°C en 5X SSPE, SDS al 0,3%, 200 microgramos/ml de ADN de esperma de salmón cortado y desnaturalizado, y formamida al 35%, siguiendo procedimientos Southern Blot estándar durante 12 a 24 horas. El material portador finalmente se lava tres veces, cada una durante 15 minutos, utilizando 2X SSC, SDS al 0,2% a 55°C.

[0049] Condiciones de astringencia intermedia-alta: el término "condiciones de astringencia intermedia-alta", para sondas de al menos 100 nucleótidos de longitud, prehibridación e hibridación a 42°C en 5X SSPE, SDS al 0,3%, 200 microgramos/ml de ADN de esperma de salmón cortado y desnaturalizado, y o bien formamida al 35%, siguiendo procedimientos Southern Blot estándar durante 12 a 24 horas. El material portador finalmente se lava tres veces, cada una durante 15 minutos, utilizando 2X SSC, SDS al 0,2% a 60°C.

[0050] Constructo de ácidos nucleicos: el término "constructo de ácidos nucleicos" significa una molécula de ácido nucleico, o mono o bicatenaria, que está aislada de un gen de origen natural o que está modificada para contener segmentos de ácidos nucleicos de una forma que de otro modo no existiría en la naturaleza o que es sintética, que comprende una o más secuencias de control.

[0051] Operativamente enlazado: el término "operativamente enlazado" significa una configuración en la que una secuencia de control se coloca en una posición apropiada respecto a la secuencia de codificación de un polinucleótido de modo que la secuencia de control dirige la expresión de la secuencia codificante.

[0052] Identidad de secuencia: la relación entre dos secuencias de aminoácidos o entre dos secuencias de nucleótidos se describe por el parámetro "identidad de secuencia".

[0053] Para los fines de la presente invención, la identidad de secuencia entre dos secuencias de aminoácidos se determina utilizando el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453) según está implementado en el programa Needle del paquete EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice *et al.*, 2000, Trends Genet. 16: 276-277), preferiblemente la versión 5.0.0 o posterior. Los parámetros usados son una penalización por apertura de gap de 10, una penalización por extensión de gap de 0,5, y la matriz de sustitución EBLOSUM62 (versión de EMBOSS de BLOSUM62). El resultado de Needle etiquetado "identidad más larga" (obtenido utilizando la opción -nobrief) se usa como la identidad en porcentaje y se calcula de la siguiente manera:

$$(\text{Residuos Idénticos} \times 100) / (\text{Longitud de Alineamiento} - \text{Número Total de Gaps en Alineamiento})$$

[0054] Para fines de la presente invención, la identidad de secuencia entre dos secuencias de desoxirribonucleótidos se determinada utilizando el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970, *supra*) según está implementado en el programa Needle del paquete EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice *et al.*, 2000, *supra*), preferiblemente la versión 5.0.0 o posterior. Los parámetros usados son una penalización por apertura de gap de 10, una penalización por extensión de gap de 0,5, y la matriz de sustitución EDNAFULL (versión de EMBOSS de NCBI NUC4.4). El resultado de Needle etiquetado "identidad más larga" (obtenido utilizando la opción -nobrief) se usa como la identidad en porcentaje y se calcula de la siguiente manera:

$$(\text{Desoxirribonucleótidos Idénticos} \times 100) / (\text{Longitud de Alineamiento} - \text{Número Total de Gaps en Alineamiento})$$

[0055] Subsecuencia: el término "subsecuencia" significa un polinucleótido con uno o más (por ejemplo, varios) nucleótidos ausentes del extremo 5' y/o 3' de una secuencia codificante de polipéptido maduro; donde la subsecuencia codifica un fragmento con actividad de proteasa.

[0056] Polinucleótido sustancialmente puro: el término "polinucleótido sustancialmente puro" significa una preparación de polinucleótidos libre de otros nucleótidos extraños o no deseados y en una forma adecuada para usar dentro de sistemas de producción de polipéptidos genéticamente modificados. Así, un polinucleótido sustancialmente puro contiene como máximo 10%, como máximo 8%, como máximo 6%, como máximo 5%, como máximo 4%, como máximo 3%, como máximo 2%, como máximo 1%, y como máximo 0,5% en peso de otro material

de polinucleótido con el cual está asociado original o recombinantemente. Un polinucleótido sustancialmente puro puede, sin embargo, incluir regiones no traducidas 5' y 3' de origen natural, tales como promotores y terminadores. Preferiblemente, el polinucleótido es al menos 90% puro, por ejemplo, al menos 92% puro, al menos 94% puro, al menos 95% puro, al menos 96% puro, al menos 97% puro, al menos 98% puro, al menos 99% puro, y al menos 99,5% puro en peso. Los polinucleótidos de la presente invención son preferiblemente en forma sustancialmente pura.

[0057] Polipéptido sustancialmente puro: el término "polipéptido sustancialmente puro" significa una preparación que contiene como máximo 10%, como máximo 8%, como máximo 6%, como máximo 5%, como máximo 4%, como máximo 3%, como máximo 2%, como máximo 1%, y como máximo 0,5% en peso de otro material de polipéptido con el cual está asociado original o recombinantemente. Preferiblemente, el polipéptido es al menos 92% puro, por ejemplo, al menos 94% puro, al menos 95% puro, al menos 96% puro, al menos 97% puro, al menos 98% puro, al menos 99%, al menos 99,5% puro y 100% puro en peso del material de polipéptido total presente en la preparación. Los polipéptidos de la presente invención son preferiblemente en forma sustancialmente pura. Esto se puede conseguir, por ejemplo, mediante la preparación del polipéptido por métodos recombinantes ampliamente conocidos o por métodos de purificación tradicionales.

[0058] Textil: el término "textil" significa cualquier material textil incluyendo hilados, fibras intermedias, fibras, materiales no tejidos, materiales naturales, materiales sintéticos y cualquier otro material textil, tejidos hechos de estos materiales y productos hechos de tejidos (por ejemplo, prendas y otros artículos). El tejido o tela puede ser en forma de punto, tejido, telas vaqueras, no tejidos, fieltros, hilados, y tejidos rizados. El tejido puede ser basado en celulosa, como por ejemplo celulósicos naturales, incluyendo algodón, lino, yute, ramio, sisal o bonote o celulósicos artificiales (por ejemplo originados de pulpa de madera) incluyendo viscosa/rayón, ramio, fibras de acetato de celulosa (tricell), lyocell o mezclas de los mismos. El textil o tejido también puede ser no basado en celulosa, como por ejemplo poliamidas naturales incluyendo lana, camello, cachemir, mohair, conejo y seda o poliméricos sintéticos tales como nylon, aramida, poliéster, acrílicos, polipropileno y spandex/elastano, o mezclas de los mismos, así como mezclas de fibras basadas en celulosa y no basadas en celulosa. Ejemplos de mezclas son las mezclas de algodón y/o rayón/viscosa con uno o más materiales acompañantes tales como lana, fibras sintéticas (por ejemplo fibras de poliamida, fibras acrílicas, fibras de poliéster, fibras de alcohol polivinílico, fibras de cloruro de polivinilo, fibras de poliuretano, fibras de poliurea, fibras de aramida), y fibras que contienen celulosa (por ejemplo rayón/viscosa, ramio, lino, yute, fibras de acetato de celulosa, lyocell). El tejido puede ser ropa sucia lavable convencional, por ejemplo ropa del hogar manchada. Cuando se usa el término tejido o prenda, también se pretende incluir el término más amplio textiles.

[0059] Beneficios del cuidado textil: los "beneficios del cuidado textil", que no están directamente relacionados con la eliminación de manchas catalítica o con la prevención del redepósito de residuos, también son importantes para los beneficios de la detergencia enzimática. Ejemplos de tales beneficios del cuidado textil son la prevención o la reducción de la transferencia de tinte de un textil a otro textil o a otra parte del mismo textil, efecto que también se denomina inhibición de la transferencia de tinte o anti-teñido residual, la eliminación de fibras protuberantes o rotas de una superficie textil para reducir la tendencia al frisado o para eliminar bolitas o frisados ya existentes, efecto que también se denomina anti-frisado, la mejora de la suavidad del textil, la clarificación de color del textil y la eliminación de residuos particulados que quedan retenidos en las fibras del textil. El blanqueo enzimático es otro beneficio de la detergencia enzimática en el que la actividad catalítica generalmente se utiliza para catalizar la formación del componente de blanqueo tal como peróxido de hidrógeno u otros peróxidos u otras especies blanqueantes.

[0060] Variante: el término "variante" significa un polipéptido con actividad de proteasa que incluyen una alteración, es decir, una sustitución, inserción y/o delección, en una o más (por ejemplo, varias) posiciones. Una sustitución significa un reemplazo del aminoácido que ocupa una posición determinada por un aminoácido diferente; una delección significa una eliminación del aminoácido que ocupa una posición determinada; y una inserción significa la adición de uno o más (por ejemplo, varios) aminoácidos, por ejemplo 1-5 aminoácidos adyacentes e inmediatamente siguientes al aminoácido que ocupa una posición determinada. Las variantes de la presente invención tienen al menos 20%, por ejemplo, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%, o al menos 100% de la actividad de proteasa del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2.

[0061] Condiciones de astringencia muy alta: el término "condiciones de astringencia muy alta" significa, para sondas de al menos 100 nucleótidos de longitud, prehibridación e hibridación a 42°C en 5X SSPE, SDS al 0,3%, 200 microgramos/ml de ADN de esperma de salmón cortado y desnaturalizado, y 50% de formamida, siguiendo procedimientos Southern Blot estándar durante 12 a 24 horas. El material portador finalmente se lava tres veces, cada una durante 15 minutos, utilizando 2X SSC, SDS al 0,2% a 70°C.

[0062] Condiciones de astringencia muy baja: el término "condiciones de astringencia muy baja" significa, para sondas de al menos 100 nucleótidos de longitud, prehibridación e hibridación a 42°C en 5X SSPE, SDS al 0,3%, 200 microgramos/ml de ADN de esperma de salmón cortado y desnaturalizado, y formamida al 25%, siguiendo procedimientos Southern Blot estándar durante 12 a 24 horas. El material portador finalmente se lava tres veces, cada una durante 15 minutos, utilizando 2X SSC, SDS al 0,2% a 45°C.

[0063] Rendimiento de lavado: el término "rendimiento de lavado" se usa como una capacidad de la enzima para eliminar manchas presentes en el objeto que ha de ser limpiado durante, por ejemplo, el lavado o la limpieza de superficies duras.

[0064] Blancura: el término "blancura" se define en este documento como un término amplio con significados diferentes en zonas diferentes y para clientes diferentes. La pérdida de la blancura puede deberse, por ejemplo deberse, por ejemplo, a una coloración grisácea, al amarilleo o a la eliminación de agentes de blanqueo/tonalizadores ópticos. La coloración gris y el amarilleo se pueden deber al redepósito de residuos, de residuos corporales, a la coloración procedente de, por ejemplo, iones de hierro y de cobre o a la transferencia de tinte. La blancura puede incluir uno o más problemas de la lista siguiente: efectos de coloración o tinte; eliminación incompleta de manchas (por ejemplo, residuos corporales, sebo, etc.); redepósito (coloración gris, amarilleo u otras decoloraciones del objeto) (los residuos eliminados se reasocian con otra parte del textil, sucia o limpia); cambios químicos en el textil durante la aplicación; y clarificación o aclarado de colores.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Polipéptidos con actividad de proteasa

[0065] En una forma de realización, la presente invención se refiere a un polipéptido aislado con una identidad de secuencia con el polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2 de al menos 85% que tiene actividad de proteasa, donde el polipéptido maduro corresponde a los aminoácidos 189 a 374 de la SEQ ID NO: 2, y donde el polipéptido tiene actividad mejorada de proteasa entre 37°C y 60°C, en comparación con la proteasa 10R (SEQ ID NO 7).

[0066]. En un aspecto, el polipéptido difiere en no más de 20 aminoácidos, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 o 19 del polipéptido maduro de la SEQ ID No: 2.

[0067] Un polipéptido de la presente invención preferiblemente comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2; o es un fragmento de la misma con actividad de proteasa. En otro aspecto, el polipéptido comprende o consiste en el polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2. En otro aspecto, el polipéptido comprende o consiste en los aminoácidos 189 a 374 de la SEQ ID NO: 2.

[0068] En otra forma de realización, la presente descripción se refiere a un polipéptido aislado con actividad de proteasa codificado por un polinucleótido que hibrida bajo condiciones de astringencia muy baja, condiciones de baja astringencia, condiciones de astringencia intermedia, condiciones de astringencia intermedia-alta, condiciones de alta astringencia, o condiciones de astringencia muy alta con la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 1, o el complemento completo de la misma (Sambrook *et al.*, 1989, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2d edition, Cold Spring Harbor, Nueva York).

[0069] El polinucleótido de la SEQ ID NO: 1 o una subsecuencia de la misma, al igual que el polipéptido de la SEQ ID NO: 2 o un fragmento de la misma, se puede usar para diseñar sondas de ácidos nucleicos para identificar y clonar polipéptidos codificantes de ADN con actividad de proteasa de cepas de géneros o especies diferentes según métodos bien conocidos en la técnica. En particular, tales sondas se pueden usar para hibridación con el ADN o ADNc genómico de una célula de interés, siguiendo procedimientos Southern Blot estándar, para identificar y aislar el gen correspondiente en ellas. Tales sondas pueden ser considerablemente más cortas que la secuencia entera, pero deberían ser de al menos 15, por ejemplo, al menos 25, al menos 35, o al menos 70 nucleótidos de longitud. Preferiblemente, la sonda de ácidos nucleicos es de al menos 100 nucleótidos de longitud, por ejemplo, de al menos 200 nucleótidos, al menos 300 nucleótidos, al menos 400 nucleótidos, al menos 500 nucleótidos, al menos 600 nucleótidos, al menos 700 nucleótidos, al menos 800 nucleótidos, o al menos 900 nucleótidos de longitud. Pueden usarse sondas tanto de ADN como de ARN. Las sondas típicamente están marcadas para detectar el gen correspondiente (por ejemplo, con ^{32}P , ^3H , ^{35}S , biotina, o avidina). Tales sondas están abarcadas por la presente invención.

[0070] Una biblioteca de ADN o ADNc genómico obtenido a partir de tales otras cepas se puede analizar en busca de ADN que hibridice con las sondas anteriormente descritas y codifique un polipéptido con actividad de proteasa.

El ADN genómico o de otro tipo de tales otras cepas se puede separar por electroforesis en gel de poliacrilamida o agarosa, o mediante otras técnicas de separación. El ADN de las bibliotecas o el ADN separado se puede transferir e inmovilizar en nitrocelulosa u otro material portador adecuado. Para identificar un clon o ADN que hibridice con la SEQ ID NO: 1 o una subsecuencia de la misma, el material portador se usa en un Southern blot.

[0071] Para los fines de la presente descripción, hibridación indica que el polinucleótido se hibrida a una sonda de ácidos nucleicos marcada que corresponde con (i) la SEQ ID NO: 1; (ii) la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 1; (iii) el complemento ecompleto de la misma; o (iv) una subsecuencia de la misma; bajo condiciones de astringencia de muy baja a muy alta. Las moléculas a las que la sonda de ácidos nucleicos se hibrida bajo estas condiciones se pueden detectar usando, por ejemplo, película radiográfica o cualquier otro medio de detección conocido en la técnica.

[0072] En un aspecto, la sonda de ácidos nucleicos corresponde a los nucleótidos 101 a 1405, los nucleótidos 188 a 1222, los nucleótidos 665 a 1222, o los nucleótidos 800 a 1200 de la SEQ ID NO: 1. En otro aspecto, la sonda de ácidos nucleicos es un polinucleótido que codifica el polipéptido de la SEQ ID NO: 2; el polipéptido maduro de la misma; o un fragmento de la misma. En otro aspecto, la sonda de ácidos nucleicos es la SEQ ID NO: 1.

En otra forma de realización, la presente invención se refiere a un polipéptido aislado con actividad de proteasa codificado por un polinucleótido con una identidad de secuencia con la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 1 de al menos 85%" donde el polinucleótido maduro corresponde a los nucleótidos 665 a 1222 de la SEQ ID NO: 1, donde el polipéptido tiene actividad mejorada de proteasa entre 37°C y 60°C, en comparación con la proteasa 10R (SEQ ID NO: 7).

[0073] En otra forma de realización, la presente invención se refiere a variantes del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2 que comprenden una sustitución, delección, y/o inserción en una o más (por ejemplo, varias) posiciones.

En una forma de realización, el número de sustituciones, delecciones y/o inserciones de aminoácidos introducidas en el polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2 no es superior a 20, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, o 19. Los cambios en los aminoácidos pueden ser de una naturaleza menor, es decir, sustituciones o inserciones de aminoácidos conservadoras que no afectan significativamente al plegamiento y/o la actividad de la proteína; delecciones pequeñas, típicamente de 1-30 aminoácidos; pequeñas extensiones amino- o carboxi-terminal, tales como un residuo de metionina amino-terminal; un péptido enlazador pequeño de hasta 20-25 residuos; o una pequeña extensión que facilita la purificación cambiando la carga de red u otra función, tal como un tracto de polihistidina, un epítipo antigénico o un dominio de unión.

[0074] Hay ejemplos de sustituciones conservadoras en los grupos de aminoácidos básicos (arginina, lisina e histidina), aminoácidos ácidos (ácido glutámico y ácido aspártico), aminoácidos polares (glutamina y asparagina), aminoácidos hidrofóbicos (leucina, isoleucina y valina), aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptófano y tirosina), y aminoácidos pequeños (glicina, alanina, serina, treonina y metionina). Las sustituciones de aminoácidos que generalmente no alteran la actividad específica se conocen en la técnica y son descritas, por ejemplo, por H. Neurath and R.L. Hill, 1979, en *The Proteins*, Academic Press, Nueva York. Las sustituciones comunes son Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Tyr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, y Asp/Gly.

[0075] Alternativamente, los cambios en los aminoácidos son de tal naturaleza que las propiedades físico químicas de los polipéptidos se ven alteradas. Por ejemplo, los cambios en los aminoácidos pueden mejorar la termoestabilidad del polipéptido, alterar la especificidad de sustrato, cambiar el pH óptimo y similares.

[0076] Los aminoácidos esenciales de un polipéptido se pueden identificar según procedimientos conocidos en la técnica, tales como la mutagénesis dirigida o mutagénesis por escaneo de alanina (Cunningham and Wells, 1989, *Science* 244: 1081-1085). En esta última técnica, se introducen mutaciones de alanina únicas en cada residuo de la molécula, y las moléculas mutantes resultantes se analizan para detectar actividad de proteasa para identificar residuos de aminoácidos que son fundamentales para la actividad de la molécula. Véase también, Hilton *et al.*, 1996, *J. Biol. Chem.* 271: 4699-4708. El sitio activo de la enzima u otra interacción biológica también se puede determinar mediante análisis físico de estructura, según determinan técnicas tales como la resonancia magnética nuclear, cristalografía, difracción electrónica, o marcaje por fotoafinidad, conjuntamente con la mutación de aminoácidos de sitios de contacto putativos. Véase, por ejemplo, de Vos *et al.*, 1992, *Science* 255: 306-312; Smith *et al.*, 1992, *J. Mol. Biol.* 224: 899-904; Wlodaver *et al.*, 1992, *FEBS Lett.* 309: 59-64. La identidad de los aminoácidos esenciales también se pueden inferir a partir de un alineamiento con un polipéptido relacionado. En el polipéptido de la presente invención, los aminoácidos esenciales que forman la tríada catalítica se han identificado como los aminoácidos correspondientes a His-220; Asp-244 y Ser-324 en la SEC ID NO: 2 por alineamiento con la secuencia de aminoácidos de la proteasa 10R.

[0077] Se pueden hacer sustituciones, delecciones, y/o inserciones de aminoácidos únicas o múltiples y se pueden evaluar usando métodos conocidos de mutagénesis, recombinación, y/o redistribución, seguidos de un procedimiento de análisis pertinente, tal como los descritos por Reidhaar-Olson and Sauer, 1988, *Science* 241: 53-57; Bowie and Sauer, 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 2152-2156; WO 95/17413; o WO 95/22625.

Otros métodos que se pueden usar incluyen PCR con tendencia a errores, phage display (por ejemplo, Lowman *et al.*, 1991, *Biochemistry* 30: 10832-10837; patente de EE. UU. n° 5,223,409; WO 92/06204), y mutagénesis de sitio dirigido (Derbyshire *et al.*, 1986, *gen* 46: 145; Ner *et al.*, 1988, *ADN* 7: 127).

[0078] Los métodos de mutagénesis/barajado se pueden combinar con métodos de selección automatizada de alto rendimiento para detectar actividad de polipéptidos clonados y mutagenizados expresados por células huésped (Ness *et al.*, 1999, *Nature Biotechnology* 17: 893-896). Las moléculas de ADN mutagenizadas que codifican polipéptidos activos se pueden recuperar de las células huésped y secuenciar rápidamente utilizando métodos estándar de la técnica. Estos métodos permiten la rápida determinación de la importancia de los residuos de aminoácidos individuales en un polipéptido.

[0079] El polipéptido puede ser un polipéptido híbrido en el que una región de un polipéptido está fusionada en la región del extremo N-terminal o C-terminal de una región de otro polipéptido.

[0080] El polipéptido puede ser un polipéptido de fusión o polipéptido de fusión escindible en el que otro polipéptido se fusiona en el extremo N-terminal o C-terminal del polipéptido de la presente invención. Un polipéptido de fusión se produce fusionando un polinucleótido que codifica otro polipéptido con un polinucleótido de la presente invención. Las técnicas para la producción de polipéptidos de fusión se conocen en la técnica, e incluyen ligar las secuencias codificantes que codifican los polipéptidos de modo que éstas estén en dentro del marco y que la expresión del polipéptido de fusión esté bajo el control del/de los mismo(s) promotor(es) y terminador. Los polipéptidos de fusión también se pueden construir utilizando la tecnología de inteína en la que los polipéptidos de fusión se crean postraduccionalmente (Cooper *et al.*, 1993, EMBO J. 12: 2575-2583; Dawson *et al.*, 1994, Science 266: 776-779).

[0081] Un polipéptido de fusión puede comprender además un sitio de escisión entre los dos polipéptidos. Con la secreción de la proteína de fusión, el sitio se escinde y libera los dos polipéptidos. Los ejemplos de sitios de escisión incluyen, pero de forma no limitativa, los sitios descritos en Martin *et al.*, 2003, J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 3: 568-576; Svetina *et al.*, 2000, J. Biotechnol. 76: 245-251; Rasmussen-Wilson *et al.*, 1997, Appl. Environ. Microbiol. 63: 3488-3493; Ward *et al.*, 1995, Biotechnology 13: 498-503; y Contreras *et al.*, 1991, Biotechnology 9: 378-381; Eaton *et al.*, 1986, Biochemistry 25: 505-512; Collins-Racie *et al.*, 1995, Biotechnology 13: 982-987; Carter *et al.*, 1989, Proteins: Structure, Function, and Genetics 6: 240-248; y Stevens, 2003, Drug Discovery World 4: 35-48.

Formas de realización

[0082] En determinadas formas de realización de la invención, la proteasa de la invención muestra propiedades térmicas beneficiosas tales como termoestabilidad, estabilidad de vapor, propiedades de pH, tales como estabilidad ácida, etc.

[0083] Una forma de realización de la invención son polipéptidos aislados que tienen actividad de proteasa mejorada entre 37°C y 60°C, tal como entre 37°C y 50°C, o a 37°C, 50°C o a 60°C en comparación con la proteasa 10R.

Propiedades de acidez/alcalinidad

[0084] En determinadas formas de realización de la invención, la proteasa de la invención muestra propiedades beneficiosas respecto al pH, tales como estabilidad ácida, etc. La estabilidad de la proteasa a un pH bajo es beneficiosa, ya que la proteasa puede tener actividad en el intestino después del paso a través del estómago. La estabilidad de la proteasa a un pH alto es beneficiosa para la limpieza y el lavado, ya que las composiciones detergentes frecuentemente tienen un pH alcalino. En una forma de realización de la invención, la proteasa retiene >90% de actividad después de 2 horas a pH 3 según se determina utilizando el método descrito en el ejemplo 4. En otra forma de realización de la invención, la proteasa retiene >90% de actividad después de 2 horas a pH 9 según se determina utilizando el método descrito en el ejemplo 4.

[0085] La presente invención proporciona polipéptidos con actividad de proteasa y polinucleótidos que codifican los polipéptidos. Las proteasas de la invención son serina proteasas de la familia de la peptidasa S1. Las proteasas de la invención muestran propiedades de pH sorprendentes, especialmente propiedades de estabilidad de pH que las hacen candidatas interesantes para usar en pienso para animales y/o detergentes.

Rendimiento de lavado

[0086] En determinadas formas de realización de la invención, la proteasa de la invención muestra un rendimiento de lavado beneficioso. La proteasa S1 de *Saccharothrix australiensis* es más eficaz en la eliminación de manchas en comparación con detergente sin ninguna proteasa. La proteasa S1 de *Saccharothrix australiensis* es eficaz en la eliminación de manchas de sangre y huevos incluso a 20°C.

Aplicación para pienso

[0087] La proteasa de la invención está activa en Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA dentro de un amplio rango de pH 4-11 y muestra una actividad de pH especialmente alta en el rango de 6-11, está activa en un sustrato de harina de soja - harina de maíz relevante para el pienso dentro de un amplio rango de pH fisiológico de pH 3-7 y conserva más del 80% de actividad después de ser sometido durante 2 horas a pH tan bajo como 2. Así la proteasa S1 de *Saccharothrix australiensis* de la invención es adecuada para varias aplicaciones en pienso.

Fuentes de polipéptidos con actividad de proteasa

[0088] Un polipéptido con actividad de proteasa de la presente invención se puede obtener a partir de microorganismos de cualquier género. Para los fines de la presente invención, el término "obtener a partir de" como se utiliza en este caso en relación con una fuente determinada deberá significar que el polipéptido codificado por un polinucleótido es producido por la fuente o por una cepa en la que el polinucleótido procedente de la fuente ha sido insertado. En un aspecto, el polipéptido obtenido a partir de una fuente dada se secreta extracelularmente.

[0089] El polipéptido puede ser un polipéptido bacteriano. Por ejemplo, el polipéptido puede ser un polipéptido bacteriano grampositivo tal como un polipéptido *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Geobacillus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Oceanobacillus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Saccharothrix* o *Streptomyces* con actividad de proteasa, o un polipéptido bacteriano gramnegativo tal como un polipéptido *Campylobacter*, *E. Coli*, *Flavobacterium*, *Fusobacterium*, *Helicobacter*, *Ilyobacter*, *Neisseria*, *Pseudomonas*, *Salmonella* o *Ureaplasma*.

[0090] En un aspecto, el polipéptido es una proteasa procedente de una bacteria de la clase *Actinobacteria*, por ejemplo del orden de los *Actinomycetales*, o del suborden *Pseudonocardineae*, o de la familia *Pseudonocardiaceae*, o de los géneros *Saccharothrix*. En otro aspecto, el polipéptido es un polipéptido de *Saccharothrix australiensis*.

[0091] Cepas de estas especies están accesible fácilmente al público en varias colecciones de cultivos, tales como la American Type Culture Collection (ATCC), Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Centraalbureau Voor Schimmelcultures (CBS), y Agricultural Research Service Patent Culture Collection, Northern Regional Research Center (NRRL).

[0092] El polipéptido se puede identificar y obtener a partir de otras fuentes, incluyendo microorganismos aislados de la naturaleza (por ejemplo, tierra, abonos, agua, etc.) o muestras de ADN obtenidas directamente de materiales naturales (por ejemplo, tierra, abonos, agua, etc.) utilizando las sondas anteriormente mencionadas.

En la técnica se conocen técnicas para el aislamiento de microorganismos y de ADN directamente a partir de hábitats naturales. Un polinucleótido que codifica el polipéptido puede, por lo tanto, obtenerse realizando una selección de forma similar de una biblioteca de ADN o ADNc genómico de otro microorganismo o muestra de ADN mixto.

Una vez que un polinucleótido que codifica un polipéptido se ha detectado con la(s) sonda(s), el polinucleótido se puede aislar o clonar mediante la utilización de técnicas que son conocidas por los expertos en la materia (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, 1989, *supra*).

Polinucleótidos

[0093] La presente invención también se refiere a polinucleótidos aislados que codifican un polipéptido de la presente invención, como se describe en el presente documento.

[0094] Las técnicas usadas para aislar o clonar un polinucleótido se conocen en la técnica e incluyen el aislamiento de ADN o ADNc genómico, o una combinación de los mismos.

La clonación de los polinucleótidos de ADN genómico se puede llevar a cabo, por ejemplo, usando la ampliamente conocida reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o un cribado de anticuerpos de bibliotecas de expresión para detectar fragmentos de ADN clonados con características estructurales compartidas. Véase por ejemplo, Innis *et al.*, 1990, PCR: A Guide to Methods and Application, Academic Press, Nueva York. Otros procedimientos de amplificación de ácidos nucleicos tal como la reacción en cadena de la ligasa, la transcripción activada por ligadura (LAT) y la amplificación basada en polinucleótidos (NASBA) pueden ser utilizados. Los polinucleótidos se pueden clonar a partir de una cepa de *Saccharothrix*, o un organismo relacionado y así, por ejemplo, puede ser una variante alélica o especie de la región codificadora de polipéptidos del polinucleótido.

[0095] La modificación de un polinucleótido que codifica un polipéptido de la presente invención puede ser necesaria para la sintetización de polipéptidos sustancialmente similares al polipéptido. El término "sustancialmente similares" al polipéptido se refiere a formas no naturales del polipéptido. Estos polipéptidos pueden diferir de algún modo modificado artificialmente del polipéptido aislado de su fuente nativa, por ejemplo, variantes que difieren en la actividad específica, termoestabilidad, pH óptimo, o similares. Las variantes se pueden construir basándose en el polinucleótido presentado como la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 1, por ejemplo una subsecuencia de la misma, y/o por introducción de sustituciones de nucleótidos que no suponen un cambio en la secuencia de aminoácidos del polipéptido, pero que corresponden al uso de codones del organismo huésped destinado a la producción de la enzima, o por introducción de sustituciones de nucleótidos que pueden dar lugar a una secuencia de aminoácidos diferente. Para una descripción general de la sustitución de nucleótidos, véase, por ejemplo, vFord *et al.*, 1991, Protein Expression and Purification 2: 95-107.

Constructos de ácidos nucleicos

[0096] La presente invención también se refiere a constructos de ácidos nucleicos que comprenden un polinucleótido de la presente invención operativamente enlazado a una o más secuencias de control que dirigen la expresión de la secuencia codificante en una célula huésped adecuada bajo condiciones compatibles con las secuencias de control.

[0097] Un polinucleótido se puede manipular de una variedad de maneras para proporcionar la expresión del polipéptido. La manipulación del polinucleótido antes de su inserción en un vector puede ser deseable o necesaria dependiendo del vector de expresión. Las técnicas para la modificación de polinucleótidos utilizando métodos de ADN recombinante son ampliamente conocidas en la técnica.

[0098] La secuencia de control puede ser un promotor, un polinucleótido que es reconocido por una célula huésped

para la expresión de un polinucleótido que codifica un polipéptido de la presente invención. El promotor contiene secuencias de control transcripcionales que median en la expresión del polipéptido. El promotor puede ser cualquier polinucleótido que muestre actividad transcripcional en la célula huésped, incluyendo promotores mutantes, truncados e híbridos, y se puede obtener a partir de genes que codifican polipéptidos extracelulares o intracelulares o bien homólogos o bien heterólogos a la célula huésped.

[0099] Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de los constructos de ácidos nucleicos de la presente invención en una célula huésped bacteriana son los promotores obtenidos del gen de alfa-amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens* (*amyQ*), el gen de alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* (*amyL*), el gen de penicilinasa de *Bacillus licheniformis* (*penP*), el gen de amilasa maltogénica de *Bacillus stearothermophilus* (*amyM*), el gen de levansacarasa de *Bacillus subtilis* (*sacB*), los genes *xylA* y *xylB* de *Bacillus subtilis*, el gen *crIIIA* de *Bacillus thuringiensis* (Agaisse y Lereclus, 1994, Molecular Microbiology 13: 97-107), el operón *lac* de *E. Coli*, el promotor *trc* de *E. Coli* (Egon *et al.*, 1988, Gene 69: 301-315), el gen de agarasa de *Streptomyces coelicolor* (*dagA*), y el gen de beta-lactamasa procariótica (Villa-Kamaroff *et al.*, 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 3727-3731), al igual que el promotor *tac* (DeBoer *et al.*, 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 21-25). Otros promotores se describen en "Useful proteins from recombinant bacteria" en Gilbert *et al.*, 1980, Scientific American 242: 74-94; y en Sambrook *et al.*, 1989, *supra*. Ejemplos de promotores en serie se describen en WO 99/43835.

[0100] Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de los constructos de ácidos nucleicos de la presente invención en una célula huésped fúngica filamentosa son promotores obtenidos de los genes para acetamidasa de *Aspergillus nidulans*, alfa-amilasa neutra de *Aspergillus niger*, alfa-amilasa estable en ácido de *Aspergillus niger*, glucoamilasa de *Aspergillus niger* o *Aspergillus awamori* (*glaA*), TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, proteasa alcalina de *Aspergillus oryzae*, triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus oryzae*, proteasa de tipo tripsina de *Fusarium oxysporum* (WO 96/00787), amiloglucosidasa de *Fusarium venenatum* (WO 00/56900), Daria de *Fusarium venenatum* (WO 00/56900), Quinn de *Fusarium venenatum* (WO 00/56900), lipasa de *Rhizomucor miehei*, proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, beta-glucosidasa de *Trichoderma reesei*, celobiohidrolasa I de *Trichoderma reesei*, celobiohidrolasa II de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa I de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa II de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa III de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa IV de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa V de *Trichoderma reesei*, xilanasa I de *Trichoderma reesei*, xilanasa II de *Trichoderma reesei*, beta-xilosidasa de *Trichoderma reesei*, así como el promotor de NA2-tpi (un promotor modificado a partir de un gen de alfa-amilasa neutro de *Aspergillus* en el que la líder no traducida ha sido sustituida por una líder no traducida procedente de un gen de triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus*; los ejemplos no limitativos incluyen promotores modificados procedentes de un gen de alfa-amilasa neutro de *Aspergillus niger* en el que la líder no traducida ha sido sustituida por una líder no traducida procedente de un *Aspergillus nidulans* o gen de triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus oryzae*); y promotores mutantes, truncados e híbridos de los mismos.

[0101] En un huésped de levadura, los promotores útiles se obtienen de los genes para enolasa de *Saccharomyces cerevisiae* (ENO-1), galactocinasa de *Saccharomyces cerevisiae* (GAL1), deshidrogenasa de alcohol/dehidrogenasa de gliceraldehído-3-fosfato de *Saccharomyces cerevisiae* (ADH1, aDH2/GAP) triosa fosfato isomerasa de *Saccharomyces cerevisiae* (TPI), metalotioneína de *Saccharomyces cerevisiae* (CUP1), y quinasa de 3-fosfoglicerato de *Saccharomyces cerevisiae*. Otros promotores útiles para células huésped de levadura son descritas por Romanos *et al.*, 1992, Yeast 8: 423-488.

[0102] La secuencia de control también puede ser un terminador de transcripción, que es reconocido por una célula huésped para terminar la transcripción. El terminador está operativamente enlazado al extremo 3' del polinucleótido que codifica el polipéptido. Cualquier terminador que es funcional en la célula huésped se puede utilizar en la presente invención.

[0103] Los terminadores preferidos para células huésped bacterianas se obtienen a partir de los genes para proteasa alcalina de *Bacillus clausii* (*aprH*), alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* (*amyL*), y RNA ribosómico de *Escherichia coli* (*rrnB*).

[0104] Los terminadores preferidos para células huésped fúngicas filamentosas se obtienen a partir de los genes para antranilato sintasa de *Aspergillus nidulans*, nigerglucoamilasa de *Aspergillus*, alfa-glucosidasa de *Aspergillus niger*, TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, y proteasa de tipo tripsina de *Fusarium oxysporum*.

[0105] Los terminadores preferidos para células huésped de levadura se obtienen a partir de los genes para enolasa de *Saccharomyces cerevisiae*, citocromo de *Saccharomyces cerevisiae* C (CYC1), y gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Otros terminadores útiles para células huésped de levadura son descritas por Romanos *et al.*, 1992, *supra*.

[0106] La secuencia de control también puede ser una región estabilizadora de ARNm en dirección hacia abajo de un promotor y hacia arriba de la secuencia codificante de un gen que aumenta la expresión del gen.

[0107] Ejemplos de regiones estabilizadoras de ARNm adecuadas se obtienen de un gen *crIIIA* de *Bacillus thuringiensis* (WO 94/25612) y un gen SP82 de *Bacillus subtilis* (Hue *et al.*, 1995, Journal of Bacteriology 177: 3465-

3471).

[0108] La secuencia de control también puede ser una líder, una región no traducida de un ARNm que es importante para la traducción por parte de la célula huésped. La líder está operativamente enlazada al extremo 5' del polinucleótido que codifica el polipéptido. Cualquier líder que sea funcional en la célula huésped puede ser utilizada.

[0109] Las líderes preferidas para las células huésped fúngicas filamentosas se obtienen de los genes para TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae* y triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus nidulans*.

[0110] Las líderes adecuadas para células huésped de levadura se obtienen de los genes para enolasa de *Saccharomyces cerevisiae* (ENO-1), 3-fosfoglicerato quinasa de *Saccharomyces cerevisiae*, factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae*, y deshidrogenasa de alcohol/dehidrogenasa de gliceraldehído-3-fosfato de *Saccharomyces cerevisiae* (ADH2/GAP).

[0111] La secuencia de control también puede ser una secuencia de poliadenilación, una secuencia operativamente enlazada al extremo 3' del polinucleótido y, cuando se ha transcrito, es reconocida por la célula huésped como una señal para añadir residuos de poliadenosina al ARNm transcrito. Cualquier secuencia de poliadenilación que sea funcional en la célula huésped puede ser utilizada.

[0112] Las secuencias de poliadenilación preferidas para células huésped fúngicas filamentosas se obtienen de los genes para antranilato sintasa de *Aspergillus nidulans*, glucoamilasa de *Aspergillus niger*, alfa-glucosidasa de *Aspergillus niger*, TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, y proteasa de tipo tripsina de *Fusarium oxysporum*.

[0113] Secuencias de poliadenilación útiles para células huésped de levadura son descritas por Guo y Sherman, 1995, Mol. Celular Biol. 15: 5983-5990.

[0114] La secuencia de control también puede ser una región codificante del péptido señal que codifica un péptido señal enlazado al extremo N-terminal de un polipéptido y dirige el polipéptido hasta la vía secretora de la célula.

El extremo 5' de la secuencia codificante de polinucleótidos puede contener intrínsecamente una secuencia codificante de péptido señal enlazada de manera natural en el marco de lectura de traducción con el segmento de la secuencia codificante que codifica el polipéptido. Alternativamente, el extremo 5' de la secuencia codificante puede contener una secuencia codificante de péptido señal que es extraña a la secuencia codificante. Una secuencia codificante de péptido señal extraña puede ser necesaria cuando la secuencia codificante no contiene de manera natural una secuencia codificante de péptido señal. Alternativamente, una secuencia codificante de péptido señal extraña puede simplemente reemplazar la secuencia codificante de péptido señal natural para mejorar la secreción del polipéptido. Sin embargo, cualquier secuencia codificante de péptido señal que dirige el polipéptido expresado hasta la vía secretora de una célula huésped puede ser utilizada.

[0115] Las secuencias codificantes del péptido señal eficaces para células huésped bacterianas son las secuencias codificantes del péptido señal obtenidas de los genes para amilasa maltogénica de *Bacillus* NCIB 11837, subtilisina de *Bacillus licheniformis*, beta-lactamasa de *Bacillus licheniformis*, alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus*, proteasas neutras de *Bacillus stearothermophilus* (nprT, nprS, nprM), y prsA de *Bacillus subtilis*. Otros péptidos señal son descritos por Simonen y Palva, 1993, Microbiological Reviews 57: 109-137.

[0116] Las secuencias codificantes de péptidos señal eficaces para células huésped fúngicas filamentosas son las secuencias codificantes de péptidos señal obtenidas de los genes para amilasa neutra de *Aspergillus niger*, glucoamilasa de *Aspergillus niger*, TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, celulasa de *Humicola insolens*, endoglucanasa V de *Humicola insolens*, lipasa de *Humicola lanuginosa*, y proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*.

[0117] Los péptidos señal útiles para células huésped de levadura se obtienen de los genes para factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae* e invertasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Otras secuencias codificantes del péptido señal útiles son descritas por Romanos *et al.*, 1992, *supra*.

[0118] La secuencia de control también puede ser una secuencia codificante de propéptidos que codifica un propéptido posicionado en el extremo N-terminal de un polipéptido. El polipéptido resultante se conoce como una proenzima o propolipéptido (o un zimógeno en algunos casos). Un propolipéptido generalmente está inactivo y se puede convertir en un polipéptido activo por escisión catalítica o autocatalítica del propéptido a partir del propolipéptido. La secuencia codificante de propéptidos se puede obtener de los genes para proteasa alcalina de *Bacillus subtilis* (aprE), proteasa neutra de *Bacillus subtilis* (nprT), lacasa de *Myceliophthora thermophila* (WO 95/33836), proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, y factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae*.

[0119] Cuando están presentes tanto el péptido señal como las secuencias de propéptidos, la secuencia de propéptidos está situada junto al extremo N-terminal de un polipéptido y la secuencia de péptidos señal está situada junto al extremo N-terminal de la secuencia de propéptidos.

[0120] También puede ser deseable añadir secuencias reguladoras que regulen la expresión del polipéptido respecto al crecimiento de la célula huésped. Los ejemplos de sistemas reguladores son los que causan que se active o desactive la expresión del gen en respuesta a un estímulo químico o físico, incluyendo la presencia de un compuesto regulador. Los sistemas reguladores en sistemas procarióticos incluyen los sistemas de operón lac, tac y trp.

En levaduras, se puede utilizar el sistema de ADH2 o el sistema de GAL1. En hongos filamentosos, se puede utilizar el promotor de glucoamilasa de *Aspergillus niger*, el promotor de TAKA alfa-amilasa de *Aspergillus oryzae*, y el promotor de glucoamilasa de *Aspergillus oryzae*. Otros ejemplos de secuencias reguladoras son aquellas que permiten la amplificación génica. En sistemas eucarióticos, estas secuencias reguladoras incluyen el gen de dihidrofolato reductasa que se amplifica en presencia de metotrexato, y los genes de metalotioneína que se amplifican con metales pesados. En estos casos, el polinucleótido que codifica el polipéptido estaría operativamente enlazado con la secuencia reguladora.

Vectores de expresión

[0121] La presente invención también se refiere a vectores de expresión recombinantes que comprenden un polinucleótido de la presente invención, un promotor, y señales de parada transcripcional y traslacional. Los distintos nucleótidos y secuencias de control se pueden unir para producir un vector de expresión recombinante que puede incluir uno o más sitios de restricción convenientes para permitir la inserción o sustitución del polinucleótido que codifica el polipéptido en tales sitios. Alternativamente, el polinucleótido se puede expresar mediante la inserción del polinucleótido o de un constructo de ácidos nucleicos que comprende el polinucleótido en un vector apropiado para la expresión. Al crear el vector de expresión, la secuencia codificante se localiza en el vector de modo que la secuencia codificante está operativamente enlazada con las secuencias de control apropiadas para la expresión.

[0122] El vector de expresión recombinante puede ser cualquier vector (por ejemplo, un plásmido o virus) que puede ser convenientemente sometido a procedimientos de ADN recombinante y puede desencadenar la expresión del polinucleótido. La elección del vector dependerá típicamente de la compatibilidad del vector con la célula huésped en la que el vector debe ser introducido. El vector puede ser un plásmido lineal o circular cerrado.

[0123] El vector puede ser un vector de replicación autónoma, es decir, un vector que existe como una entidad extracromosómica, cuya replicación es independiente de la replicación cromosómica, por ejemplo, un plásmido, un elemento extracromosómico, un minicromosoma o un cromosoma artificial. El vector puede contener cualquier medio para asegurar la autorreplicación. Alternativamente, el vector puede ser uno que, cuando se introduce en la célula huésped, se integra en el genoma y se replica junto con el/los cromosoma(s) en que se ha integrado. Además, se puede utilizar un único vector o plásmido o dos o más vectores o plásmidos que, juntos, contienen el ADN total que se ha de introducir en el genoma de la célula huésped, o un transposón.

[0124] El vector contiene preferiblemente uno o más marcadores seleccionables que permiten una fácil selección de células transformadas, transfectadas, transducidas o similares. Un marcador seleccionable es un gen cuyo producto proporciona una resistencia biocida o vírica, resistencia a los metales pesados, prototrofia a auxótrofos, y similares.

[0125] Ejemplos de marcadores seleccionables bacterianos son genes *dal* de *Bacillus licheniformis* o de *Bacillus subtilis*, o marcadores que confieren resistencia antibiótica tal como resistencia a ampicilina, cloranfenicol, canamicina, neomicina, espectinomycin, o tetraciclina. Los marcadores adecuados para células huésped de levadura incluyen, pero de forma no limitativa, ADE2, HIS3, LEU2, LYS2, MET3, TRP1, y URA3. Los marcadores seleccionables para usar en una célula huésped fúngica filamentosa incluyen, pero de forma no limitativa, *amdS* (acetamidasa), *argB* (ornitina-carbamoyltransferasa), *bar* (fosfonitrilina acetiltransferasa), *hph* (higromicina fosfotransferasa), *niaD* (nitrato-reductasa), *pyrG* (orotidina-5'-fosfato-descarboxilasa), *sC* (adeniltransferasa de sulfato), y *trpC* (antranilato sintasa), así como equivalentes de los mismos. Para el uso en una célula de *Aspergillus* se prefieren los genes *amdS* y *pyrG* de *Aspergillus nidulans* o de *Aspergillus oryzae* y un gen *bar* de *Streptomyces hygroscopicus*.

[0126] El vector contiene preferiblemente un/varios elemento(s) que permite(n) la integración del vector en el genoma de la célula huésped o la replicación autónoma del vector en la célula independiente del genoma.

[0127] Para la integración en el genoma de la célula huésped, el vector puede depender de la secuencia del polinucleótido que codifica el polipéptido o de cualquier otro elemento del vector para su integración en el genoma por recombinación homóloga o no homóloga. Alternativamente, el vector puede contener polinucleótidos adicionales para dirigir la integración por recombinación homóloga en el genoma de la célula huésped en una ubicación(es) precisa(s) en el/los cromosoma(s). Para aumentar la probabilidad de integración en una ubicación precisa, los elementos integracionales deberían contener un número suficiente de ácidos nucleicos, como por ejemplo de 100 a 10,000 pares de bases, de 400 a 10,000 pares de bases, y de 800 a 10,000 pares de bases, que tienen un alto grado de identidad de secuencia con la secuencia objetivo correspondiente para mejorar la probabilidad de recombinación homóloga. Los elementos integracionales pueden ser cualquier secuencia que sea homóloga a la secuencia objetivo en el genoma de la célula huésped. Además, los elementos integracionales pueden ser polinucleótidos no codificantes o codificantes. Por otro lado, el vector se puede integrar en el genoma de la célula

huésped por recombinación no homóloga.

[0128] Para la replicación autónoma, el vector puede comprender además un origen de replicación que permita al vector replicarse autónomamente en la célula huésped en cuestión. El origen de replicación puede ser cualquier replicador de plásmido que medie la replicación autónoma que funciona en una célula. El término "origen de replicación" o "replicador de plásmido" significa un polinucleótido que permite a un plásmido o vector replicarse *in vivo*.

[0129] Ejemplos de orígenes de replicación bacterianos son los orígenes de replicación de los plásmidos pBR322, pUC19, pACYC177, y pACYC184, que permiten la replicación en *E. Coli*, y pUB110, pE194, pTA1060, y pAM β 1, que permiten la replicación en *Bacillus*.

[0130] Ejemplos de orígenes de replicación para usar en una célula huésped de levadura son el origen replicación del plásmido de 2 micras, ARS1, ARS4, la combinación de ARS1 y CEN3, y la combinación de ARS4 y CEN6.

[0131] Ejemplos de orígenes de replicación útiles en una célula fúngica filamentosa son AMA1 y ANS1 (Gems *et al.*, 1991, Gene 98: 61-67; Cullen *et al.*, 1987, Nucleic Acids Res. 15: 9163-9175; WO 00/24883). El aislamiento del gen AMA1 y la construcción de plásmidos o vectores que comprendan el gen se puede realizar según los métodos descritos en WO 00/24883.

[0132] Más de una copia de un polinucleótido de la presente invención se puede insertar en una célula huésped para aumentar la producción de un polipéptido. Un aumento en el número de copias del polinucleótido se puede obtener mediante la integración de al menos una copia adicional de la secuencia en el genoma de la célula huésped o incluyendo un gen marcador seleccionable amplificable con el polinucleótido, donde las células que contienen copias amplificadas del gen marcador seleccionable, y, por lo tanto, copias adicionales del polinucleótido, se pueden seleccionar mediante el cultivo de las células en presencia del agente seleccionable apropiado.

[0133] Los procedimientos usados para enlazar los elementos anteriormente descritos para construir los vectores de expresión recombinantes de la presente invención son conocidos por un experto en la materia (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, 1989, *supra*).

Células huésped

[0134] La presente invención también se refiere a células huésped recombinantes, que comprenden un polinucleótido de la presente invención operativamente enlazado a una o más secuencias de control que dirigen la producción de un polipéptido de la presente invención. Un constructo o vector que comprende un polinucleótido se introduce en una célula huésped de modo que el constructo o vector se mantiene como un integrante cromosómico o como un vector extracromosomal auto replicante como se describe anteriormente. El término "célula huésped" abarca cualquier descendiente de una célula progenitora que no es idéntica a la célula progenitora debido a mutaciones que ocurren durante la replicación. La elección de una célula huésped dependerá en gran parte del gen que codifica el polipéptido y su fuente.

[0135] La célula huésped puede ser cualquier célula útil en la producción recombinante de un polipéptido de la presente invención, por ejemplo, una procariota o una eucariota.

[0136] La célula huésped procariota puede ser cualquier bacteria gram-positiva o gram-negativa. Las bacterias gram-positivas incluyen, pero de forma no limitativa, *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Geobacillus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Oceanobacillus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* y *Streptomyces*.

Las bacterias gram-negativas incluyen, pero de forma no limitativa, *Campylobacter*, *E. Coli*, *Flavobacterium*, *Fusobacterium*, *helicobacteria*, *Ilyobacter*, *Neisseria*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, y *Ureaplasma*.

[0137] La célula huésped bacteriana puede ser cualquier célula de *Bacillus*, incluyendo, pero sin limitarse a, células de *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus brevis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus clausii*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus firmus*, *Bacillus lautus*, *Bacillus, lentus Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus thuringiensis*.

[0138] La célula huésped bacteriana también puede ser cualquier célula de *Streptococcus*, incluyendo, pero sin limitarse a, células de *Streptococcus equisimilis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus uberis*, y *Streptococcus equi* subesp. *Zooepidemicus*.

[0139] La célula huésped bacteriana también puede ser cualquier célula de *Streptomyces* incluyendo, pero sin limitarse a, células de *Streptomyces achromogenes*, *Streptomyces avermitilis*, *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces griseus* y *Streptomyces lividans*.

[0140] La introducción de ADN en una célula de *Bacillus* se puede efectuar por transformación de protoplastos (véase, por ejemplo, Chang y Cohen, 1979, Mol. Gen. Genet. 168: 111-115), transformación celular competente

(véase, por ejemplo, Young y Spizizen, 1961, J. Bacteriol. 81: 823-829, o Dubnau y Davidoff-Abelson, 1971, J. Mol. Biol. 56: 209-221), electroporación (véase, por ejemplo, Shigekawa y Dower, 1988 Biotechniques 6: 742-751), o conjugación (véase, por ejemplo, Koehler y Thorne, 1987, J. Bacteriol. 169: 5271-5278). La introducción de ADN en una célula de *E. coli* se puede efectuar por transformación de protoplastos (véase, por ejemplo, Hanahan, 1983, J. Mol. Biol. 166: 557-580) o electroporación (véase, por ejemplo, Dower *et al.*, 1988, Nucleic Acids Res. 16: 6127-6145). La introducción de ADN en una célula de *Streptomyces* se puede efectuar por transformación de protoplastos, electroporación (véase, por ejemplo, Gong *et al.*, 2004, Folia Microbiol. (Praha) 49: 399-405), conjugación (véase, por ejemplo, Mazodier *et al.*, 1989, J. Bacteriol. 171: 3583-3585), o transducción (véase, por ejemplo, Burke *et al.*, 2001, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 6289-6294). La introducción de ADN en una célula de *Pseudomonas* se puede efectuar por electroporación (véase, por ejemplo, Choi *et al.*, 2006, J. Microbiol. Methods 64: 391-397) o conjugación (véase, por ejemplo, Pinedo y Smets, 2005, Appl. Environ. Microbiol. 71: 51-57). La introducción de ADN en una célula de *Streptococcus* se puede efectuar por competencia natural (véase, por ejemplo, Perry y Kuramitsu, 1981, Infect. Immun. 32: 1295-1297), transformación de protoplastos (véase, por ejemplo, Catt y Jollick, 1991, Microbios 68: 189-207), electroporación (véase, por ejemplo, Buckley *et al.*, 1999, Appl. Environ. Microbiol. 65: 3800-3804), o conjugación (véase, por ejemplo, Clewell, 1981, Microbiol. Rev. 45: 409-436). No obstante, se puede usar cualquier método conocido en la técnica para la introducción de ADN en una célula huésped.

[0141] La célula huésped también puede ser una eucariota, tal como una célula de mamífero, de insecto, vegetal o fúngica.

[0142] La célula huésped puede ser una célula fúngica. "Hongos" como se utiliza en este contexto incluye los filos Ascomycota, Basidiomycota, Chytridiomycota, y Zygomycota, así como Oomycota y todos los hongos mitospóricos (según se definen en Hawksworth *et al.*, en Ainsworth and Bisby's Dictionary of The Fungi, 8ª edición, 1995, CAB International, University Press, Cambridge, Reino Unido).

[0143] La célula huésped fúngica puede ser una célula de levadura. "Levadura" como se utiliza en este contexto incluye levadura ascoesporógena (Endomycetales), levadura basidioesporógena, y levadura de los Fungi Imperfecti (Blastomycetes). Ya que la clasificación de la levadura puede cambiar en el futuro, para los fines de esta invención, levadura se definirá como se describe en Biology and Activities of Yeast (Skinner, Passmore, and Davenport, editores, Soc. App. Bacteriol. Symposium Series No. 9, 1980).

[0144] La célula huésped de levadura puede ser una célula de *Candida*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* o *Yarrowia*, tal como una célula de *Kluyveromyces lactis*, *Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces diastaticus*, *Saccharomyces douglasii*, *Saccharomyces kluyveri*, *Saccharomyces norbensis*, *Saccharomyces oviformis* o *Yarrowia lipolytica*.

[0145] La célula huésped fúngica puede ser una célula fúngica filamentosa. "Hongos filamentosos" incluyen todas las formas filamentosas de la subdivisión Eumycota y Oomycota (según son definidas por Hawksworth *et al.*, 1995, *supra*). Los hongos filamentosos generalmente se caracterizan por una pared micelial compuesta por quitina, celulosa, glucano, quitosano, manano y otros polisacáridos complejos. El crecimiento vegetativo es por alargamiento hifal y el catabolismo del carbono es estrictamente aeróbico. En cambio, el crecimiento vegetativo por levaduras tales como *Saccharomyces cerevisiae* es por gemación de un micelio unicelular y el catabolismo del carbono puede ser fermentativo.

[0146] La célula huésped fúngica filamentosa puede ser una célula de *Acremonium*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Bjerkandera*, *Ceriporiopsis*, *Chrysosporium*, *Coprinus*, *Coriolus*, *Cryptococcus*, *Filibasidium*, *Fusarium*, *Humicola*, *Magnaporthe*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neocallimastix*, *Neurospora*, *Paecilomices*, *Penicillium*, *Phanerochaete*, *Phlebia*, *Piromices*, *Pleurotus*, *Schizofilum*, *Talaromyces*, *Termonascus*, *Thielavia*, *Tolipocladium*, *Trametes* o *Trichoderma*.

[0147] Por ejemplo, la célula huésped fúngica filamentosa puede ser una célula de *Aspergillus awamori*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Bjerkandera adusta*, *Ceriporiopsis aneirina*, *Ceriporiopsis caregiea*, *Ceriporiopsis gilvescens*, *Ceriporiopsis pannocinta*, *Ceriporiopsis rivulosa*, *Ceriporiopsis subrufa*, *Ceriporiopsis subvermispora*, *Chrysosporium inops*, *Chrysosporium keratinophilum*, *Chrysosporium lucknowense*, *Chrysosporium merdarium*, *Chrysosporium pannicola*, *Chrysosporium queenslandicum*, *Chrysosporium tropicum*, *Chrysosporium zonatum*, *Coprinus cinereus*, *Coriolus hirsutus*, *Fusarium bactridioides*, *Fusarium cerealis*, *Fusarium crookwellense*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium graminum*, *Fusarium heterosporum*, *Fusarium negundi*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium reticulatum*, *Fusarium roseum*, *Fusarium sambucinum*, *Fusarium sarcochromum*, *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium sulphureum*, *Fusarium torulosum*, *Fusarium trichothecioides*, *Fusarium venenatum*, *Humicola insolens*, *Humicola lanuginosa*, *Mucor miehei*, *Myceliophthora thermophila*, *Neurospora crassa*, *Penicillium purpurogenum*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Phlebia radiata*, *Pleurotus eryngii*, *Thielavia terrestris*, *Trametes villosa*, *Trametes versicolor*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei* o *Trichoderma viride*.

[0148] Las células fúngicas se pueden transformar por un proceso que implica la formación de protoplastos, la transformación de los protoplastos y la regeneración de la pared celular de alguna manera conocida de por sí. Procedimientos adecuados para transformación de células huésped de *Aspergillus* y de *Trichoderma* se describen en EP 238023, Yelton *et al.*, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 1470-1474, y Christensen *et al.*, 1988, Bio/Technology 6: 1419-1422. Métodos adecuados para la transformación de especies de *Fusarium* se describen en Malardier *et al.*, 1989, gen 78: 147-156, y WO 96/00787. La levadura se puede transformar utilizando los procedimientos descritos por Becker y Guarente, en Abelson, J.N. y Simon, M.I., editores, Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Methods in Enzymology, Volumen 194, pp 182-187, Academic Press, Inc., Nueva York; Ito *et al.*, 1983, J. Bacteriol. 153: 163; y Hinnen *et al.*, 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 1920.

Métodos de producción

[0149] La presente invención también se refiere a métodos de producción de un polipéptido de la presente invención, que comprende (a) el cultivo de una célula, que en su forma tipo salvaje produce el polipéptido, bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido de la presente invención; y (b) la recuperación del polipéptido de la presente invención. En un aspecto preferido, la célula es una célula de *Saccharothrix*. En un aspecto más preferido, la célula es una célula de *Saccharothrix australiensis*.

[0150] La presente invención también se refiere a métodos de producción de un polipéptido de la presente invención, que comprende (a) el cultivo de una célula huésped recombinante de la presente invención bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido de la presente invención; y (b) la recuperación del polipéptido de la presente invención.

[0151] Las células huésped se cultivan en un medio nutritivo adecuado para la producción del polipéptido utilizando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la célula se puede cultivar por cultivo en matraz de agitación, o fermentación a pequeña escala o a gran escala (incluyendo fermentación continua, por lotes, por lote alimentado o en estado sólido) en laboratorio o en fermentadores industriales en un medio adecuado y bajo condiciones que permiten expresar y/o aislar el polipéptido. El cultivo tiene lugar en un medio nutritivo adecuado que comprende fuentes de nitrógeno y de carbono y sales inorgánicas, usando procedimientos conocidos en la técnica. Los medios adecuados se pueden obtener de proveedores comerciales o se pueden preparar según composiciones publicadas (por ejemplo, en los catálogos de la American Type Culture Collection). Si el polipéptido se secreta en el medio nutritivo, el polipéptido se puede recuperar directamente del medio. Si el polipéptido no es secretado, se puede recuperar de lisados de células.

[0152] El polipéptido se puede detectar utilizando métodos conocidos en la técnica que son específicos para los polipéptidos. Estos métodos de detección incluyen, pero de forma no limitativa, el uso de anticuerpos específicos, la formación de un producto enzimático o la desaparición de un sustrato enzimático. Por ejemplo, se puede utilizar un ensayo enzimático para determinar la actividad del polipéptido.

[0153] El polipéptido se puede recuperar utilizando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, el polipéptido se puede recuperar del medio nutritivo mediante procedimientos convencionales, incluyendo, pero no limitados a, recolección, centrifugación, filtración, extracción, secado por pulverización, evaporación o precipitación.

[0154] El polipéptido se puede purificar mediante una variedad de procedimientos conocidos en la técnica, incluyendo, pero no limitados a, cromatografía (por ejemplo, de intercambio iónico, de afinidad, hidrofóbica, de cromatografía de exclusión por tamaño), procedimientos electroforéticos (por ejemplo, isoelectroenfoque preparativo), solubilidad diferencial (por ejemplo, precipitación de sulfato amónico), SDS-PAGE, o extracción (véase, por ejemplo, Protein Purification, Janson and Riden, editors, VCH Publishers, Nueva York, 1989) para obtener polipéptidos sustancialmente puros.

[0155] En un aspecto alternativo, el polipéptido no se recupera, sino que se usa una célula huésped de la presente invención que expresa el polipéptido como una fuente del polipéptido.

Plantas

[0156] La presente descripción también se refiere a plantas aisladas, por ejemplo una planta, parte de planta o célula vegetal transgénica que comprende un polinucleótido de la presente descripción para expresar y producir un polipéptido o dominio en cantidades recuperables. El polipéptido o dominio se puede recuperar de la planta o parte de planta. Alternativamente, la planta o parte de planta que contiene el polipéptido o dominio se puede utilizar como tal para mejorar la calidad de un alimento o pienso, por ejemplo, para mejorar el valor nutricional, la palatabilidad y las propiedades reológicas, o para destruir un factor antinutritivo.

[0157] La planta transgénica puede ser dicotiledónea (una dicotiledónea) o monocotiledónea (una monocotiledónea). Algunos ejemplos de plantas monocotiledóneas son las hierbas, tales como poa de prados (pasto azul, poa), gramíneas forrajeras tales como Festuca, Lolium, césped templado, tal como Agrostis, y cereales, por ejemplo, trigo, avena, centeno, cebada, arroz, sorgo y maíz.

[0158] Algunos ejemplos de plantas dicotiledóneas son el tabaco, las leguminosas, tales como el altramuç, la patata, la remolacha, el guisante, la judía y la soja, y plantas crucíferas (familia Brassicaceae), tales como la coliflor, la colza, y el organismo modelo estrechamente relacionado *Arabidopsis thaliana*.

[0159] Algunos ejemplos de partes de una planta son el tallo, callo, hojas, raíz, frutos, semillas, y tubérculos, así como los tejidos individuales que comprenden estas partes, por ejemplo, epidermis, mesófilo, parénquima, tejidos vasculares, meristemas. Los compartimentos específicos de las células vegetales, tales como los cloroplastos, apoplastos, mitocondrias, vacuolas, peroxisomas y citoplasma también se consideran una parte de la planta. Además, cualquier célula vegetal, cualquiera que sea el origen del tejido, se considera una parte de la planta. Asimismo, las partes de la planta tales como tejidos específicos y células aisladas para facilitar la utilización de la divulgación también se consideran partes de la planta, por ejemplo, embriones, endospermas, aleurona y el recubrimiento de las semillas.

[0160] También se incluyen dentro del campo de la presente descripción los descendientes de tales plantas, partes de planta y células vegetales.

[0161] La planta o célula vegetal transgénica que expresa el polipéptido o dominio se puede construir conforme a métodos conocidos en la técnica. En resumen, la planta o célula vegetal se construye mediante la incorporación de uno o más constructos de expresión que codifican el polipéptido o dominio en el genoma del huésped vegetal o en el genoma cloroplástico y propagan la planta o célula vegetal modificada resultante en una planta o célula vegetal transgénica.

[0162] El constructo de expresión es convenientemente un constructo de ácidos nucleicos que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido o dominio operativamente enlazado con secuencias reguladoras apropiadas requeridas para la expresión del polinucleótido en la planta o parte de planta de elección.

Además, el constructo de expresión puede comprender una etiqueta seleccionable útil para la identificación de células vegetales en las que el constructo de expresión ha sido integrado y secuencias de ADN necesarias para introducción del constructo en la planta en cuestión (esta última depende del método de introducción de ADN utilizado).

[0163] La elección de secuencias reguladoras, tales como secuencias promotoras y terminadoras y, opcionalmente, secuencias de señal o de tránsito, se determina, por ejemplo, basándose en cuándo, dónde, y cómo se desea expresar el polipéptido o dominio. Por ejemplo, la expresión del gen que codifica un polipéptido o dominio puede ser constitutiva o inducible, o puede ser específica del desarrollo, fase o tejido, y el producto génico puede estar dirigido a un tejido o parte de planta específico tales como las semillas o las hojas. Se describen secuencias reguladoras en, por ejemplo, Tague *et al.*, 1988, Plant Physiology 86: 506.

[0164] Para la expresión constitutiva, se puede utilizar el promotor 35S-CaMV, el promotor de ubiquitina 1 del maíz, o el promotor de actina 1 del arroz (Franck *et al.*, 1980; Cell 21: 285-294; Christensen *et al.*, 1992, Plant Mol. Biol. 18: 675-689; Zhang *et al.*, 1991, Plant Cell 3: 1155-1165). Los promotores específicos para un órgano pueden ser, por ejemplo, un promotor procedente de tejidos sumidero de almacenamiento tales como semillas, tubérculos de patata y frutas (Edwards y Coruzzi, 1990, Ann. Rev. Genet. 24: 275-303), o de tejidos sumidero metabólicos tales como meristemas (Ito *et al.*, 1994, Plant Mol. Biol. 24: 863-878), un promotor específico de semillas como el promotor de la glutelina, prolamina, globulina, o albúmina del arroz (Wu *et al.*, 1998, Plant Cell Physiol. 39: 885-889), un promotor de *Vicia faba* de legumina B4y el gen desconocido de proteína de semilla de *Vicia faba* (Conrad *et al.*, 1998, J. Plant Physiol. 152: 708-711), un promotor procedente de una proteína de cuerpo oleoso de semilla (Chen *et al.*, 1998, Plant Cell Physiol. 39: 935-941), el promotor de la proteína de almacenamiento *napa* de *Brassica napus*, o cualquier otro promotor específico de semilla conocido en la técnica, por ejemplo, como se describe en WO 91/14772. Además, el promotor puede ser un promotor específico de hojas tal como el promotor del *rbcS* de arroz o tomate (Kyoizuka *et al.*, 1993, Plant Physiol. 102: 991-1000), el promotor del gen de adenina metiltransferasa del virus *chlorella* (Mitra y Higgins, 1994, Plant Mol. Biol. 26: 85-93), el promotor del gen *aldP* del arroz (Kagaya *et al.*, 1995, Mol. Gen. Genet. 248: 668-674), o un promotor inducible por heridas como el promotor del *pin2* de la patata (Xu *et al.*, 1993, Plant Mol. Biol. 22: 573-588). Asimismo, el promotor se puede inducir mediante tratamientos abióticos tales como temperatura, sequía, o alteraciones en la salinidad o inducidas por sustancias aplicadas exógenamente que activan el promotor, por ejemplo, etanol, estrógenos, hormonas vegetales como etileno, ácido abscísico, y ácido giberélico y metales pesados.

[0165] Un elemento potenciador del promotor también se puede usar para conseguir una expresión más alta de un polipéptido o dominio en la planta. Por ejemplo, el elemento potenciador del promotor puede ser un intrón que se coloca entre el promotor y el polinucleótido que codifica un polipéptido o dominio. Por ejemplo, Xu *et al.*, 1993, *supra*, divulga el uso del primer intrón del gen de actina 1 de arroz para mejorar la expresión.

[0166] El gen marcador seleccionable y cualquiera de las otras partes del constructo de expresión se puede elegir de las disponibles en la técnica.

[0167] El constructo de ácidos nucleicos se incorpora en el genoma de la planta según técnicas convencionales conocidas en la técnica, incluyendo transformación mediada por *Agrobacterium*, transformación mediada por virus, microinyección, bombardeo de partículas, transformación biolística y electroporación (Gasser *et al.*, 1990, Science 244: 1293; Potrykus, 1990, Bio/Technology 8: 535; Shimamoto *et al.*, 1989, Nature 338: 274).

[0168] La transferencia genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens* es un método para generar dicotiledóneas transgénicas (para un artículo de revisión, véase Hooykas y Schilperoort, 1992, Plant Mol. Biol. 19: 15-38) y para transformar monocotiledóneas, aunque se pueden usar otros métodos de transformación para estas plantas.

Un método para generar monocotiledóneas transgénicas es el bombardeo de partículas (partículas microscópicas de oro o de tungsteno recubiertas con el ADN en transformación) de callos embrionarios o embriones en desarrollo (Christou, 1992, Plant J. 2: 275-281; Shimamoto, 1994, Curr. Opin. Biotechnol. 5: 158-162; Vasil *et al.*, 1992, Bio/Technology 10: 667-674). Un método alternativo para la transformación de monocotiledóneas se basa en la transformación de protoplastos como se describe en Omirulleh *et al.*, 1993, Plant Mol. Biol. 21: 415-428. Los métodos de transformación adicionales incluyen los descritos en las patentes de EEUU nº. 6,395,966 y 7,151,204.

[0169] Después de la transformación, los transformantes que han incorporados el constructo de expresión se seleccionan y se regeneran en plantas enteras según métodos ampliamente conocidos en la técnica. Normalmente, el procedimiento de transformación está diseñado para la eliminación selectiva de genes de selección o bien durante la regeneración o bien en las siguientes generaciones usando, por ejemplo, cotransformación con dos constructos de ADN-T separados o escisión específica de sitio del gen de selección por una recombinasa específica.

[0170] Además de la transformación directa del genotipo de una planta particular con un constructo de la presente descripción, las plantas transgénicas se pueden hacer cruzando una planta que tiene el constructo con una segunda planta que carece del constructo. Por ejemplo, un constructo que codifica un polipéptido o dominio se puede introducir en una variedad de planta particular mediante cruce, sin que sea necesario transformar directamente una planta de esta variedad determinada. Por lo tanto, la presente divulgación no solo incluye una planta directamente regenerada a partir de células que han sido transformadas conforme a la presente descripción, sino también las descendientes de tales plantas. Como se utiliza en este caso, descendiente puede referirse a la descendencia de cualquier generación de una planta progenitora preparada conforme a la presente descripción. Tal descendiente puede incluir un constructo de ADN preparado conforme a la presente descripción. El cruce tiene como resultado la introducción de un transgen en el linaje de una planta mediante polinización cruzada de un linaje inicial con el linaje de una planta donadora. Algunos ejemplos no limitativos de tales pasos se describen en la patente de EE.UU. nº 7,151,204.

[0171] Se puede generar plantas a través de un proceso de conversión por retrocruzamiento. Por ejemplo, las plantas incluyen plantas a las que se hace referencia como un genotipo, linaje, línea parental o híbrido.

[0172] Se puede usar marcadores genéticos para ayudar en la introgresión de uno o más transgenes de la divulgación de un contexto genético a otro. La selección asistida por marcador presenta ventajas con respecto a la mejora genética vegetal convencional en que cuanto a que se puede usar para evitar errores provocados por variaciones fenotípicas. Además, los marcadores genéticos pueden proporcionar datos con respecto al grado relativo de germoplasma élite en el descendiente individual de un cruce particular. Por ejemplo, cuando una planta con una característica deseada que, de otro modo, tiene un contexto genético no deseable agrónomicamente se cruza a un progenitor élite, los marcadores genéticos se pueden utilizar para seleccionar descendientes que no sólo posean la característica de interés, sino que también tengan una proporción relativamente grande del germoplasma deseado.

De esta manera, el número de generaciones requerido para la introgresión de uno o más rasgos en un contexto genético particular se minimiza.

[0173] La presente descripción también se refiere a métodos de producción de un polipéptido o dominio de la presente invención que comprende (a) el cultivo de una planta transgénica o una célula vegetal que comprende un polinucleótido que codifica el polipéptido o dominio bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido o dominio; y (b) la recuperación del polipéptido o dominio.

Péptido señal y propéptido

[0174] La presente descripción también se refiere a un polinucleótido aislado que codifica un péptido señal que comprende o consiste en los aminoácidos 1 a 29 de la SEQ ID NO: 2. La presente descripción también se refiere a un polinucleótido aislado que codifica un propéptido que comprende o consiste en los aminoácidos 30 a 188 de la SEQ ID NO: 2. La presente descripción también se refiere a un polinucleótido aislado que codifica un péptido señal y un propéptido que comprende o consiste en los aminoácidos 1 a 188 de la SEQ ID NO: 2. Los polinucleótidos también pueden comprender un gen que codifica una proteína, que está operativamente enlazada al péptido señal y/o propéptido. La proteína es preferiblemente extraña al péptido señal y/o propéptido. En un aspecto, el polinucleótido que codifica el péptido señal corresponde a los nucleótidos 101 a 187 de la SEQ ID NO: 1. En otro aspecto, el polinucleótido que codifica el propéptido corresponde a los nucleótidos 188 a 664 de la SEQ ID NO: 1. En otro aspecto, el polinucleótido que codifica el péptido señal y el propéptido corresponde a los nucleótidos 101 a

664 de la SEQ ID NO: 1.

[0175] La presente divulgación también se refiere a constructos de ácidos nucleicos, vectores de expresión y células huésped recombinantes que comprenden tales polinucleótidos.

Composiciones detergentes

[0176] En una forma de realización, la invención está orientada a composiciones detergentes que incluyen una enzima de la presente invención en combinación con uno o más componentes de composición de limpieza adicionales. Por lo tanto, en una forma de realización, la presente invención se refiere a una composición detergente que incluye un polipéptido aislado que tiene una identidad de secuencia con el polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2 de al menos el 85%, que tiene actividad de proteasa, y donde el polipéptido maduro corresponde a los aminoácidos 189 a 374 de la SEQ ID NO: 2.

[0177] La elección de componentes adicionales está dentro de la habilidad del artesano e incluye ingredientes convencionales, incluyendo los componentes no limitativos ejemplares expuestos a continuación. La elección de los componentes puede incluir, para el cuidado de tejidos, la consideración del tipo de tejido que se ha de limpiar, el tipo y/o grado de suciedad, la temperatura a la que la limpieza debe realizarse y la formulación del producto detergente. Aunque los componentes mencionados a continuación están categorizados por un nombre general según una funcionalidad particular, esto no debe interpretarse como una limitación, ya que un componente puede comprender funcionalidades adicionales, como apreciará el experto en la materia.

Enzima de la presente invención

[0178] En una forma de realización de la presente invención, el polipéptido de la presente invención se puede añadir a una composición detergente en una cantidad que corresponde con 0,001-200 mg de proteína, tal como 0,005-100 mg de proteína, preferiblemente 0,01-50 mg de proteína, más preferiblemente 0,05-20 mg de proteína, aún más preferiblemente 0,1-10 mg de proteína por litro de solución de lavado.

[0179] La(s) enzima(s) de la composición detergente de la invención se puede(n) estabilizar utilizando agentes estabilizantes convencionales, por ejemplo, un poliol tal como propilenglicol o glicerol, un azúcar o alcohol de azúcar, ácido láctico, ácido bórico, o un derivado de ácido bórico, por ejemplo, un éster de borato aromático, o un derivado de ácido fenil borónico tal como ácido 4-formilfenil borónico, y la composición se puede formular como se describe en, por ejemplo, WO92/19709 y WO92/19708, o las variantes según la invención se pueden estabilizar utilizando péptido aldehídos o cetonas tal como se describe en WO 2005/105826 y WO 2009/118375.

[0180] Un polipéptido de la presente invención también se puede incorporar en las formulaciones detergentes descritas en WO97/07202.

Tensioactivos

[0181] La composición detergente puede comprender uno o más tensioactivos, que pueden ser aniónicos y/o catiónicos y/o no iónicos y/o semipolares y/o zwitteriónicos, o una mezcla de los mismos. En una forma de realización particular, la composición detergente incluye una mezcla de uno o más tensioactivos no iónicos y uno o más tensioactivos aniónicos. El/los tensioactivo(s) está(n) típicamente presente(s) a un nivel de aproximadamente 0,1 % a 60% en peso, tal como aproximadamente de 1% a aproximadamente 40%, o aproximadamente de 3% a aproximadamente 20%, o aproximadamente de 3% a aproximadamente 10%. El/los tensioactivo(s) se elige(n) en función de la aplicación de limpieza deseada, e incluye(n) cualquier tensioactivo(s) convencional(es) conocido(s) en la técnica. Se puede utilizar cualquier tensioactivo conocido en la técnica para el uso en detergentes.

[0182] Cuando se incluye, el detergente normalmente contendrá de aproximadamente 1% a aproximadamente 40% en peso, tal como de aproximadamente 5% a aproximadamente 30%, incluso de aproximadamente 5% a aproximadamente 15%, o de aproximadamente 20% a aproximadamente 25% de un tensioactivo aniónico.

Los ejemplos no limitativos de tensioactivos aniónicos incluyen sulfatos y sulfonatos, en particular, alquilbencenosulfonatos lineales (LAS), isómeros de LAS, alquilbencenosulfonatos ramificados (BABS), fenilalcanosulfonatos, alfa-olefinsulfonatos(AOS), olefin-sulfonatos, alqueno sulfonatos, alcano-2,3-diilbis(sulfatos), hidroxialcanosulfonatos y disulfonatos, alquilsulfatos (AS) tal como dodecilsulfato sódico (SDS), sulfatos de alcoholes grasos (FAS), sulfatos de alcoholes primarios (PAS), etersulfatos de alcohol (AES o AEOS o FES, también conocidos como etoxisulfatos de alcohol o etersulfatos de alcoholes grasos), alcanosulfonatos secundarios (SAS), sulfonatos de parafina (PS), sulfonatos de éster, ésteres de glicerol de ácidos grasos sulfonados, alfa-sulfo metilésteres de ácidos grasos (alfa-SFMe o SES) incluyendo sulfonato de metiléster (MES), ácido alquil- o alquenilsuccínico, ácido dodecenil/tetradecenil succínico (DTSA), derivados de ácidos grasos de aminoácidos, diésteres y monoésteres de ácido sulfo-succínico o jabón, y combinaciones de los mismos.

[0183] Cuando se incluye, el detergente normalmente contendrá de aproximadamente 1 % a aproximadamente 40% en peso de un tensioactivo catiónico. Los ejemplos no limitativos de tensioactivos catiónicos incluyen catión de

amonio cuaternario de alquildimetiletanolamina (ADMEAQ), bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), cloruro de dimetildisteartilamonio (DSDMAC), alquilbenzildimetilamonio, compuestos de alquil amonio cuaternario, amonio cuaternario alcoxlado (AQA) y combinaciones de los mismos.

[0184] Cuando se incluye, el detergente normalmente contendrá de aproximadamente 0,2% a aproximadamente 40% en peso de un tensioactivo no iónico, por ejemplo de aproximadamente 0,5% a aproximadamente 30%, en particular de aproximadamente 1% a aproximadamente 20%, de aproximadamente 3% a aproximadamente 10%, tal como de aproximadamente 3% a aproximadamente 5%, o de aproximadamente 8% a aproximadamente 12%. Los ejemplos no limitativos de tensioactivos no iónicos incluyen alcoholes etoxilados (AE o AEO), alcoholes propoxilados, alcoholes grasos propoxilados (PFA), alquilésteres de ácidos grasos alcoxlados, tales como alquilésteres de ácidos grasos etoxilados y/o propoxilados, alquilfenoles etoxilados, (mono) etoxilatos de nonilfenol (NPE), alquilpoliglucosidas (APG), aminas alcoxladas, monoetanolamidas de ácidos grasos (FAM), dietanolamidas de ácidos grasos (FadA), monoetanolamidas de ácidos grasos etoxilados (EFAM), monoetanolamidas de ácidos grasos propoxilados (PFAM), polihidroxi alquil amidas de ácidos grasos, o derivados N-alquil N-acil de glucosamina (glucamidas, GA, o glucamida de ácidos grasos, FAGA), así como productos disponibles con los nombres comerciales SPAN y TWEEN, y combinaciones de los mismos.

[0185] Cuando se incluye, el detergente normalmente contendrá de aproximadamente 1% a aproximadamente 40% en peso de un tensioactivo semipolar. Los ejemplos no limitativos de tensioactivos semipolares incluyen óxidos de amina (AO) tales como óxido de alquildimetilamina, óxido de *N*-(coco alquil)-*N,N*-dimetilamina y óxido de *N*-(seboalquil)-*N,N*-bis(2-hidroxietil)amina, alcanolamidas de ácidos grasos y alcanolamidas de ácidos grasos etoxilados, y combinaciones de los mismos.

[0186] Cuando se incluye, el detergente normalmente contendrá de aproximadamente 1 % a aproximadamente 40% en peso de un tensioactivo bipolar. Los ejemplos no limitativos de tensioactivos zwitteriónicos incluyen betaína, alquildimetilbetaína y sulfobetaína, y combinaciones de las mismas.

Hidrótropos

[0187] Un hidrótopo es un compuesto que solubiliza compuestos hidrofóbicos en soluciones acuosas (o, por el contrario, sustancias polares en un ambiente no polar). Típicamente, los hidrótopos tienen tanto un carácter hidrofílico como un carácter hidrofóbico (las denominadas propiedades anfílicas según se conocen de los tensioactivos); sin embargo, la estructura molecular de los hidrótopos generalmente no favorece la autoagregación espontánea, véase por ejemplo el artículo de revisión por Hodgdon y Kaler (2007), *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 12: 121-128. Los hidrótopos no muestran una concentración crítica por encima de la cual se produzca autoagregación, como se ha descubierto en el caso de tensioactivos y lípidos que forman fases micelar, laminar u otras mesofases bien definidas. En cambio, muchos hidrótopos muestran un proceso de agregación de tipo continuo donde los tamaños de los agregados crecen a medida que aumenta la concentración. Sin embargo, muchos hidrótopos alteran el comportamiento de fase, la estabilidad, y las propiedades coloidales de sistemas que contienen sustancias de carácter polar y no polar, incluyendo mezclas de agua, aceite, tensioactivos y polímeros. Los hidrótopos se usan tradicionalmente en varias industrias, desde la farmacéutica, la del cuidado personal, la de la alimentación, hasta aplicaciones técnicas. El uso de hidrótopos en composiciones detergentes permiten, por ejemplo, formulaciones más concentradas de tensioactivos (como en el proceso de compactar detergentes líquidos eliminando el agua) sin inducir fenómenos no deseados tales como la separación de fases o una alta viscosidad.

[0188] El detergente puede contener 0-5% en peso, tal como aproximadamente de 0,5 a aproximadamente 5%, o aproximadamente 3% a aproximadamente 5%, de un hidrótopo. Se puede utilizar cualquier hidrótopo conocido en la técnica para usar en detergentes. Los ejemplos no limitativos de hidrótopos incluyen bencen sulfonato de sodio, p-toluensulfonato de sodio (STS), xilen sulfonato de sodio (SXS), cumeno sulfonato de sodio (SCS), cimen sulfonato de sodio, óxidos de amina, alcoholes y poliglicoléteres, hidroxinaftoato de sodio, hidroxinaftalen sulfonato de sodio, etilhexil sulfato de sodio y combinaciones de los mismos.

Constructores y co-constructores

[0189] La composición detergente puede contener aproximadamente 0-65% en peso, tal como aproximadamente 5% a aproximadamente 50% de un constructor o co-constructor de detergente, o una mezcla de los mismos. En un detergente lavavajillas, el nivel de constructor es típicamente de 40-65%, particularmente 50-65%.

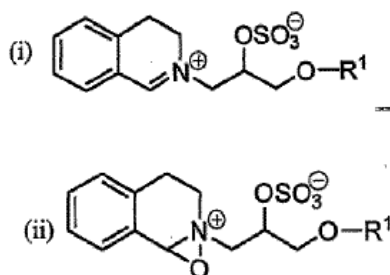
El constructor y/o co-constructor puede ser particularmente un agente quelante que forma complejos hidrosolubles con Ca y Mg. Se puede utilizar cualquier constructor y/o co-constructor conocido en la técnica para usar en detergentes para ropa. Los ejemplos no limitativos de constructores incluyen zeolitas, difosfatos (pifosfatos), trifosfatos tales como el trifosfato de sodio (STP o STTP), carbonatos tales como el carbonato de sodio, silicatos solubles tales como el metasilicato de sodio, silicatos estratificados (por ejemplo, SKS-6 de Hoechst), etanolaminas tales como 2-aminoetan-1-ol (MEA), dietanolamina (DEA, también conocida como iminodietanol), trietanolamina (TEA, también conocida como 2,2',2"-nitritotriethanol), y la carboximetil inulina (CMI)" y combinaciones de los mismos.

[0190] La composición detergente también puede contener 0-65% 0-65% en peso, tal como aproximadamente 5% a aproximadamente 40%, de un co-constructor detergente, o una mezcla del mismo. La composición detergente puede incluir un co-constructor solo, o en combinación con un constructor, por ejemplo un constructor de zeolita.

Los ejemplos no limitativos de co-constructores incluyen homopolímeros de poliacrilatos o copolímeros de los mismos, tales como ácido poli(acrílico) (PAA) o ácido copoli(acrílico)/ácido maleico (PAA/PMA). Otros ejemplos no limitativos incluyen citrato, queladores tales como aminocarboxilatos, aminopolicarboxilatos y fosfonatos, y ácido alquil- o alquenilsuccínico. Los ejemplos específicos adicionales incluyen ácido 2,2',2"-nitritotriacético (NTA), ácido etilenodiaminatetraacético (EDTA), ácido dietilenotriaminopentaacético (DTPA), ácido iminodisuccínico (IDS), etilenodiamina-*N,N'*-ácido disuccínico (EDDS), ácido metilglicinadiacético (MGDA), ácido glutámico-*N,N'*-ácido diacético (GLDA), ácido etilenodiaminatetra(metilenfosfónico) (HEDP), ácido etilenodiaminatetra(metilenfosfónico) (EDTMPA), ácido dietilenotriaminapenta(metilenfosfónico) (DTPMPA), ácido *N*-(2-hidroxiethyl)iminodiacético (EDG), ácido aspártico-*N*-ácido monoacético (ASMA), ácido aspártico-*N,N'*-ácido diacético (ASDA), ácido aspártico-*N*-ácido monopropiónico (ASMP), ácido iminodisuccínico (IDA), ácido *N*-(2-sulfometil)aspártico (SMAS), ácido *N*-(2-sulfoetil)aspártico (SEAS), ácido *N*-(2-sulfometil)glutámico (SMGL), ácido *N*-(2-sulfoetil)glutámico (SEGL), ácido *N*-metiliminodiacético (MIDA), α -alanina-*N,N'*-ácido diacético (α -ALDA), serina-*N,N'*-ácido diacético (SEDA), isoserina-*N,N'*-ácido diacético (ISDA), fenilalanina-*N,N'*-ácido diacético (PHDA), ácido antranílico-*N,N'*-ácido diacético (ANDA), ácido sulfanílico-*N,N'*-ácido diacético (SLDA), taurina-*N,N'*-ácido diacético (TUDA) y sulfometil-*N,N'*-ácido diacético (SMDA), *N*-(2-hidroxiethyl)-etilendiamina-*N,N'*-triacetato (HEDTA), dietanolglicina (DEG), ácido dietilentríaminapenta(metilenfosfónico) (DTPMP), ácido aminotris(metilenfosfónico) (ATMP), y combinaciones y sales de los mismos. Otros constructores y/o co-constructores ejemplares se describen en, por ejemplo, WO 09/102854, US 5977053.

Sistemas blanqueantes

[0191] El detergente puede contener 0-10% en peso, tal como aproximadamente 1% a aproximadamente 5%, de un sistema blanqueante. Se puede utilizar cualquier sistema blanqueante conocido en la técnica para usar en detergentes para ropa. Los componentes adecuados de un sistema blanqueante incluyen catalizadores de blanqueo, fotoblanqueadores, activadores de blanqueo, fuentes de peróxido de hidrógeno tales como percarbonato de sodio y perboratos de sodio, perácidos preformados y mezclas de los mismos. Los perácidos preformados adecuados incluyen, pero de forma no limitativa, ácidos peroxicarboxílicos y sales, ácidos percarbónicos y sales, ácidos perimídicos y sales, ácidos peroximonosulfúricos y sales, por ejemplo, Oxone (R), y mezclas de los mismos. Los ejemplos no limitativos de sistemas blanqueantes incluyen sistemas blanqueantes basados en peróxido, que puede comprender, por ejemplo, una sal inorgánica, incluyendo sales de metales alcalinos tales como sales de sodio de perborato (normalmente mono- o tetrahidrato), percarbonato, persulfato, perfosfato, sales de persilicato, en combinación con un activador de blanqueo formador de perácido. El término activador de blanqueo se entiende en este caso como un compuesto que reacciona con blanqueador de peroxígeno como peróxido de hidrógeno para formar un perácido. El perácido formado de este modo constituye el blanqueador activado. Los activadores de blanqueo adecuados para ser usados en la presente invención incluyen los de la clase de las amidas, imidas o anhídridos de ésteres. Algunos ejemplos adecuados son tetracetiletileno diamina (TAED), sulfonato de sodio 4-[(3,5,5-trimetilhexanoil)oxi]benceno (ISONOBS), ácido diperoxi dodecanoico, 4-(dodecanoiloxi)benzenosulfonato (LOBS), 4-(decanoiloxi)benzenosulfonato, 4-(decanoiloxi)benzoato (DOBS), 4-(nonanoiloxi)benzenosulfonato (NOBS) y/o los descritos en WO98/17767. Una familia particular de activadores de blanqueo de interés se describió en EP624154 y en esa familia se prefiere particularmente el citrato de trietilo de acetilo (ATC). El ATC o un triglicérido de cadena corta como Triacin tiene la ventaja de que es respetuoso con el medio ambiente, ya que se acaba degradando hasta convertirse en ácido cítrico y alcohol. Además, el citrato de trietilo de acetilo y la triacetina tienen una estabilidad hidrolítica buena en almacenamiento y son activadores de blanqueo eficaces. Finalmente, el ATC proporciona una buena capacidad de construcción al aditivo de lavado de ropa. Alternativamente, el sistema blanqueante puede comprender peroxiácidos de tipo amida, imida, o sulfona, por ejemplo. El sistema blanqueante también puede comprender perácidos tales como ácido 6-(ftalimido)peroxihexanoico (PAP). El sistema blanqueante también puede incluir un catalizador de blanqueador. En algunas formas de realización, el componente de blanqueador puede ser un catalizador orgánico seleccionado del grupo consistente en catalizadores orgánicos que tienen las fórmulas siguientes:



(iii) y mezclas de los mismos; donde cada R^1 es independientemente un grupo alquilo ramificado que contiene de 9 a 24 carbonos o grupo alquilo lineal que contiene de 11 a 24 carbonos, preferiblemente cada R^1 es independientemente un grupo alquilo ramificado que contiene de 9 a 18 carbonos o grupo alquilo lineal que contiene de 11 a 18 carbonos, más preferiblemente cada R^1 se selecciona independientemente del grupo consistente en 2-propilheptilo, 2-butiloctilo, 2-pentilnonilo, 2-hexildecilo, n-dodecilo, n-tetradecilo, N-hexadecilo, n-octadecilo, isononilo, isodecilo, iso-tridecilo e iso-pentadecilo. Otros sistemas blanqueantes ejemplares se describen, por ejemplo, en WO2007/087258; WO2007/087244, WO2007/087259, WO2007/087242. Los fotoblanqueadores adecuados pueden ser, por ejemplo, ftalocianina de zinc sulfonatada.

Polímeros

[0192] El detergente puede contener 0-10% en peso, tal como 0,5-5%, 2-5%, 0,5-2% o 0,2-1% de un polímero. Se puede utilizar cualquier polímero conocido en la técnica para usar en detergentes. El polímero puede funcionar como un co-constructor, como se ha mencionado anteriormente, o puede proporcionar propiedades anti-redepósito, de protección de las fibras, de liberación de residuos, de inhibición de la transferencia del tinte, de limpieza de la grasa y/o anti-espumantes. Algunos polímeros pueden tener más de una de las propiedades anteriormente mencionadas y/o más de uno de los motivos mencionados a continuación. Los polímeros ejemplares incluyen (carboximetil)celulosa (CMC), alcohol poli(vinílico) (PVA), poli(vinilpirrolidona) (PVP), poli(etilenglicol) u óxido de poli(etileno) (PEG), poli(etilenimina) etoxilada, carboximetil inulina (CMI), y policarboxilatos tales como PAA, PAA/PMA, ácido poliaspártico, y copolímeros de lauril metacrilato/ácido acrílico, CMC modificada hidrofóbicamente (HM-CMC) y siliconas, copolímeros de ácido tereftálico y glicoles oligoméricos, copolímeros de tereftalato de poli(etileno) y tereftalato de poli(oxietano) (PET-POET), PVP, poli(vinilimidazol) (PVI), N-óxido de poli(vinilpiridina) (PVPO o PVPNO) y polivinilpirrolidona-vinilimidazol (PVPVI). Otros polímeros ejemplares incluyen policarboxilatos sulfonatados, óxido de polietileno y óxido de polipropileno (PEO-PPO) y diquaternium etoxi sulfato. Otros polímeros ejemplares se describen en, por ejemplo, WO 2006/130575. También se contemplan las sales de los polímeros anteriormente mencionados.

Agentes tonalizadores de tejidos

[0193] Las composiciones detergentes de la presente invención también pueden incluir agentes tonalizadores de tejido tales como colorantes o pigmentos que, cuando se formulan en composiciones detergentes, pueden depositarse sobre un tejido cuando dicho tejido se pone en contacto con una solución de lavado que comprende dichas composiciones detergentes, alterando así el tinte de dicho tejido a través de la absorción/reflexión de luz visible. Los agentes blanqueadores fluorescentes emiten al menos alguna luz visible. En cambio, los agentes tonalizadores de tejidos alteran el tinte de una superficie al absorber al menos una porción del espectro de luz visible.

Los agentes tonalizadores de tejidos adecuados incluyen colorantes y conjugados de tinte-arcilla, y también pueden incluir pigmentos. Los colorantes adecuados incluyen colorantes de moléculas pequeñas y colorantes poliméricos.

Los colorantes de moléculas pequeñas adecuados incluyen colorantes de moléculas pequeñas seleccionados del grupo consistente en colorantes que están dentro de las clasificaciones del Colour Index (C.I.) Direct Blue, Direct Red, Direct Violet, Acid Blue, Acid Red, Acid Violet, Basic Blue, Basic Violet y Basic Red, o mezclas de los mismos, por ejemplo como se describe en WO2005/03274, WO2005/03275, WO2005/03276 y EP1876226.

La composición detergente preferiblemente comprende de aproximadamente 0,00003 % en peso a aproximadamente 0,2 % en peso, de aproximadamente 0,00008 % en peso a aproximadamente 0,05 % en peso, o incluso de aproximadamente 0,0001 % en peso a aproximadamente 0,04 % en peso de agente tonalizador de tejido.

La composición puede comprender de 0,0001 % en peso a 0,2 % en peso de agente tonalizador de tejidos, esto puede ser especialmente preferido cuando la composición está en forma de un saquito de dosis unitaria. Agentes tonalizadores adecuados también se describen en, por ejemplo, WO 2007/087257, WO2007/087243.

Enzimas (adicionales)

[0194] El aditivo de detergente, al igual que la composición detergente, puede comprender una o más enzimas [adicionales] tal como una proteasa, lipasa, cutinasa, una amilasa, carbohidrasa, celulasa, pectinasa, mananasa, arabinasa, galactanasa, xilanas, oxidasa, por ejemplo, una lacasa, y/o peroxidasa.

[0195] En general, las propiedades de la(s) enzima(s) seleccionada(s) deberían ser compatibles con el detergente seleccionado, (es decir, pH óptimo, compatibilidad con otros ingredientes enzimáticos y no enzimáticos, etc.), y la(s) enzima(s) debería(n) estar presente(s) en cantidades eficaces.

[0196] Celulasas: las celulasas adecuadas incluyen las de origen bacteriano o fúngico. Las mutantes químicamente modificadas o modificadas por ingeniería de proteínas están incluidas. Las celulasas adecuadas incluyen celulasas de los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Humicola*, *Fusarium*, *Thielavia*, *Acremonium*, por ejemplo, las celulasas fúngicas producidas a partir de *Humicola insolens*, *Myceliophthora thermophila* y *Fusarium oxysporum* descritas en US 4,435,307; US 5,648,263; US 5,691,178; US 5,776,757 y WO 89/09259.

[0197] Las celulasas especialmente adecuadas son las celulasas alcalinas o neutrales que tienen beneficios de cuidado del color. Algunos ejemplos de tales celulasas son las celulasas descritas en EP 0 495 257, EP 0 531 372, WO 96/11262, WO 96/29397, WO 98/08940. Otros ejemplos son variantes de celulasa tales como las descritas en WO 94/07998, EP 0 531 315, US 5,457,046, US 5,686,593, US 5,763,254, WO 95/24471, WO 98/12307 y PCT/DK98/00299.

[0198] Las celulasas disponibles comercialmente incluyen Celluzyme™, y Carezyme™ (Novozymes A/S), Clazinase™, y Puradax HA™ (Genencor International Inc.), y KAC-500(B)™ (Kao Corporation).

[0199] Proteasas: las proteasas adecuadas incluyen las de origen animal, vegetal o microbiano. El origen microbiano es preferido. Se incluyen mutantes químicamente modificadas o modificadas por ingeniería de proteínas.

La proteasa puede ser una serina proteasa o una metaloproteasa, preferiblemente una proteasa microbiana alcalina o una proteasa de tipo tripsina. Algunos ejemplos de proteasas alcalinas son las subtilisinas, especialmente las derivadas de *Bacillus*, por ejemplo, subtilisina Novo, subtilisina Carlsberg, subtilisina 309, subtilisina 147 y subtilisina 168 (descritas en WO 89/06279). Algunos ejemplos de proteasas de tipo tripsina son la tripsina (por ejemplo, de origen porcino o bovino) y la proteasa de *Fusarium* descrita en WO 89/06270 y WO 94/25583.

[0200] Algunos ejemplos de proteasas útiles son las variantes descritas en WO 92/19729, WO 98/20115, WO 98/20116, y WO 98/34946, especialmente las variantes con sustituciones en una o más de las siguientes posiciones: 27, 36, 57, 76, 87, 97, 101, 104, 120, 123, 167, 170, 194, 206, 218, 222, 224, 235, y 274.

[0201] Las enzimas proteasas preferidas disponibles comercialmente incluyen Alcalase™, Savinase™, Primase™, Duralase™, Esperase™, y Kannase™ (Novozymes A/S), Maxatase™, Maxacal™, Maxapem™, Properase™, Purafect™, Purafect OxP™, FN2™, y FN3™ (Genencor International Inc.).

[0202] Lipasas y cutinasas: las lipasas y cutinasas adecuadas incluyen las de origen bacteriano o fúngico. Las mutantes químicamente modificadas o modificadas por ingeniería de proteínas están incluidas. Los ejemplos incluyen lipasa de *Thermomyces*, por ejemplo, de *T. Lanuginosus* (anteriormente denominada *Humicola lanuginosa*) como se describe en EP 258 068 y EP 305 216, cutinasa de *Humicola*, por ejemplo *H. Insolens* como se describe en WO 96/13580, una lipasa de *Pseudomonas*, por ejemplo, de *P. alcaligenes* o *P. Pseudoalcaligenes* (EP 218 272), *P. Cepacia* (EP 331 376), *P. Stutzeri* (GB 1,372,034), *P. Fluorescens*, *Pseudomonas* sp. cepa SD 705 (WO 95/06720 y WO 96/27002), *P. Wisconsinensis* (WO 96/12012), una lipasa de *Bacillus*, por ejemplo, de *B. Subtilis* (Dartois et al., 1993, Biochemica et Biophysica Acta, 1131: 253-360), *B. Stearothermophilus* (JP 64/744992) o *B. Pumilus* (WO 91/16422).

[0203] Otros ejemplos son variantes de lipasa tales como las descritas en WO 92/05249, WO 94/01541, EP 407 225, EP 260 105, WO 95/35381, WO 96/00292, WO 95/30744, WO 94/25578, WO 95/14783, WO 95/22615, WO 97/04079, WO 97/07202, WO 00/060063, WO2007/087508 y WO 2009/109500.

[0204] Las enzimas de lipasa preferidas disponibles comercialmente incluyen Lipolase™, Lipolase Ultra™, y Lipex™; Lecitase™, Lipolex™; Lipoclean™, Lipoprime™ (Novozymes A/S). Otras lipasas disponibles comercialmente incluyen Lumafast (Genencor Int Inc); Lipomax (Gist-Brocades/Genencor Int Inc) y lipasa de *Bacillus* sp. de Solvay.

[0205] Amilasas: las amilasas adecuadas (α y/o β) incluyen las de origen bacteriano o fúngico. Las mutantes químicamente modificadas o modificadas por ingeniería de proteínas están incluidas. Las amilasas incluyen, por ejemplo, α -amilasas obtenidas de *Bacillus*, por ejemplo, una cepa especial de *Bacillus licheniformis*, descrita con más detalle en GB 1,296,839.

[0206] Algunos ejemplos de amilasas útiles son las variantes descritas en WO 94/02597, WO 94/18314, WO 96/23873, y WO 97/43424, especialmente las variantes con sustituciones en una o más de las siguientes posiciones: 15, 23, 105, 106, 124, 128, 133, 154, 156, 181, 188, 190, 197, 202, 208, 209, 243, 264, 304, 305, 391, 408, y 444.

[0207] Amilasas disponibles comercialmente son Stainzyme™, Natalase™, Duramyl™, Termamyl™, Fungamyl™ y BAN™ (Novozymes A/S), Rapidase™ y Purastar™ (de Genencor International Inc.).

[0208] Peroxidasas/oxidadas: las peroxidasas/oxidadas adecuadas incluyen las de origen vegetal, bacteriano o fúngico. Las mutantes químicamente modificadas o modificadas por ingeniería de proteínas están incluidas. Los ejemplos de peroxidasas útiles incluyen peroxidasas de *Coprinus*, por ejemplo, de *C. cinereus*, y variantes de las mismas como las descritas en WO 93/24618, WO 95/10602, y WO 98/15257.

[0209] Las peroxidasas disponibles comercialmente incluyen Guardzyme™ (Novozymes A/S).

[0210] La(s) enzima(s) detergente(s) se puede(n) incluir en una composición detergente añadiendo aditivos separados que contienen una o más enzimas, o añadiendo un aditivo combinado que comprenda todas estas enzimas. Un aditivo de detergente de la invención, es decir, un aditivo separado o un aditivo combinado, se puede formular, por ejemplo, como un granulado, líquido, sólido en suspensión, etc. Las formulaciones de aditivos de

detergente preferidas son granulados, en particular granulados no pulverulentos, líquidos, en particular líquidos estabilizados, o sólidos en suspensión.

[0211] Los granulados no pulverulentos se pueden producir, por ejemplo, como se describe en US 4,106,991 y 4,661,452 y opcionalmente pueden estar recubiertos por métodos conocidos en la técnica. Algunos ejemplos de materiales de recubrimiento ceroso son productos de óxido de poli(etileno) (polietilenglicol, PEG) con pesos molares medios de 1000 a 20000; nonilfenoles etoxilados que tienen de 16 a 50 unidades de óxido de etileno; alcoholes grasos etoxilados donde el alcohol contiene de 12 a 20 átomos de carbono y en el cual hay de 15 a 80 unidades de óxido de etileno; alcoholes grasos; ácidos grasos; y mono- y di- y triglicéridos de ácidos grasos. Algunos ejemplos de materiales de recubrimiento que forman películas adecuadas para ser aplicadas mediante técnicas de lecho fluidizado se dan en GB 1483591. Las preparaciones enzimáticas líquidas, por ejemplo, se pueden estabilizar añadiendo un poliol tal como propilenglicol, un azúcar o alcohol de azúcar, ácido láctico o ácido bórico según métodos establecidos. Las enzimas protegidas se pueden preparar según el método descrito en EP 238,216.

15 Materiales complementarios

[0212] También se puede utilizar cualquier componente detergente conocido en la técnica para usar en detergentes para ropa. Otros componentes detergentes opcionales incluyen agentes anticorrosivos, agentes anti encogimiento, agentes anti redepósito de residuos, agentes antiarrugas, bactericidas, ligantes, inhibidores de corrosión, agentes desintegrantes/de desintegración, colorantes, estabilizadores enzimáticos (incluyendo ácido bórico, boratos, CMC, y/o polioles tales como el propilenglicol), acondicionadores de tejidos incluyendo arcillas, productos de relleno/ayuda para el tratamiento, agentes blanqueadores fluorescentes /abrilantadores ópticos, potenciadores de espuma, reguladores de espuma, perfumes, agentes de suspensión de residuos, suavizantes, supresores de espuma, inhibidores de decoloración, y agentes absorbentes, o solos o en combinación. Se puede utilizar cualquier ingrediente conocido en la técnica para usar en detergentes para ropa. La elección de tales ingredientes está dentro de la habilidad del artesano.

[0213] Dispersantes - Las composiciones detergentes de la presente invención también pueden contener dispersantes. En particular, los detergentes en polvo pueden comprender dispersantes. Los materiales orgánicos hidrosolubles adecuados incluyen los ácidos homo- o copoliméricos o sus sales, donde el ácido policarboxílico comprende al menos dos radicales carboxilo separados entre sí por no más de dos átomos de carbono. Unos dispersantes adecuados se describen, por ejemplo, en Powdered Detergents, Surfactant science series volumen 71, Marcel Dekker, Inc.

[0214] Agentes de inhibición de la transferencia de tinte - las composiciones detergentes de la presente invención también pueden incluir uno o más agentes de inhibición de la transferencia de tinte. Los agentes poliméricos inhibidores de la transferencia de tinte adecuados incluyen, pero de forma no limitativa, polímeros de polivinilpirrolidona, polímeros de n-óxido de poliamina, copolímeros de N-vinilpirrolidona y N-vinilimidazola, poliviniloxazolidonas y polivinilimidazolas o mezclas de los mismos. En caso de existir en una composición sujeto de la invención, los agentes de inhibición de la transferencia de tinte puede estar presentes a niveles de aproximadamente 0,0001 % a aproximadamente 10%, de aproximadamente 0,01% a aproximadamente 5% o incluso de aproximadamente 0.1% a aproximadamente 3% en peso de la composición.

[0215] Agente blanqueante fluorescente - las composiciones detergentes de la presente invención preferiblemente también contendrán componentes adicionales que pueden teñir los artículos que se están limpiando, tales como agente blanqueantes fluorescentes o blanqueadores ópticos. Cuando está presente, el abrilantador está preferiblemente a un nivel del aproximadamente 0,01% a aproximadamente 0,5%. Cualquier agente blanqueante fluorescente adecuado para usar en una composición detergente para ropa se puede utilizar en la composición de la presente invención. Los agentes blanqueantes fluorescentes usados con más frecuencia son los que pertenecen a las clases de derivados de ácido diaminoestilbeno-sulfónico, derivados de diarilpirazolina y derivados de bisfenilo-distirilo. Los ejemplos de agentes blanqueantes fluorescentes del tipo derivado de ácido diaminoestilbeno-sulfónico incluyen las sales de sodio de: 4,4'-bis-(2-dietanolamino-4-anilino-s-triazina-6-ilamino) estilbeno-2,2'-disulfonato 4,4'-bis-(2,4-dianilino-s-triazina-6-ilamino) estilbeno-2,2'-disulfonato 4,4'-bis-(2-anilino-4-(N-metil-N-2-hidroxi-etilamino)-s-triazina-6-ilamino) estilbeno-2,2'-disulfonato, 4,4'-bis-(4-fenil-2,1,3-triazol-2-il)estilbeno-2,2'-disulfonato 4,4'-bis-(2-anilino-4(1-metil-2-hidroxi-etilamino)-s-triazina-6-ilamino) estilbeno-2,2'-disulfonato y 5-(2H-naftol[1,2-d][1,2,3]triazol-2-il)-2-[(E)-2-fenilvinil]benzenosulfonato de sodio. Los agentes blanqueantes fluorescentes preferidos son Tinopal DMS y Tinopal CBS disponible de Ciba-Geigy AG, Basilea, Suiza. Tinopal DMS es la sal disódica de disulfonato de 4,4'-bis-(2-morfolino-4-anilino-s-triazina-6-ilamino) estilbeno. Tinopal CBS es la sal disódica de 2,2'-bis-(fenil-estiril)-disulfonato. También es un agente blanqueante fluorescente preferido el disponible comercialmente Parawhite KX, suministrado por Paramount Minerals and Chemicals, Mumbai, India. Otro fluorantes adecuados para usar en la invención incluyen las 1-3-diaril pirazolininas y las 7-alquilaminocumarinas.

[0216] Los niveles de abrilantador fluorescente adecuados incluyen niveles inferiores de aproximadamente 0,01, de 0,05, de aproximadamente 0,1 o incluso de aproximadamente 0,2 % en peso hasta niveles superiores de 0,5 o incluso 0,75 % en peso.

[0217] Polímeros de liberación de residuos - las composiciones detergentes de la presente invención también pueden incluir uno o más polímeros de liberación de residuos que ayudan a la eliminación de residuos de tejidos tales como algodón y tejidos a base de poliéster, en particular la eliminación de residuos hidrofóbicos de tejidos a base de poliéster. Los polímeros de liberación de residuos pueden ser, por ejemplo, polímeros no iónicos o aniónicos a base de tereftalato, polivinil caprolactama y copolímeros relativos, copolímeros de injerto de vinilo, poliamidas de poliéster, véase, por ejemplo, el capítulo 7 de Powdered Detergents, Surfactant science series volumen 71, Marcel Dekker, Inc.

Otro tipo de polímeros de liberación de residuos son los polímeros anfífilos alcoxilados de limpieza de grasa que comprenden una estructura de núcleo y una pluralidad de grupos alcoxilato fijados a esa estructura de núcleo.

La estructura de núcleo puede comprender una estructura de polialquilenimina o una estructura de polialcanolamina como se describe en detalle en WO 2009/087523. Además, los copolímeros injertados aleatorios son copolímeros de liberación de residuos adecuados. Los copolímeros injertados adecuados se describen con más detalle en WO 2007/138054, WO 2006/108856 y WO 2006/113314. Otros polímeros de liberación de residuos son estructuras de polisacáridos sustituidas, especialmente estructuras celulósicas sustituidas tales como los derivados de celulosa modificada tales como los descritos en EP 1867808 o WO 2003/040279 (ambas se incorporan a la presente por referencia). Los polímeros celulósicos adecuados incluyen celulosa, éteres de celulosa, ésteres de celulosa, amidas de celulosa y mezclas de los mismos.

[0218] Los polímeros celulósicos adecuados incluyen celulosa modificada aniónicamente, celulosa modificada no iónicamente, celulosa modificada catiónicamente, celulosa modificada zwitteriónica y mezclas de las mismas. Los polímeros celulósicos adecuados incluyen metilcelulosa, carboximetilcelulosa, etilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, éster carboximetilcelulosa y mezclas de las mismas.

[0219] Agentes anti-redepósito - las composiciones detergentes de la presente invención también pueden incluir uno o más agentes anti-redepósito tales como carboximetilcelulosa (CMC), alcohol polivinílico (PVA), polivinilpirrolidona (PVP), polioxietileno y/o polietilenglicol (PEG), homopolímeros de ácido acrílico, copolímeros de ácido acrílico y ácido maleico y polietilenoiminas etoxiladas. Los polímeros a base de celulosa descritos como polímeros de liberación de residuos también pueden funcionar como agentes anti-redepósito.

[0220] Otros materiales complementarios adecuados incluyen, pero de forma no limitativa, agentes anti encogimiento, agentes antiarrugas, bactericidas, ligantes, portadores, colorantes, estabilizadores enzimáticos, suavizantes, productos de relleno, reguladores de espuma, hidrótrofos, perfumes, pigmentos, supresores de hierba, solventes, estructurantes para detergentes líquidos y/o agentes de elastización de estructura.

Formulación de productos detergentes

[0221] La composición detergente de la invención puede ser en cualquier forma conveniente, por ejemplo, una pastilla, un comprimido homogéneo, un comprimido con dos o más capas, un polvo regular o compacto, un gránulo, una pasta, un gel, o un líquido normal, compacto o concentrado.

[0222] Formas de formulación de detergente: capas (mismas o diferentes fases), saquitos, frente a forma para unidad de dosificación a máquina.

[0223] Los saquitos se pueden configurar como mono o multicompartimento. Pueden ser de cualquier manera, forma y material que sea adecuado para contener la composición, por ejemplo sin permitir la liberación de la composición del saquito antes del contacto con el agua. El saquito está hecho de película soluble en agua que encierra un volumen interno. Dicho volumen interno se puede dividir en compartimentos del saquito. Las películas preferidas son materiales poliméricos, preferiblemente polímeros que se han formado en una película u hoja. Los polímeros, copolímeros o derivados de los mismos preferidos son poliácridatos seleccionados, y copolímeros de acrilato soluble en agua, metilcelulosa, carboximetilcelulosa, sodio dextrina, etilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, maltodextrina, polimetacrilato, de la forma más preferible copolímeros de alcohol polivinílico e hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC). Preferiblemente el nivel de polímero en la película, por ejemplo PVA, es de al menos aproximadamente 60%. El peso molecular medio preferido será típicamente de aproximadamente 20000 a aproximadamente 150000. Las películas también pueden ser de composiciones mixtas que comprenden mezclas de polímeros degradables hidrolíticamente y solubles en agua, tales como la polilactida y el alcohol polivinílico (conocido con la referencia comercial M8630 y vendido por MonoSol LLC, Indiana, EE.UU.) más plastificantes como glicerol, etilen glicerol, propilenglicol, sorbitol y mezclas de los mismos. Los saquitos pueden comprender una composición sólida de limpieza de ropa o componentes de parte sólidos y/o una composición líquida de limpieza o componentes de parte líquidos separados por la película soluble en agua. El compartimento para componentes líquidos puede ser diferente en su composición que los compartimentos que contienen sólidos. Ref: (US2009/0011970 A1)

[0224] Los ingredientes detergentes se pueden separar físicamente entre sí por compartimentos en saquitos solubles en agua o en capas diferentes de comprimidos. De este modo, se puede evitar la interacción negativa entre componentes durante el almacenamiento. Los perfiles de disolución diferentes de cada uno de los compartimentos también puede dar lugar a la disolución retardada de componentes seleccionados en la solución de

lavado.

Definición/características de las formas:

[0225] Un detergente líquido o en gel, que no está dosificado por unidad, puede ser acuoso, típicamente con al menos un 20% en peso y hasta un 95% de agua, tal como hasta aproximadamente 70% de agua, hasta aproximadamente 65% de agua, hasta aproximadamente 55% de agua, hasta aproximadamente 45% de agua, hasta aproximadamente 35% de agua. Otros tipos de líquidos, incluyendo, sin limitación, alcanoles, aminas, dioles, éteres y polioles, se pueden incluir en un líquido o gel acuoso. Un detergente líquido o en gel acuoso puede

[0226] Un detergente líquido o en gel puede ser no acuoso.

Pastillas de jabón para ropa

[0227] Las enzimas de la invención se pueden añadir a pastillas de jabón para ropa y se pueden usar para lavar ropa, tejidos y/o textiles a mano. El término pastilla de jabón para ropa incluye pastillas de jabón para ropa, pastillas de jabón, pastillas combinadas, pastillas de detergente sintéticas y pastillas detergentes. Los tipos de pastilla normalmente difieren en el tipo de tensioactivo que contienen, y el término pastillas de jabón para ropa incluye aquellas que contienen jabones de ácidos grasos y/o jabones sintéticos. La pastilla de jabón para ropa tiene una forma física que es sólida y no líquida, gel o polvo a temperatura ambiente. El término sólido se define como una forma física que no cambia significativamente a lo largo del tiempo, es decir, si un objeto sólido (por ejemplo, una pastilla de jabón para ropa) se coloca dentro de un contenedor, el objeto sólido no cambia para llenar el contenedor en el que es colocado. La pastilla es un sólido típicamente en forma de pastilla, pero puede estar en otras formas sólidas tales como redonda u ovalada.

[0228] La pastilla de jabón para lavar ropa puede contener una o más enzimas adicionales, inhibidores de proteasa tales como péptido aldehídos (o aducto de hidrosulfito o aducto hemiacetal), ácido bórico, borato, bórax y/o derivados de ácido fenilborónico tales como el ácido 4-formilfenilborónico, uno o más jabones o tensioactivos sintéticos, polioles tales como la glicerina, compuestos de control de pH tales como ácidos grasos, ácido cítrico, ácido acético y/o ácido fórmico, y/o una sal de un catión monovalente y un anión orgánico donde el catión monovalente puede ser, por ejemplo, Na^+ , K^+ o NH_4^+ y el anión orgánico puede ser, por ejemplo, formiato, acetato, citrato o lactato de manera que la sal de un catión monovalente y un anión orgánico puede ser, por ejemplo, formiato de sodio.

[0229] La pastilla de jabón para ropa también puede contener agentes complejantes como EDTA y HEDP, perfumes y/o tipos diferentes de productos de relleno, tensioactivos, por ejemplo tensioactivos sintéticos aniónicos, constructores, agentes de liberación de residuos poliméricos, queladores detergentes, agentes estabilizantes, productos de relleno, colorantes, colorantes, inhibidores de transferencia de tinte, policarbonatos alcoxilados, supresores de espuma, estructurantes, ligantes, agentes de lixiviación, activadores de blanqueo, agentes de eliminación de residuos arcillosos, agentes anti redepósito, agentes de dispersión poliméricos, abrillantadores, suavizantes, perfumes y/o otros compuestos conocidos en la técnica.

[0230] La pastilla de jabón para ropa se puede procesar en maquinaria convencional de fabricación de pastillas de jabón para ropa, tal como, pero sin limitarse a: mezcladores, extrusoras para jabón, por ejemplo un extrusor para jabón de vacío de dos fases, extrusoras, cortadores, estampadores de logos, túneles de enfriamiento y envasadoras. La invención no está limitada a la preparación de las pastillas de jabón para ropa por ningún método único. La premezcla de la invención se puede añadir al jabón en diferentes etapas del proceso. Por ejemplo, se puede preparar la premezcla que contiene un jabón, una enzima, opcionalmente una o más enzimas adicionales, un inhibidor de proteasa, y una sal de un catión monovalente y un anión orgánico y luego se extruye la mezcla. La enzima y las enzimas adicionales opcionales se pueden añadir a la vez que el inhibidor de proteasa, por ejemplo en forma líquida.

Además de la etapa de mezcla y la etapa de extruido, el proceso puede comprender además las etapas del fresado, extrusión, corte, estampado, enfriamiento y/o envasado.

Formulaciones detergentes granulosas

[0231] Un detergente granuloso se puede formular como se describe en WO09/092699, EP1705241, EP1382668, WO07/001262, US6472364, WO04/074419 o WO09/102854. Otras formulaciones detergentes útiles se describen en WO09/124162, WO09/124163, WO09/117340, WO09/117341, WO09/117342, WO09/072069, WO09/063355, WO09/132870, WO09/121757, WO09/112296, WO09/112298, WO09/103822, WO09/087033, WO09/050026, WO09/047125, WO09/047126, WO09/047127, WO09/047128, WO09/021784, WO09/010375, WO09/000605, WO09/122125, WO09/095645, WO09/040544, WO09/040545, WO09/024780, WO09/004295, WO09/004294, WO09/121725, WO09/115391, WO09/115392, WO09/074398, WO09/074403, WO09/068501, WO09/065770, WO09/021813, WO09/030632, y WO09/015951. WO2011025615, WO2011016958, WO2011005803, WO2011005623, WO2011005730, WO2011005844,

WO2011005904, WO2011005630, WO2011005830, WO2011005912, WO2011005905, WO2011005910,
 WO2011005813, WO2010135238, WO2010120863, WO2010108002, WO2010111365, WO2010108000,
 WO2010107635, WO2010090915, WO2010033976, WO2010033746, WO2010033747, WO2010033897,
 WO2010033979, WO2010030540, WO2010030541, WO2010030539, WO2010024467, WO2010024469,
 5 WO2010024470, WO2010025161, WO2010014395, WO2010044905, WO2010145887, WO2010142503,
 WO2010122051, WO2010102861, WO2010099997, WO2010084039, WO2010076292, WO2010069742,
 WO2010069718, WO2010069957, WO2010057784, WO2010054986, WO2010018043, WO2010003783,
 WO2010003792, WO2011023716, WO2010142539, WO2010118959, WO2010115813, WO2010105942,
 WO2010105961, WO2010105962, WO2010094356, WO2010084203, WO2010078979, WO2010072456,
 10 WO2010069905, WO2010076165, WO2010072603, WO2010066486, WO2010066631, WO2010066632,
 WO2010063689, WO2010060821, WO2010049187, WO2010031607, WO2010000636,

Usos

15 [0232] La presente invención también está dirigida a métodos para utilizar la proteasa según la invención o composiciones de la misma en el lavado de textiles y tejidos, como el lavado de la colada doméstica y la lavandería industrial, así como para pienso para animales.

20 [0233] La invención también está dirigida a métodos para utilizar las composiciones de la misma en la limpieza de superficies duras, como en el lavado de vajilla automático (ADW), el lavado de vehículos y la limpieza de superficies industriales. Por lo tanto, en una forma de realización, la presente invención se refiere al uso en la limpieza de ropa o vajilla de una proteasa según la invención o una composición detergente que comprende una proteasa según la presente invención que tiene una identidad de secuencia con el polipéptido maduro de esta forma de realización. La presente invención se refiere al uso de un polipéptido aislado que tiene una identidad de secuencia con el
 25 polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2 de al menos 85%, que tiene actividad de proteasa en un detergente, un proceso de limpieza y/o proceso de lavado de ropa, donde el polipéptido maduro corresponde a los aminoácidos 189 a 374 de la SEQ ID NO: 2.

30 [0234] Uso en detergentes. Los polipéptidos de la presente invención se pueden añadir y, de este modo, convertirse en un componente de una composición detergente.

[0235] La composición detergente de la presente invención puede ser formulada, por ejemplo, como una composición detergente para el lavado de ropa a mano o a máquina que incluye una composición de aditivo de lavado de ropa adecuada para el pretratamiento de tejidos manchados y una composición suavizante con enjuague
 35 añadido, o puede ser formulada como una composición detergente para usar en operaciones de limpieza generales de superficies duras en hogares, o puede ser formulada para operaciones de lavado de vajilla a mano o a máquina.

[0236] En un aspecto específico, la presente invención proporciona un aditivo de detergente que comprende un polipéptido de la presente invención como se describe en este caso.

40 Uso de proteasas de la invención en detergentes

[0237] Los residuos y las manchas que son importantes para los formuladores de detergentes están compuestos por muchas sustancias diferentes, y una variedad de diferentes enzimas, todas ellas con especificidades de sustrato diferentes, ha sido desarrollada para usar en detergentes tanto para el lavado de ropa como para la limpieza de superficies duras, tal como el lavado de vajilla. Se considera que estas enzimas proporcionan un beneficio de detergencia enzimática, ya que mejoran específicamente la eliminación de manchas en el proceso de limpieza en el que se aplican en comparación con el mismo proceso sin enzimas. Las enzimas eliminadoras de manchas que se conocen en la técnica incluyen enzimas tales como carbohidrasas, amilasas, proteasas, lipasas, celulasas,
 50 hemicelulasas, xilanasas, cutinasas, y pectinasas.

[0238] En un aspecto, la presente invención concierne el uso de un polipéptido aislado que tiene una identidad de secuencia con el polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2 de al menos 85%, en composiciones detergentes y procesos de limpieza, tal como el lavado de ropa y la limpieza de superficies duras, donde el polipéptido maduro corresponde a los aminoácidos 189 a 374 de la SEQ ID NO: 2. Así, en un aspecto, la presente invención demuestra el efecto de detergencia de una variedad de proteasas ejemplares de la invención en varias manchas y bajo varias condiciones. En un aspecto particular de la invención, la composición detergente y el uso en el proceso de limpieza concierne el uso de una proteasa de la invención junto con al menos una de las enzimas eliminadoras de manchas anteriormente mencionadas.

60 [0239] En un aspecto preferido de la presente invención, la proteasa de la invención útil según la invención se puede combinar con al menos dos enzimas. Estas enzimas adicionales se describen con detalle en la sección "otras enzimas", más preferiblemente al menos tres, cuatro o cinco enzimas. Preferiblemente, la enzimas tienen una especificidad de sustrato diferente, por ejemplo, actividad carbolítica, actividad proteolítica, actividad amilolítica, actividad lipolítica, actividad semicelulítica o actividad pectolítica. La combinación enzimática puede ser, por ejemplo, una proteasa de la invención con otra enzima eliminadora de manchas, por ejemplo una proteasa de la invención y
 65

una amilasa, una proteasa de la invención y una celulasa, una proteasa de la invención y una hemicelulasa, una proteasa de la invención y una lipasa, una proteasa de la invención y una cutinasa, una proteasa de la invención y una pectinasa o una proteasa de la invención y una enzima anti redepósito. Más preferiblemente, la proteasa de la invención se combina con al menos otras dos enzimas eliminadoras de manchas, por ejemplo, una proteasa de la invención, una lipasa y una amilasa; o una proteasa de la invención, una amilasa y una pectinasa; o una proteasa de la invención, una amilasa y una cutinasa; o una proteasa de la invención, una amilasa y una celulasa; o una proteasa de la invención, una amilasa y una hemicelulasa; o una proteasa de la invención, una lipasa y una pectinasa; o una proteasa de la invención, una lipasa y una cutinasa; o una proteasa de la invención, una lipasa y una celulasa; o una proteasa de la invención, una lipasa y una hemicelulasa. Aún más preferiblemente, una proteasa de la invención se puede combinar con al menos tres otras enzimas eliminadoras de manchas, por ejemplo, una proteasa de la invención, una amilasa, una lipasa y una pectinasa; o una proteasa de la invención, una amilasa, una lipasa y una cutinasa; o una proteasa de la invención, una amilasa, una lipasa y una celulasa; o una proteasa de la invención, una amilasa, una lipasa y una hemicelulasa. Una proteasa de la invención se puede combinar con cualquiera de las enzimas seleccionadas de la lista no exhaustiva que comprende: carbohidrasas, tal como una amilasa, una hemicelulasa, una pectinasa, una celulasa, una xantanasa o una pululanasa, una peptidasa, otras proteasas o una lipasa.

[0240] En otra forma de realización de la presente invención, una proteasa de la invención se puede combinar con una o más metaloproteasas, tal como una metaloproteasa M4, incluyendo Neutrase™ o termolisina. Tales combinaciones pueden comprender además combinaciones de las otras enzimas detergentes como se ha descrito anteriormente.

[0241] El proceso de limpieza o el proceso de cuidado de un textil puede ser, por ejemplo, un proceso de lavado de ropa, un proceso de lavado de vajilla o limpieza de superficies duras tales como azulejos de cuarto de baño, suelos, tableros de mesa, desagües, fregaderos y lavabos. Los procesos de lavado de ropa pueden ser, por ejemplo, lavados de colada doméstica o también pueden ser de lavandería industrial. Además, la invención se refiere a un procedimiento para el lavado de tejidos y/o prendas donde el proceso comprende el tratamiento de los tejidos con una solución de lavado con una composición detergente, y al menos una proteasa de la invención. El proceso de limpieza o un proceso de cuidado de textiles puede efectuarse, por ejemplo, en un proceso de lavado a máquina o en un proceso de lavado a mano. La solución de lavado puede ser, por ejemplo, una solución de lavado acuoso con una composición detergente.

[0242] Los tejidos y/o prendas sometidos a un proceso de lavado, limpieza o de cuidado textil de la presente invención puede ser ropa convencional lavable, por ejemplo ropa doméstica. Preferiblemente, la parte principal de la ropa es prendas y tejidos, incluyendo de punto, tejidos, telas vaqueras, no tejidos, fieltros, hilados, y tejidos rizados. El tejido puede ser basado en celulosa, como por ejemplo tejidos celulósicos naturales, incluyendo algodón, lino, yute, ramio, sisal o bonote o celulósicos artificiales (por ejemplo originados de pulpa de madera) incluyendo viscosa/rayón, ramio, fibras de acetato de celulosa (tricell), lyocell o mezclas de los mismos. El textil o tejido también puede ser no basado en celulosa, como por ejemplo poliamidas naturales incluyendo lana, camello, cachemir, mohair, conejo y seda o poliméricos sintéticos tales como nylon, aramida, poliéster, acrílicos, polipropileno y spandex/elastano, o mezclas de los mismos, así como mezclas de fibras en celulosa y no basadas en celulosa. Ejemplos de mezclas son las mezclas de algodón y/o rayón/viscosa con uno o más materiales acompañantes tales como lana, fibras sintéticas (por ejemplo fibras de poliamida, fibras acrílicas, fibras de poliéster, fibras de alcohol polivinílico, fibras de cloruro de polivinilo, fibras de poliuretano, fibras de poliurea, fibras de aramida), y fibras que contienen celulosa (por ejemplo rayón/viscosa, ramio, lino, yute, fibras de acetato de celulosa, lyocell).

[0243] En los últimos años ha habido un creciente interés en la sustitución de componentes en detergentes que derivan de los petroquímicos con componentes biológicos renovables tales como enzimas y polipéptidos sin comprometer el rendimiento de lavado. Cuando los componentes de composiciones detergentes cambian nuevas actividades enzimáticas o nuevas enzimas que tienen propiedades alternativas y/o mejoradas en comparación con las enzimas detergentes comunes usadas, tales como proteasas, lipasas y amilasas, es necesario conseguir un rendimiento de lavado similar o mejorado en comparación con las composiciones detergentes tradicionales.

[0244] La invención también concierne el uso de proteasas de la invención en un proceso de eliminación de manchas proteináceas. Las manchas proteináceas pueden ser manchas tales como manchas de comida, por ejemplo de comida de bebé, sebo, cacao, huevo, sangre, leche, tinta, césped o una combinación de los mismos.

[0245] Las composiciones detergentes típicas incluyen varios componentes además de las enzimas, estos componentes tienen efectos diferentes, algunos componentes como los tensioactivos bajan la tensión superficial del detergente, lo que permite extraer y dispersar la mancha que se está limpiando y luego lavarla hasta hacerla desaparecer, otros componentes como sistemas de blanqueo eliminan la decoloración frecuentemente por oxidación y muchos blanqueantes también tienen propiedades bactericidas fuertes, y se usan para la desinfección y esterilización. Otros componentes más, como los constructores y queladores, suavizan por ejemplo el agua de lavado eliminando los iones metálicos del líquido.

[0246] En una forma de realización particular, la invención concierne el uso de una composición que comprende una

proteasa de la invención, donde dicha composición enzimática comprende además al menos uno o más de los siguientes: un tensioactivo, un constructor, un quelador o agente quelante, sistema blanqueador o componente blanqueador en el lavado de ropa o de vajilla.

[0247] En una forma de realización preferida de la invención, la cantidad de un tensioactivo, un constructor, un quelador o agente quelante, sistema blanqueador y/o componente blanqueador es reducida en comparación con la cantidad de tensioactivo, constructor, quelador o agente quelante, sistema blanqueador y/o componente blanqueador usado sin la proteasa añadida de la invención. Preferiblemente al menos un componente que es un tensioactivo, un constructor, un quelador o agente quelante, un sistema blanqueador y/o un componente blanqueador está presente en una cantidad que es 1% menos, tal como 2% menos, tal como 3% menos, tal como 4% menos, tal como 5% menos, tal como 6% menos, tal como 7% menos, tal como 8% menos, tal como 9% menos, tal como 10% menos, tal como 15% menos, tal como 20% menos, tal como 25% menos, tal como 30% menos, tal como 35% menos, tal como 40% menos, tal como 45% menos, tal como 50% menos de la cantidad del componente en el sistema sin la adición de la proteasa de la invención, tal como una cantidad convencional de tal componente. En un aspecto, la proteasa de la invención se usa en composiciones detergentes donde dicha composición está libre de al menos un componente que es un tensioactivo, un constructor, un quelador o agente quelante, un sistema blanqueador o un componente blanqueador y/o un polímero.

Método de lavado

[0248] Las composiciones detergentes de la presente invención son idealmente adecuadas para usar en aplicaciones de lavandería. Por consiguiente, la presente invención incluye un método para el lavado de un tejido. El método comprende los pasos de poner en contacto un tejido que se ha de lavar con una solución de lavado de ropa que comprende la composición detergente según la invención. El tejido puede comprender cualquier tejido capaz de ser lavado en condiciones de uso normales por un consumidor. La solución tiene preferiblemente un pH de aproximadamente 5.5 a aproximadamente 9. Las composiciones se pueden emplear a concentraciones de aproximadamente 100 ppm, preferiblemente de 500 ppm a aproximadamente 15,000 ppm en solución. Las temperaturas del agua típicamente varían de aproximadamente 5°C a aproximadamente 90°C, incluyendo aproximadamente 10°C, aproximadamente 15°C, aproximadamente 20°C, aproximadamente 25°C, aproximadamente 30°C, aproximadamente 35°C, aproximadamente 40°C, aproximadamente 45°C, aproximadamente 50°C, aproximadamente 55°C, aproximadamente 60°C, aproximadamente 65°C, aproximadamente 70°C, aproximadamente 75°C, aproximadamente 80°C, aproximadamente 85°C y aproximadamente 90°C. La proporción de agua a tejido es típicamente de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 30:1.

[0249] En formas de realización particulares, el método de lavado se lleva a cabo a un pH de aproximadamente 5.0 a aproximadamente 11.5 o, en formas de realización alternativas, incluso de aproximadamente 6 a aproximadamente 10.5, tal como aproximadamente 5 a aproximadamente 11, aproximadamente 5 a aproximadamente 10, aproximadamente 5 a aproximadamente 9, aproximadamente 5 a aproximadamente 8, aproximadamente 5 a aproximadamente 7, aproximadamente 5.5 a aproximadamente 11, aproximadamente 5.5 a aproximadamente 10, aproximadamente 5.5 a aproximadamente 9, aproximadamente 5.5 a aproximadamente 8, aproximadamente 5.5 a aproximadamente 7, aproximadamente 6 a aproximadamente 11, aproximadamente 6 a aproximadamente 10, aproximadamente 6 a aproximadamente 9, aproximadamente 6 a aproximadamente 8, aproximadamente 6 a aproximadamente 7, aproximadamente 6.5 a aproximadamente 11, aproximadamente 6.5 a aproximadamente 10, aproximadamente 6.5 a aproximadamente 9, aproximadamente 6.5 a aproximadamente 8, aproximadamente 6.5 a aproximadamente 7, aproximadamente 7 a aproximadamente 11, aproximadamente 7 a aproximadamente 10, aproximadamente 7 a aproximadamente 9, o aproximadamente 7 a aproximadamente 8, preferiblemente aproximadamente 5.5 a aproximadamente 9, y más preferiblemente aproximadamente 6 a aproximadamente 8.

[0250] En formas de realización particulares, el método de lavado se lleva a cabo a un grado de dureza de aproximadamente de 0°dH a aproximadamente 30°dH, tal como aproximadamente 1°dH, aproximadamente 2°dH, aproximadamente 3°dH, aproximadamente 4°dH, aproximadamente 5°dH, aproximadamente 6°dH, aproximadamente 7°dH, aproximadamente 8°dH, aproximadamente 9°dH, aproximadamente 10°dH, aproximadamente 11°dH, aproximadamente 12°dH, aproximadamente 13°dH, aproximadamente 14°dH, aproximadamente 15°dH, aproximadamente 16°dH, aproximadamente 17°dH, aproximadamente 18°dH, aproximadamente 19°dH, aproximadamente 20°dH, aproximadamente 21°dH, aproximadamente 22°dH, aproximadamente 23°dH, aproximadamente 24°dH, aproximadamente 25°dH, aproximadamente 26°dH, aproximadamente 27°dH, aproximadamente 28°dH, aproximadamente 29°dH, aproximadamente 30°dH. En condiciones de lavado típicas en Europa, el grado de dureza es aproximadamente de 15°dH, en condiciones de lavado típicas en EE.UU. aproximadamente de 6°dH, y en condiciones de lavado típicas en Asia de aproximadamente de 3°dH.

[0251] La presente invención se refiere a un método de limpieza de un tejido, una vajilla o superficie dura con una composición detergente que comprende una proteasa de la invención.

[0252] Una forma de realización preferida concierne un método de limpieza, donde dicho método incluye las etapas de: poner en contacto un objeto con una composición de limpieza que comprende una proteasa de la invención bajo condiciones adecuadas para limpiar dicho objeto. En una forma de realización preferida, la composición de limpieza es una composición detergente y el proceso es un proceso de lavado de ropa o de vajilla.

[0253] Otra forma de realización más se refiere a un método para eliminar manchas de tejidos que comprende poner en contacto dicho tejido con una composición que comprende una proteasa de la invención bajo condiciones adecuadas para la limpieza de dicho objeto.

[0254] En una forma de realización preferida, las composiciones para usar en los métodos anteriores comprende además al menos una enzima adicional como ya se ha expuesto en la sección "otras enzimas", tal como una enzima seleccionada del grupo consistente en carbohidrasas, peptidasas, proteasas, lipasas, celulasa, xilanasas o cutinasas o una combinación de estas. En otra forma de realización preferida, las composiciones comprenden una cantidad reducida de al menos uno o varios de los siguientes componentes: un tensioactivo, un constructor, un quelador o agente quelante, un sistema blanqueador o un componente blanqueador o un polímero.

[0255] También se contemplan composiciones y métodos de tratamiento de tejidos (por ejemplo, para desaprestar un textil) usando una o más de la proteasa de la invención. La proteasa se puede usar en cualquier método de tratamiento de tejidos que sea conocido en la técnica (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. nº 6,077,316).

Por ejemplo, en un aspecto, el tacto y la apariencia de un tejido se mejora mediante un método que comprende poner en contacto el tejido con una proteasa en una solución. En un aspecto, el tejido se trata con la solución bajo presión.

[0256] En una forma de realización, la proteasa se aplica durante o después de la tejedura los textiles, o durante la fase de desaprestado, o uno o más pasos de tratamiento de tejidos adicionales. Durante la tejedura de los textiles, los hilos están expuestos a un estrés mecánico considerable. Antes de la tejedura en telares mecánicos, los hilos de urdimbre frecuentemente se recubren con almidón o derivados de almidón de apresto para aumentar su resistencia a la tracción y para evitar roturas. La proteasa se puede aplicar para eliminar esta proteína o derivados de proteína de desaprestado. Después de que los textiles se hayan tejido, un tejido puede proceder a una fase de desencolado.

Esto puede ir seguido de uno o más pasos adicionales de tratamiento del tejido. El desaprestado es el acto de eliminar el apresto de los tejidos. Después de la tejedura, el recubrimiento de apresto debería eliminarse antes de seguir tratando el tejido para asegurar un resultado homogéneo y a prueba de lavado. También se proporciona un método de desaprestado que comprende la hidrólisis enzimática del apresto mediante la acción de una enzima.

Usos a baja temperatura

[0257] Una forma de realización de la invención concierne un método para llevar a cabo un lavado de ropa, un lavado de vajilla o limpieza industrial que comprende poner en contacto una superficie que se ha de limpiar con una proteasa de la invención, y donde dicho lavado de ropa, lavado de vajilla o limpieza industrial o institucional se realiza a una temperatura de aproximadamente 40°C o inferior. Una forma de realización de la invención se refiere al uso de una proteasa de la invención en procesos de lavado de ropa, de lavado de vajilla o de limpieza donde la temperatura en el lavado de ropa, lavado de vajilla o limpieza industrial es de aproximadamente 40°C o inferior.

[0258] En otra forma de realización, la invención concierne el uso de una proteasa de la invención en un proceso de eliminación de proteínas, donde la temperatura en el proceso de eliminación de proteínas es aproximadamente de 40°C o inferior.

[0259] La presente divulgación también se refiere al uso en un proceso de lavado de ropa, lavado de vajilla o limpieza industrial de una proteasa de la divulgación que tiene al menos una propiedad mejorada en comparación con Savinase (SEQ ID NO 6) y donde la temperatura en el proceso de lavado de ropa, lavado de vajilla o limpieza se realiza a una temperatura de aproximadamente 40°C o inferior.

[0260] En cada uno de los métodos y usos identificados anteriormente, la temperatura de lavado es de aproximadamente 40°C o inferior, tal como aproximadamente 39°C o inferior, tal como aproximadamente 38°C o inferior, tal como aproximadamente 37°C o inferior, tal como aproximadamente 36°C o inferior, tal como aproximadamente 35°C o inferior, tal como aproximadamente 34°C o inferior, tal como aproximadamente 33°C o inferior, tal como aproximadamente 32°C o inferior, tal como aproximadamente 31°C o inferior, tal como aproximadamente 30°C o inferior, tal como aproximadamente 29°C o inferior, tal como aproximadamente 28°C o inferior, tal como aproximadamente 27°C o inferior, tal como aproximadamente 26°C o inferior, tal como aproximadamente 25°C o inferior, tal como aproximadamente 24°C o inferior, tal como aproximadamente 23°C o inferior, tal como aproximadamente 22°C o inferior, tal como aproximadamente 21°C o inferior, tal como aproximadamente 20°C o inferior, tal como aproximadamente 19°C o inferior, tal como aproximadamente 18°C o inferior, tal como aproximadamente 17°C o inferior, tal como aproximadamente 16°C o inferior, tal como aproximadamente 15°C o inferior, tal como aproximadamente 14°C o inferior, tal como aproximadamente 13°C o inferior, tal como aproximadamente 12°C o inferior, tal como aproximadamente 11°C o inferior, tal como aproximadamente 10°C o inferior, tal como aproximadamente 9°C o inferior, tal como aproximadamente 8°C o inferior.

inferior, tal como aproximadamente 7°C o inferior, tal como aproximadamente 6°C o inferior, tal como aproximadamente 5°C o inferior, tal como aproximadamente 4°C o inferior, tal como aproximadamente 3°C o inferior, tal como aproximadamente 2°C o inferior, tal como aproximadamente 1°C o inferior.

[0261] En otra forma de realización preferida, la temperatura de lavado varía entre aproximadamente 5-40°C, tal como aproximadamente 5-30°C, aproximadamente 5-20°C, aproximadamente 5-10°C, aproximadamente 10-40°C, aproximadamente 10-30°C, aproximadamente 10-20°C, aproximadamente 15-40°C, aproximadamente 15-30°C, aproximadamente 15-20°C, aproximadamente 20-40°C, aproximadamente 20-30°C, aproximadamente 25-40°C, aproximadamente 25-30°C, o aproximadamente 30-40°C. En una forma de realización preferida particular, la temperatura de lavado es de aproximadamente 30°C.

[0262] En formas de realización particulares, el método de lavado a baja temperatura se lleva a cabo a un pH de aproximadamente 5.0 a aproximadamente 11.5 o, en formas de realización alternativas, incluso de aproximadamente 6 a aproximadamente 10.5, tal como aproximadamente 5 a aproximadamente 11, aproximadamente 5 a aproximadamente 10, aproximadamente 5 a aproximadamente 9, aproximadamente 5 a aproximadamente 8, aproximadamente 5 a aproximadamente 7, aproximadamente 5.5 a aproximadamente 11, aproximadamente 5.5 a aproximadamente 10, aproximadamente 5.5 a aproximadamente 9, aproximadamente 5.5 a aproximadamente 8, aproximadamente 5.5 a aproximadamente 7, aproximadamente 6 a aproximadamente 11, aproximadamente 6 a aproximadamente 10, aproximadamente 6 a aproximadamente 9, aproximadamente 6 a aproximadamente 8, aproximadamente 6 a aproximadamente 7, aproximadamente 6.5 a aproximadamente 11, aproximadamente 6.5 a aproximadamente 10, aproximadamente 6.5 a aproximadamente 9, aproximadamente 6.5 a aproximadamente 8, aproximadamente 6.5 a aproximadamente 7, aproximadamente 7 a aproximadamente 11, aproximadamente 7 a aproximadamente 10, aproximadamente 7 a aproximadamente 9, o aproximadamente 7 a aproximadamente 8, preferiblemente aproximadamente 5.5 a aproximadamente 9, y más preferiblemente aproximadamente 6 a aproximadamente 9.

[0263] En formas de realización particulares, el método de lavado a baja temperatura se lleva a cabo a un grado de dureza de aproximadamente 0°dH a aproximadamente 30°dH, tal como aproximadamente 1°dH, aproximadamente 2°dH, aproximadamente 3°dH, aproximadamente 4°dH, aproximadamente 5°dH, aproximadamente 6°dH, aproximadamente 7°dH, aproximadamente 8°dH, aproximadamente 9°dH, aproximadamente 10°dH, aproximadamente 11°dH, aproximadamente 12°dH, aproximadamente 13°dH, aproximadamente 14°dH, aproximadamente 15°dH, aproximadamente 16°dH, aproximadamente 17°dH, aproximadamente 18°dH, aproximadamente 19°dH, aproximadamente 20°dH, aproximadamente 21°dH, aproximadamente 22°dH, aproximadamente 23°dH, aproximadamente 24°dH, aproximadamente 25°dH, aproximadamente 26°dH, aproximadamente 27°dH, aproximadamente 28°dH, aproximadamente 29°dH, aproximadamente 30°dH. En condiciones de lavado típicas en Europa, el grado de dureza es aproximadamente de 15°dH, en condiciones de lavado típicas en EE.UU. aproximadamente de 6°dH, y en condiciones de lavado típicas en Asia de aproximadamente de 3°dH.

Pienso para animales

[0264] La presente invención también está dirigida a métodos para utilizar la proteasa de la invención que tiene actividad de proteasa en pienso para animales, así como para composiciones de pienso y aditivos de pienso que comprenden las proteasas de la invención.

[0265] Así, en una forma de realización, la presente invención se refiere a una composición de pienso o un aditivo de pienso que incluye un polipéptido aislado que tiene una identidad de secuencia con el polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2 de al menos 85%, que tiene actividad de proteasa, donde el polipéptido maduro corresponde a los aminoácidos 189 a 374 de la SEQ ID NO: 2.

[0266] Otro aspecto de la invención se refiere a un método para el tratamiento de proteínas, que comprende el paso de añadir al menos una proteasa según la invención a al menos una proteína o fuente de proteína, tal como la soja. Así, un aspecto se refiere a un método para el tratamiento de proteínas, que comprende el paso de añadir al menos un polipéptido aislado que tiene una identidad de secuencia con el polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2 de al menos 85%, que tiene actividad de proteasa, a al menos una proteína o fuente de proteína tal como la soja, donde el polipéptido maduro corresponde a los aminoácidos 189 a 374 de la SEQ ID NO: 2.

[0267] El término animal incluye todos los animales, incluyendo los seres humanos. Ejemplos de animales son los no rumiantes y los rumiantes. Los ejemplos de animales rumiantes incluyen, por ejemplo, animales tales como ovejas, cabras, y el ganado bovino, por ejemplo ganado vacuno, vacas, y terneros jóvenes. En una forma de realización particular, el animal es un animal no rumiante. Los animales no rumiantes incluyen animales monogástricos, por ejemplo cerdos o ganado porcino (incluyendo pero sin limitarse a lechones, cerdos en desarrollo y cerdas); aves tales como pavos, patos y pollos (incluyendo pero sin limitarse a pollos broiler, gallinas ponedoras); caballos (incluyendo pero sin limitarse a caballos de sangre caliente, de sangre fría y de sangre templada), terneros jóvenes; y peces (incluyendo pero sin limitarse a salmón, trucha, tilapia, siluro y carpas; y crustáceos (incluyendo pero sin limitarse a gambas y camarones).

[0268] El término pienso o composición de pienso significa cualquier compuesto, preparación, mezcla, o composición adecuada o destinada para su toma por un animal.

5 [0269] En el uso según la invención, la proteasa se puede dar al animal antes, después, o simultáneamente con la dieta. Se prefiere este último modo.

[0270] En una forma de realización particular, la proteasa, en la forma en que se añade al pienso, o cuando se incluye en un aditivo de pienso, está bien definida. Bien definida significa que la preparación de la proteasa es al
10 menos 50% pura según lo determina una cromatografía de exclusión por tamaño (véase ejemplo 12 de WO 01/58275). En otras formas de realización particulares, la preparación de la proteasa es al menos 60, 70, 80, 85, 88, 90, 92, 94, o al menos 95% pura según lo determina este método.

[0271] La preparación de una proteasa bien definida es ventajosa. Por ejemplo, es mucho más fácil dosificar
15 correctamente en el pienso una proteasa que está esencialmente libre de interferencia o contaminación a otras proteasas. El término dosificar correctamente se refiere en particular al objetivo de obtener resultados consistentes y constantes, y a la capacidad de optimizar la dosificación en función del efecto deseado.

[0272] Para el uso en pienso para animales, sin embargo, la proteasa no necesita ser tan pura; esta puede incluir
20 por ejemplo otras enzimas, en cuyo caso podría denominarse una preparación de proteasa.

[0273] La preparación de proteasa puede ser (a) añadida directamente al pienso (o usada directamente en un
25 proceso de tratamiento de proteína), o (b) se puede usar en la producción de una o más composiciones intermedias tales como aditivos de piensos o premezclas que se añaden posteriormente al pienso (o usar en un proceso de tratamiento). El grado de pureza anteriormente descrito se refiere a la pureza de la preparación de la proteasa original, ya sea usada según (a) o (b) de este párrafo.

[0274] Se pueden obtener preparaciones de proteasa con purezas de este orden de magnitud en particular usando
30 métodos recombinantes de producción, mientras que no se obtienen tan fácilmente y también están sometidas a una variación entre lotes mucho más alta cuando la proteasa se produce mediante métodos de fermentación tradicionales.

[0275] Tal preparación de proteasa puede, por supuesto, ser mezclada con otras enzimas.

35 [0276] La proteína puede ser una proteína animal, tal como harina de huesos y carne, harina de pluma, y/o harina de pescado; o puede ser una proteína vegetal.

[0277] El término proteínas vegetales como se utiliza en este caso se refiere a cualquier compuesto, composición,
40 preparación o mezcla que incluya al menos una proteína derivada o procedente de un vegetal, incluyendo proteínas modificadas y derivados de proteínas. En formas de realización particulares, el contenido de proteína de las proteínas vegetales es de al menos 10, 20, 30, 40, 50, o 60% (p/p).

[0278] Las proteínas vegetales pueden ser derivadas de fuentes de proteína vegetales, tales como leguminosas y
45 cereales, por ejemplo materiales de plantas de las familias *Fabaceae* (*Leguminosae*), *Cruciferae*, *Chenopodiaceae*, y *Poaceae*, tales como harina de soja, harina de lupino y harina de semilla de colza.

[0279] En una forma de realización particular, la fuente de proteína vegetal es material de una o más plantas de la
familia *Fabaceae*, por ejemplo soja, altramuza, guisante o judía.

50 [0280] En otra forma de realización particular, la fuente de proteína vegetal es material de una o más plantas de la familia *Chenopodiaceae*, por ejemplo remolacha, remolacha azucarera, espinaca o quinoa.

[0281] Otros ejemplos de fuentes de proteína vegetales son la semilla de colza, semilla de girasol, semilla de
algodón, y repollo.

55 [0282] La soja es una fuente de proteína vegetal preferida.

[0283] Otros ejemplos de fuentes de proteína vegetales son cereales tales como la cebada, trigo, centeno, avena,
60 maíz, arroz, triticale, y sorgo.

[0284] En una forma de realización particular de un proceso de tratamiento, la(s) proteasa(s) en cuestión afecta(n) a
las proteínas (o actúan, o ejercen su influencia de solubilización sobre ellas), tales como proteínas o fuentes de
proteínas vegetales. Para conseguir esto, la proteína o fuente de proteína está típicamente suspendida en un
solvente, por ejemplo un solvente acuoso tal como agua, y los valores de pH y de temperatura se ajustan teniendo
65 en cuenta las características de la enzima en cuestión. Por ejemplo, el tratamiento puede realizarse a un valor de pH en el que la actividad de proteasa real es de al menos 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%,

o al menos 90%. Asimismo, por ejemplo, el tratamiento puede producirse a una temperatura en la que la actividad de proteasa real es de al menos 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, o al menos 90%. Las indicaciones porcentuales de actividad anteriores son relativas a las actividades máximas. La reacción enzimática continúa hasta que se consigue el resultado deseado, después de lo cual se puede detener o no mediante la inactivación de la enzima, por ejemplo mediante un paso de tratamiento térmico.

[0285] En otra forma de realización particular de un proceso de tratamiento de la invención, la acción de la proteasa es prolongada, lo que significa, por ejemplo, que la proteasa se añade a las proteínas, pero su influencia de hidrolización, por así decirlo, no se activa hasta más tarde cuando se desea, una vez que se han establecido unas condiciones de hidrolización adecuadas, o una vez que se ha activado cualquier inhibidor enzimático, o cualesquiera otros medios que pudieran haber sido aplicados para posponer la acción de la enzima.

[0286] En una forma de realización, el tratamiento es un pretratamiento de pienso para animales o proteínas para usar en pienso para animales, es decir, las proteínas son hidrolizadas antes de la toma.

[0287] El término mejorar el valor nutricional de un pienso para animales significa mejorar la disponibilidad de las proteínas, lo que lleva a una extracción aumentada de proteína, unos rendimientos de proteínas más altos, y/o una utilización mejorada de la proteína. El valor nutricional del pienso, por lo tanto, se ve aumentado, y también aumentan la digestibilidad de proteínas y aminoácidos y/o se mejoran el índice de crecimiento y/o aumento de peso y/o conversión de pienso (es decir, el peso del pienso ingerido con respecto al aumento de peso) del animal.

[0288] La proteasa se puede añadir al pienso en cualquier forma, ya sea como una proteasa relativamente pura, o en mezcla con otros componentes destinados a añadirse a pienso para animales, es decir, en forma de aditivos de pienso, tales como las denominadas premezclas para pienso para animales.

[0289] En otro aspecto, la presente invención se refiere a composiciones para usar en pienso para animales, tales como pienso para animales, y aditivos de pienso, por ejemplo premezclas.

[0290] Aparte de la proteasa de la invención, los aditivos de pienso de la invención contienen al menos una vitamina liposoluble, y/o al menos una vitamina soluble en agua, y/o al menos un oligoelemento, y/o al menos un macromineral.

[0291] Además, otros ingredientes de aditivo de pienso opcionales son agentes colorantes, por ejemplo carotenoides tales como beta-caroteno, astaxantina, y luteína; estabilizadores; aditivos de mejora del crecimiento y compuestos de aroma/aromatizantes, por ejemplo creosol, anetol, deca- undeca-y/o dodecalactonas, iononas, irona, gingerol, piperidina, ftálica de propilideno, ftálica de butilideno, capsaicina y/o tanino; péptidos antimicrobianos; ácidos grasos poliinsaturados (PUFA); especies generadoras de oxígeno reactivo; además, se puede utilizar un soporte que puede contener, por ejemplo, 40- 50% en peso de fibras de madera, 8-10% en peso de estearina, 4-5% en peso de polvo de cúrcuma, 4-58% en peso de polvo de romero, 22- 28% en peso de piedra caliza, 1-3% en peso de una goma, tal como goma arábiga, 5-50% en peso de azúcar y/o almidón y 5-15% en peso de agua.

[0292] Un pienso o un aditivo de pienso de la invención también puede comprender al menos otra enzima seleccionada de entre fitasa (EC 3.1.3.8 o 3.1.3.26); xilanasas (EC 3.2.1.8); galactanasas (EC 3.2.1.89); alfa-galactosidasas (EC 3.2.1.22); otra proteasa, fosfolipasa A1 (EC 3.1.1.32); fosfolipasa A2 (EC 3.1.1.4); lisofosfolipasa (EC 3.1.1.5); fosfolipasa C (3.1.4.3); fosfolipasa D (EC 3.1.4.4); amilasa tal como, por ejemplo, alfa-amilasa (EC 3.2.1.1) y/o beta-glucanasas (EC 3.2.1.4 o EC 3.2.1.6).

[0293] En una forma de realización particular, estas otras enzimas están bien definidas (como se ha definido anteriormente para las preparaciones de proteasa).

[0294] Ejemplos de péptidos antimicrobianos (AMP) son CAP18, Leucocina A, Tritrpticina, Protegrina-1, Tanatina, Defensina, Lactoferrina, Lactoferricina, y ovispirina tal como Novispirina (Robert Lehrer, 2000), Plectasinas, y Estatinas, incluyendo los compuestos y polipéptidos descritos en WO 03/044049 y WO 03/048148, así como las variantes o fragmentos de los anteriores que retienen actividad antimicrobiana.

[0295] Ejemplos de polipéptidos antifúngicos (AFP) son los péptidos de *Aspergillus giganteus* y de *Aspergillus niger*, así como variantes y fragmentos de los mismos que retienen actividad antifúngica, como se describe en WO 94/01459 y WO 02/090384.

[0296] Ejemplos de ácidos grasos poliinsaturados son los ácidos grasos poliinsaturados C18, C20 y C22, tales como ácido araquidónico, ácido docosahexaenoico, ácido eicosapentanoico y ácido gamma-linolénico.

[0297] Ejemplos de especies generadoras de oxígeno reactivo son productos químicos tales como perborato, persulfato, o percarbonato; y enzimas tales como una oxidasa, una oxigenasa o una sintetasa.

[0298] Por lo general, las vitaminas lipo- e hidrosolubles, así como los oligoelementos, forman parte de una

denominada premezcla destinada a añadirse al pienso, mientras que los macrominerales normalmente se añaden separadamente al pienso. Cualquiera de estos tipos de composición, cuando se enriquece con una proteasa de la invención, es un aditivo para pienso para animales de la invención.

5 [0299] En una forma de realización particular, el aditivo de pienso de la invención está destinado a ser incluido (o a ser prescrito como de obligada inclusión) en dietas o pienso para animales a niveles de 0,01 a 10,0%; más particularmente de 0,05 a 5,0%; o de 0,2 a 1,0% (donde % significa g de aditivo por 100 g de pienso). Esto es así en particular para las premezclas.

10 [0300] A continuación figuran unas listas no exclusivas de ejemplos de estos componentes:
Ejemplos de vitaminas liposolubles son: vitamina A, vitamina D3, vitamina E, y vitamina K, por ejemplo vitamina K3.

Ejemplos de vitaminas hidrosolubles son: vitamina B12, biotina y colina, vitamina B1, vitamina B2, vitamina B6, niacina, ácido fólico y pantotenato, por ejemplo Ca-D-pantotenato.

15 Ejemplos de oligoelementos son: manganeso, zinc, hierro, cobre, yodo, selenio, y cobalto.
Ejemplos de macrominerales son: calcio, fósforo y sodio.

[0301] Los requisitos nutricionales de estos componentes (ejemplificados con aves y lechones/cerdos) se enumeran en la Tabla A de WO 01/58275. Requisito nutricional significa que estos componentes deberían proporcionarse en la dieta en las concentraciones indicadas.

[0302] Alternativamente, el aditivo para pienso para animales de la invención comprende al menos uno de los componentes individuales especificados en la Tabla A de WO 01/58275. Al menos uno significa cualquiera de, uno o más de uno, o dos, o tres, o cuatro y así sucesivamente hasta los trece, o hasta los quince componentes individuales. Más específicamente, este al menos un componente individual se incluye en el aditivo de la invención en la cantidad precisa para proporcionar una concentración en el pienso en el rango indicado en la columna cuatro, o en la columna cinco, o en la columna seis de la Tabla A.

[0303] En otra forma de realización, el aditivo para pienso para animales de la invención comprende al menos una de las vitaminas que aparecen a continuación, preferiblemente para proporcionar una concentración en el pienso dentro de los rangos especificados en la Tabla 1 siguiente (para dietas de lechón, y dietas de pollos broiler, respectivamente).

Tabla 1: Recomendaciones típicas de vitaminas:

Vitamina	Dieta de lechón	Dieta de broiler
Vitamina A	10,000-15,000 UI/kg de pienso	8-12,500 UI/kg de pienso
Vitamina D3	1800-2000 UI/kg de pienso	3000-5000 UI/kg de pienso
Vitamina E	60-100 mg/kg de pienso	150-240 mg/kg de pienso
Vitamina K3	2-4 mg/kg de pienso	2-4 mg/kg de pienso
Vitamina B1	2-4 mg/kg de pienso	2-3 mg/kg de pienso
Vitamina B2	6-10 mg/kg de pienso	7-9 mg/kg de pienso
Vitamina B6	4-8 mg/kg de pienso	3-6 mg/kg de pienso
Vitamina B12	0,03-0,05 mg/kg de pienso	0,015-0,04 mg/kg de pienso
Niacina (vitamina B3)	30-50 mg/kg de pienso	50-80 mg/kg de pienso
Ácido Pantoténico	20-40 mg/kg de pienso	10-18 mg/kg de pienso
Ácido fólico	1-2 mg/kg de pienso	1-2 mg/kg de pienso
Biotina	0,15-0,4 mg/kg de pienso	0,15-0,3 mg/kg de pienso
Cloruro de colina	200-400 mg/kg de pienso	300-600 mg/kg de pienso

[0304] La presente invención también se refiere a composiciones de pienso para animales. Las composiciones de pienso o dietas para animales tienen un contenido relativamente alto de proteínas. Las dietas de aves y de cerdo pueden caracterizarse como se indica en la Tabla B de WO 01/58275, columnas 2-3. Las dietas de peces pueden caracterizarse como se indica en la columna 4 de esta Tabla B. Además, tales dietas de peces normalmente tienen un contenido de grasa bruta de 200-310 g/kg.

[0305] WO 01/58275 corresponde a US 09/779334.

45 [0306] Una composición de pienso para animales según la invención tiene un contenido bruto de proteína de 50-800 g/kg, y comprende además al menos una proteasa como se reivindica en el presente documento.

[0307] Además, o alternativamente (al contenido bruto de proteína indicado antes), la composición de pienso para animales de la invención tiene un contenido de energía metabolizable de 10-30 MJ/kg; y/o un contenido de calcio de 0,1-200 g/kg; y/o un contenido de fósforo disponible de 0,1-200 g/kg; y/o un contenido de metionina de 0,1-100 g/kg; y/o un contenido de metionina más cisteína de 0,1-150 g/kg; y/o un contenido de lisina de 0,5-50 g/kg.

[0308] En formas de realización particulares, el contenido de energía metabolizable, proteína bruta, calcio, fósforo, metionina, metionina más cisteína, y/o lisina está dentro de cualquiera de los rangos 2, 3, 4 o 5 de la Tabla B de WO 01/58275 (R. 2-5).

[0309] La proteína bruta se calcula como nitrógeno (N) multiplicado por un factor de 6,25, es decir, proteína bruta (g/kg)= N (g/kg) x 6,25. El contenido de nitrógeno se determina por el método Kjeldahl (A.O.A.C., 1984, Official Methods of Analysis 14th ed., Association of Official Analytical Chemists, Washington DC).

[0310] La energía metabolizable se puede calcular basándose en la publicación del NRC Nutrient requirements in swine, ninth revised edition 1988, subcommittee on swine nutrition, committee on animal nutrition, board of agriculture, national research council. National Academy Press, Washington, D.C., pp. 2-6, y en la European Table of Energy Values for Poultry Feed-stuffs, Spelderholt centre for poultry research and extension, 7361 DA Beekbergen, Países Bajos. Grafisch bedrijf Ponsen & looijen bv, Wageningen. ISBN 90-71463-12-5.

[0311] El contenido alimenticio de calcio, fósforo y aminoácidos disponibles en dietas para animales completas se calcula basándose en tablas de pienso tales como Veevoedertabel 1997, gegevens over chemische samenstelling, verteerbaarheid en voederwaarde van voedermiddelen, Central Veevoederbureau, Runderweg 6, 8219 pk Lelystad. ISBN 90-72839-13-7.

[0312] En una forma de realización particular, la composición de pienso para animales de la invención contiene al menos una proteína vegetal tal como se ha definido anteriormente.

[0313] La composición de pienso para animales de la invención también puede contener proteína animal, tal como harina de carne y huesos, harina de plumas, y/o harina de pescado, típicamente en una cantidad de 0-25%. La composición de pienso para animales de la invención también puede comprender lías de la destilación de granos con solubles (DDGS), típicamente en cantidades de 0-30%.

[0314] En otras formas de realización particulares, la composición de pienso para animales de la invención contiene 0-80% maíz; y/o 0-80% de sorgo; y/o 0-70% de trigo; y/o 0-70% de cebada; y/o 0-30% de avena; y/o 0-40% de harina de soja; y/o 0-25% de harina de pescado; y/o 0-25% de harina de carne y huesos; y/o 0-20% de suero de leche.

[0315] Las dietas para animales se pueden fabricar por ejemplo como pienso triturado (no granulado) o pienso granulado. Típicamente, los materiales de pienso molidos se mezclan y se añaden cantidades suficientes de vitaminas y minerales esenciales según las especificaciones para la especie de la que se trate. Se puede añadir enzimas como formulaciones enzimáticas sólidas o líquidas. Por ejemplo, para piensos molidos se puede añadir una formulación enzimática sólida o líquida antes o durante el paso de mezcla de los ingredientes. Para piensos granulados también se puede añadir preparación (líquida o sólida) de proteasa/enzima antes o durante el paso de ingredientes del pienso. Típicamente, una preparación de proteasa/enzima líquida se añade después del paso de granulación. La enzima también se puede incorporar en un aditivo o premezcla de pienso.

[0316] La concentración enzimática final en la dieta está en el rango de 0,01-200 mg de proteína enzimática por kg de dieta, por ejemplo en el rango de 0,5-25 mg de proteína enzimática por kg de dieta animal.

[0317] La proteasa debería aplicarse por supuesto en una cantidad eficaz, es decir, en una cantidad adecuada para mejorar la hidrólisis, la digestibilidad, y/o el valor nutricional del pienso. Actualmente se contempla que la enzima se administre en una o varias de las siguientes cantidades (rangos de dosificación): 0,01-200; 0,01-100; 0,5-100; 1-50; 5-100; 10-100; 0,05-50; o 0,10-10 - todas estos rangos están en mg de proteína de proteasa por kg (ppm) de pienso.

[0318] Para la determinación de los mg de la proteína proteasa por kg de pienso, la proteasa se purifica a partir de la composición de pienso, y la actividad específica de la proteasa purificada se determina usando un ensayo pertinente (véase a continuación actividad de proteasa, sustratos y ensayos). La actividad de proteasa de la composición de pienso como tal también se determina usando el mismo ensayo y, en función de estas dos determinaciones, se calcula la dosificación en mg de proteína proteasa por kg de pienso.

[0319] Los mismos principios son aplicables para la determinación de los mg de proteína proteasa en aditivos de piensos. Por supuesto, si hay disponible una muestra de la proteasa usada para la preparación del aditivo de pienso o del pienso, la actividad específica se determinada a partir de esta muestra (no es necesario purificar la proteasa a partir de la composición de pienso o del aditivo).

[0320] La presente invención se describe aún más por los ejemplos siguientes, que no deberían ser interpretados como una limitación del ámbito de la invención.

5 Materiales y métodos

Ensayos de lavado

Ensayo de esfuerzo mecánico automático (AMSA) para lavado de ropa

10 [0321] Para evaluar el rendimiento de lavado en el lavado de ropa se realizan experimentos de lavado utilizando el Ensayo de esfuerzo mecánico automático (AMSA). Con el AMSA, se puede examinar el rendimiento de lavado de una gran cantidad de soluciones detergentes enzimáticas de pequeño volumen. La placa del AMSA tiene varias ranuras para soluciones de prueba y una tapa que comprime firmemente la muestra de ropa, el textil que se ha de lavar, contra todas las aberturas de las ranuras. Durante el tiempo de lavado, la placa, las soluciones de prueba, el

15 [0322] El rendimiento de lavado se mide como el brillo del color del textil lavado. El brillo también se puede expresar como la intensidad de la luz reflejada desde la muestra cuando se la ilumina con luz blanca. Cuando la muestra está manchada, la intensidad de la luz reflejada es menor que en una muestra limpia. Por lo tanto, la intensidad de la luz reflejada puede utilizarse para medir el rendimiento de lavado.

20 [0323] Las mediciones de color se hacen con un escáner profesional de superficie plana (Kodak iQsmart, Kodak, Midtager 29, DK-2605 Brøndby, Dinamarca), que se usa para capturar una imagen del textil lavado.

25 [0324] Para extraer un valor para la intensidad de luz de las imágenes escaneadas, valores de 24 bits por píxel de la imagen se convierten en valores para rojo, verde y azul (RGB). El valor de intensidad (Int) se calcula sumando los valores RGB entre sí como vectores y luego tomando la longitud del vector resultante:

$$Int = \sqrt{r^2 + g^2 + b^2}$$

35 Tabla 2: Composición detergentes modelo y materiales de prueba

Detergente para ropa en polvo modelo A	Citrato de sodio dihidratado 32,3% LAS de sodio 24,2% Lauril sulfato de sodio 32,2% Neodol 25-7 (alcohol etoxilado) 6,4% Sulfato de sodio 4,9%
Detergente líquido de lavado de ropa modelo B	Agua 30,63% Hidróxido de sodio 2,95% Ácido dodecylbencenosulfónico 11,52% Ácidos grasos (soja) 5,50% Propano-1,2-diol (MPG) 5,05% Agua 17,38% C13-alcohol etoxilado, 10,50% Dietilentiainopentakis (ácido metileno fosfónico) (DTMPA) 3,08% Trietanolamina (TEA) 2,22% Ácidos grasos (Coco) 4,50% Citrato de sodio monohidrato 1,00% Etanol 4,63% Syntran 5909 (opacificante) 0,30% Perfume 0,35%
Material de prueba	PC-03 (leche chocolateada/tinta en algodón/poliéster) C-10 (Aceite/leche/pigmento en algodón) PC-05 (Sangre/leche/tinta en algodón/poliéster) EMPA117EH (Sangre/leche/tinta en algodón/poliéster) CS-37, huevo completo con pigmento no envejecido en algodón
Los materiales de prueba se obtienen de Center For Testmaterials BV, P.O. Box 120, 3133 KT Vlaardingen, Países Bajos y EMPA Testmaterials AG, Movenstrasse 12; CH-9015 St. Gallen, Suiza.	

Ensayos de proteasa

[0325] Se usó un ensayo con Suc-AAPF-pNA cinético para la obtención del perfil de pH/actividad y el perfil de pH/estabilidad y la inhibición a pH 9.

- 5 [0326] Se usó un ensayo con Protazyme AK (caseína reticulada y teñida) para la obtención del perfil de temperatura/actividad a pH 6.5 y a pH 9.

1) Ensayo con Suc-AAPF-pNA :

- 10 [0327]
- | | |
|---------------------|--|
| Sustrato pNA: | Suc-AAPF-pNA (Bachem L-1400). |
| Temperatura: | temperatura ambiente (25°C) |
| Tampones de ensayo: | 100 mM de ácido succínico, 100 mM de HEPES, 100 mM de CHES, 100 mM de CABS, 1 nM de CaCl ₂ , 150 mM de KCl, Triton X-100 al 0,01% ajustado a valores de pH 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0, y 11.0 con HCl o NaOH. |
- 15

[0328] µl de proteasa (diluida en Triton X-100 al 0,01%) se mezclaron con 100µl de tampón de ensayo. El ensayo se inició con la adición de 100µl de sustrato de pNA (50mg disueltos en 1,0ml de DMSO y además diluidos 45x con Triton X-100 al 0,01%). El aumento en OD₄₀₅ se monitoreó como una medida de la actividad de proteasa.

20

2) Ensayo con Protazyme AK:

- [0329]
- | | |
|-------------------|---|
| Sustrato: | Protazyme AK en pastillas (caseína reticulada y teñida; de Megazyme) |
| Temperatura: | controlada (ensayo de temperatura). |
| Tampón de ensayo: | 100 mM de ácido succínico, 100 mM de HEPES, 100 mM de CHES, 100 mM de CABS, 1 nM de CaCl ₂ , 150 mM de KCl, Triton X-100 al 0,01%, pH 7.0. |
- 25

[0330] Se suspendió una pastilla de Protazyme AK en 2,0 ml de Triton X-100 al 0,01% mediante agitación suave. 500µl de esta suspensión y 500µl de tampón de ensayo se dispensaron en un tubo Eppendorf y se colocaron en hielo. Se añadió µl de muestra de proteasa (diluida en Triton X-100 al 0,01%). El ensayo se inició con la transferencia del tubo Eppendorf a un termomezclador Eppendorf, que estaba puesto a la temperatura de ensayo. El tubo se incubó durante 15 minutos en el termomezclador Eppendorf a su índice de agitación de máximo (1400 rpm.). La incubación se detuvo mediante la transferencia del tubo de nuevo al baño de hielo. Luego el tubo se centrifugó en una centrifugadora a la temperatura del hielo durante unos pocos minutos y se transfirieron 200µl de sobrenadante a una placa de microtitulación. OD₆₅₀ se leyó como una medida de la actividad de proteasa. Un tampón ciego se incluyó en el ensayo (en vez de una enzima).

35

3) Ensayo con Suc-AAPX-pNA:

40

[0331]

- | | |
|-------------------|---|
| Sustratos de pNA: | Suc-AAPA-pNA (Bachem L-1775) |
| | Suc-AAPR-pNA (Bachem L-1720) |
| | Suc-AAPD-pNA (Bachem L-1835) |
| | Suc-AAPI-pNA (Bachem L-1790) |
| | Suc-AAPM-pNA (Bachem L-1395) |
| | Suc-AAPV-pNA (Bachem L-1770) |
| | Suc-AAPL-pNA (Bachem L-1390) |
| | Suc-AAPE-pNA (Bachem L-1710) |
| | Suc-AAPK-pNA (Bachem L-1725) |
| | Suc-AAPF-pNA (Bachem L-1400) |
| Temperatura: | Temperatura ambiente (25°C) |
| Tampón de ensayo: | 100 mM de ácido succínico, 100 mM de HEPES, 100mM de CHES, 100mM de CABS, 1 nM de CaCl ₂ , 150 mM de KCl, Triton X-100 al 0,01%, pH 9.0. |
- 45
- 50
- 55

[0332] 20µl de proteasa (diluida en Triton X-100 al 0,01%) se mezclaron con 100µl de tampón de ensayo. El ensayo se inició con la adición de 100µl de sustrato de pNA (50mg disueltos en 1,0 ml de DMSO y además diluidos 45x con Triton X-100 al 0,01%). El aumento en OD₄₀₅ se monitoreó como una medida de la actividad de proteasa.

60

Ensayo con harina de soja-maíz (ensayo con SMM)

Actividad de proteasa en harina de soja-maíz a pH 3, 4, 5, 6, y 7

- 65 [0333] Se usó un ensayo de punto final utilizando harina de soja-maíz como sustrato para obtener el perfil de actividad de las proteasas a pH 3-7.

[0334] Tampones de ensayo: 100 mM de ácido succínico, 100 mM de HEPES, 100 mM de CHES, 100 mM de CAPS, 1 mM de CaCl_2 , 150 mM de KCl, Triton X-100 al 0,01% ajustado utilizando HCl o NaOH a valores de pH 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0 y 11.0 al mezclar 10 ml de tampón de ensayo con 1 g de harina de soja-maíz (proporción 30:70).

2 mL de harina de soja-maíz en suspensión se mezclan durante 30 min antes de la adición de proteasa e incubación durante 3 horas a 40°C (500 r.p.m.). La proteasa se añade mediante 100 µl de tampón de 100 mM de acetato sódico (NaAc) (9.565 g/l de NaAc, 1,75 g/l de ácido acético, 5 mM de CaCl_2 , BSA al 0,01 %, Tween20 al 0,01 %, pH 6.0).

El sobrenadante se recoge después de la centrifugación (10 min, 4000 r.p.m., 0°C) y la actividad de proteína se determina usando un ensayo colorimétrico basado en el método con dialdehído orto-ftálico (OPA) esencialmente según Nielsen *et al.* (Nielsen, PM, Petersen, D, Dampmann, C. Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. J Food Sci, 2001, 66: 642-646). Este ensayo detecta grupos α -amino libres y, por lo tanto, la actividad de proteasa se puede medir como un aumento en la absorbancia. Los primeros 500 µl de cada sobrenadante se filtran a través de un filtro Microcon 100 kDa por centrifugación (60 min, 11000 r.p.m., 5°C). Las muestras se diluyen 10x en agua desionizada y 25 µl de cada muestra se colocan en una placa de microtitulación de 96 pocillos (5 réplicas). Finalmente 200 µl de reactivo OPA se dispensan en todos los pocillos y la placa se agita (10 seg, 750 r.p.m.) y se mide la absorbancia a 340 nm. El nivel de actividad de proteasa se calcula como la diferencia entre la absorbancia en la muestra enzimática tratada y la muestra en blanco y se expresada como ' OD x factor de dilución.

Ensayo de digestión *in vitro*

[0335] Se usó un ensayo de digestión *in vitro* para evaluar el efecto de las proteasas en un sustrato de pienso (harina de soja-maíz) en una disposición diseñada para simular la digestión en animales monogástricos. El proceso de incubación consistió en una fase de digestión gástrica con pepsina porcina (SP7000, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) a pH 3 seguida de una breve incubación duodenal a pH 3.8 y una incubación en el intestino delgado con pancreatina (8xUSB, P-7545, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) a pH 7.0.

[0336] La digestión *in vitro* se realizó utilizando un sistema automatizado basado en un manipulador de líquidos Gilson (Biolab, Dinamarca). Para cada muestra, se colocaron 0,8 g de pienso en un tubo y todos los tubos se colocaron en el manipulador de líquidos (40°C, 500 r.p.m.). Se realizaron automáticamente adiciones de soluciones así como mediciones de pH. A los 0 min, se añadieron 4,1 mL de HCl (24 mM de CaCl_2) para alcanzar un pH 3.0 en la solución. A los 30 min, se añadieron 0,5 ml de HCl (24 mM de CaCl_2 , 3000 U de pepsina/g de pienso) y 100 µL de un tampón de 100 mM de acetato de sodio (258,6 g de NaAc por litro, ácido acético al 0,57 %, pH 6.0). A los 90 min se añadieron 900 µL de NaOH para alcanzar un pH ~3.8 y a los 120 min se añadieron 400 µL de una solución de 1 M de NaHCO_3 que contenía 6,5 mg de pancreatina/g de pienso hasta llevar a un pH 6.8 en la solución. El pH se midió a los 30, 60, 90, 115, 120 y 180 min. Las proteasas de prueba se añadieron mediante el tampón de 100 µl de NaAc a los 30 min.

[0337] El grado de hidrólisis de proteínas (GH) se determinó usando un ensayo colorimétrico basado en el método con dialdehído orto-ftálico (OPA) esencialmente según Nielsen *et al.* (Nielsen, PM, Petersen, D, Dampmann, C. Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. J Food Sci, 2001, 66: 642-646). Este ensayo detecta grupos α -amino libres y, por lo tanto, la actividad de proteasa se puede medir como un aumento en la absorbancia. Los primeros 500 µl de cada sobrenadante se filtran a través de un filtro Microcon 100 kDa por centrifugación (60 min, 11000 r.p.m., 5°C). Las muestras se diluyen 10x en agua desionizada y 25 µl de cada muestra se colocan en una placa de microtitulación de 96 pocillos (5 réplicas). Finalmente 200 µl de reactivo OPA se dispensan en todos los pocillos y la placa se agita (10 seg, 750 r.p.m.) y se mide la absorbancia a 340 nm. El porcentaje de enlaces peptídicos escindidos (GH) se calculó como:

$$\text{DH (\%)} = 100 \times h / h_{\text{tot}}$$

donde h_{tot} es el número total de enlaces peptídicos por proteína equivalente, y h es el número de enlaces hidrolizados. El cálculo de h_{tot} se basa en la secuencia de aminoácidos de la materia prima. En este estudio se usó el valor de la soja (7,8 g equivalentes por kg de proteínas) según Adler-Nissen (1986). La expresión para h en el método con OPA es:

$$h = (\text{serina-NH}_2 - \beta / \alpha \text{ meqv/g de proteína})$$

donde $\alpha = 0,970$ y $\beta = 0,342$ según Adler-Nissen (1979). Serina-NH₂ se calcula como:

$$\text{Serina - NH}_2 = (\text{OD}_{\text{muestra en blanco}} - \text{OD}_{\text{muestra}}) / (\text{OD}_{\text{estándar}} - \text{OD}_{\text{muestra en blanco}}) \times 0,9516 \text{ meqv/L} \times 0,1 \times 100 / X \times P$$

donde serina-NH₂ = meqv serina-NH₂/g proteína; X = g de muestra; P = proteína % en la muestra y 0,1 es el volumen de la muestra en litros (L).

[0338] Estadística: se realizó un análisis estadístico de los parámetros registrados utilizando un procedimiento de

análisis de varianza (ANOVA) y la comparación de las medias se hizo utilizando la prueba T de Student ($\alpha = 0,05$) proporcionada por el procedimiento ANOVA (SAS, JMP® 5 Administrators Guide to Annually Licensed Windows, Mackintosh, and Linux Versions, Release 5.1. SAS Institute, Cary, NC. (2003))

5 Ejemplos

Cepas

10 [0339] *Saccharothrix australiensis* DSM 43800, disponible de Deutsche Sammlung von Microorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Alemania. La cepa se recogió originalmente de tierra en Australia.

Medios y soluciones

15 [0340] Las placas de CL estaban compuestas por 10 g de bacto-triptona, 5 g de extracto de levadura, 10 g de cloruro sódico, 15 g de Bacto-agar, y agua desionizada a 1 litro.

[0341] El medio de CL estaba compuesto por 10 g de bacto-triptona, 5 g de extracto de levadura, y 10 g de cloruro sódico, y agua desionizada a 1 litro.

20 Ejemplo 1: preparación de ADN y secuenciación del genoma de *Saccharothrix australiensis*

25 [0342] Se aisló ADN cromosómico de *Saccharothrix australiensis* mediante QIAamp DNA Blood Mini Kit " (Qiagen, Hilden, Alemania). 5ug de ADN cromosómico de cada cepa se enviaron para la realización de la secuenciación del genoma a FASTERIS SA, Suiza. Los genomas fueron secuenciados por Illumina Sequencing. Las secuencias de genoma se analizaron para detectar proteasas S1 segregadas y se identificó la proteasa S1 (SEC ID:1/SEQ ID:2).

Ejemplo 2: expresión de la proteasa S1 de *Saccharothrix australiensis*

30 [0343] Basándose en la secuencia de nucleótidos identificada como SEQ ID NO: 1, un gen sintético con la SEQ ID NO: 3, fue sintetizado por Gene Art (GENEART AG BioPark, Josef-Engert-Str. 11, 93053, Regensburg, Alemania). El gen sintético se subclonó utilizando sitios de restricción ClaI y MluI en el vector de expresión de *Bacillus* como se describe en el ejemplo 1 de PCT/EP2011/064585. Se seleccionaron transformantes en placas CL suplementadas con 6 µg de cloranfenicol por ml. El clon de *Bacillus subtilis* recombinante que contenía el constructo de expresión integrado se seleccionó y cultivó en una mesa de agitación giratoria en matraces Erlenmeyer de 500 mL con deflectores cada uno de los cuales contenía 100 ml de medio basado en caseína suplementados con 34 mg/l de cloranfenicol. El clon se cultivó durante 5 días a 30°C. Los sobrenadantes que contenían enzimas fueron cosechados y la enzima se purificó como se describe en el ejemplo 3.

40 Ejemplo 3: purificación de la proteasa S1 de *Saccharothrix australiensis*

45 [0344] El caldo de cultivo del Ejemplo 2 se centrifugó (20000 x g, 20 min) y el sobrenadante se decantó cuidadosamente del precipitado. El sobrenadante se filtró a través de una unidad de filtración Nalgene de 0,2µm para eliminar el resto de las células huésped de *Bacillus*. El filtrado de 0,2µm se transfirió a 50 mM de H₃BO₃, 20 mM de CH₃COOH/NaOH, 1 mM de CaCl₂, pH 4.5 en una columna G25 Sefadex (de GE Healthcare). La enzima transferida a G25 Sefadex se aplicó a una columna SP-sepharose FF (de GE Healthcare) equilibrada en 50 mM de H₃BO₃, 20 mM de CH₃COOH/NaOH, 1 mM de CaCl₂, pH 4.5. Después del lavado exhaustivo de la columna con el tampón de equilibrado, la proteasa se eluyó con un gradiente lineal de NaCl (0→ 0,5M) en el mismo tampón en cinco volúmenes de columna. Se analizaron fracciones de la columna para detectar la actividad de proteasa (utilizando el ensayo Suc-AAPF-pNA a pH 9). El valor máximo de proteasa se agrupó y se diluyó diez veces con agua desionizada para reducir la conductividad de la muestra y se aplicó a una columna SOURCE S (de GE Healthcare) equilibrada en 50 mM de H₃BO₃, 20 mM de CH₃COOH/NaOH, 1 mM de CaCl₂, pH 4.5. Después del lavado exhaustivo de la columna con el tampón de equilibrado, la proteasa se eluyó con un gradiente lineal de NaCl (0→ 0,5M) en el mismo tampón en diez volúmenes de columna. Se analizaron fracciones de la columna para detectar la actividad de proteasa (utilizando el ensayo Suc-AAPF-pNA a pH 9) y las fracciones activas se analizaron además por SDS-PAGE. Las fracciones en las que solamente se vió una banda en el gel SDS-PAGE manchado con Coomassie se agruparon como producto purificado y se usaron para posterior caracterización.

Ejemplo 4: caracterización de la proteasa S1 de *Saccharothrix australiensis*

60 [0345] Se usó el ensayo con Suc-AAPF-pNA para obtener el perfil de pH/actividad y el perfil de pH/estabilidad (actividad residual después de 2 horas a los valores de pH indicados). Para el perfil de pH/estabilidad, la proteasa se diluyó 10x en los distintos tampones de ensayo para alcanzar los valores de pH de estos tampones y luego se incubó durante 2 horas a 37°C. Tras la incubación, el pH de las incubaciones de proteasa se transfirió al mismo valor de pH, antes de ensayo para detectar actividad residual, mediante dilución en el tampón de ensayo de pH 9.0. Se usó el ensayo con Protazyme AK para obtener el perfil de temperatura/actividad a pH 7.0. El ensayo con Suc-AAPX-pNA y diez sustratos Suc-AAPX-pNA diferentes se usaron para obtener la especificidad de P1 de las enzimas a pH

9.0.

[0346] Los resultados se muestran en las Tablas 3-6 a continuación. Los resultados se comparan con la proteasa 10R (SEQ ID NO 7). Para la Tabla 3, las actividades son respecto al pH óptimo para la enzima. Para la Tabla 4, las actividades son actividades residuales con respecto a una muestra, que se mantuvo en condiciones estables (5°C, pH 9.0). Para la Tabla 5, las actividades son respecto a la temperatura óptima a pH 7.0 o pH 6.5 para la enzima. Para la Tabla 6, las actividades son respecto al mejor sustrato (suc-AAPF-pNA) para la enzima.

Tabla 3: perfil de pH-actividad

pH	Proteasa S1 de <i>Saccharothrix australiensis</i>	Proteasa 10R
2	0,00	-
3	0,01	0,00
4	0,03	0,02
5	0,09	0,07
6	0,24	0,21
7	0,45	0,44
8	0,73	0,67
9	0,92	0,88
10	0,97	1,00
11	1,00	0,93

Tabla 4: Perfil de pH-estabilidad (actividad residual después de 2 horas a 37°C)

pH	Proteasa S1 de <i>Saccharothrix australiensis</i>	Proteasa 10R
2	0,58	0,78
3	1,02	1,03
4	0,99	0,99
5	0,99	1,00
6	1,00	1,03
7	1,01	1,01
8	1,03	0,98
9	0,98	0,99
10	0,94	0,99
11	0,90	0,86
Después de 2 horas a 5 °C	1,00 (a pH 9)	1,00 (a pH 9)

Tabla 5: Perfil de actividad de temperatura

Temp (°C)	Proteasa S1 de <i>Saccharothrix australiensis</i> (pH 7)	Proteasa 10R (pH 6.5)
15	0,02	0,01
25	0,06	0,02
37	0,14	0,06
50	0,37	0,13
60	0,71	0,35
70	1,00	0,96
80	0,22	1,00

Tabla 6: especificidad de P1 en 10 sustratos de Suc-AAPX-pNA a pH 9.0

Suc-AAPX-pNA	Proteasa S1 de <i>Saccharothrix australiensis</i>	Proteasa 10R (pH 9)
Suc-AAPA-pNA	0,08	0,13
Suc-AAPR-pNA	0,06	0,09
Suc-AAPD-pNA	0,00	0,00
Suc-AAPI-pNA	0,00	0,00
Suc-AAPM-pNA	0,47	0,78
Suc-AAPV-pNA	0,00	0,01
Suc-AAPL-pNA	0,18	0,18
Suc-AAPE-pNA	0,00	0,00
Suc-AAPK-pNA	0,06	0,08
Suc-AAPF-pNA	1,00	1,00

Otras características

[0347] La proteasa S1 de *Saccharothrix australiensis* fue inhibida por PMSF.
 La determinación de la secuencia N-terminal fue: IDVIGGN (SEQ ID NO: 4).
 El peso molecular relativo determinado por SDS-PAGE fue aprox. $M_r = 21$ kDa.
 El peso molecular determinado por análisis de peso molecular intacto fue 18746,9 Da.
 La secuencia madura (de datos de MS-EDMAN):

IDVIGGNAYYMGSGGRCSVGFVSNGGFVTAGHCGRVGTSTTTQPSGTFAGSTFPGRDYAWV
 RVSSGNTMRGLVNRYPGTVPVKGSNESSVGASVCRSGSTTGWHCGTIQQKNTSVTYPEGT
 ISGVTRTNACAEPGDSGGSWLTGDQAQGVTSGGSGNCSSGGTTYFQPVNPILQAYGLQLV
 IEGGPT (SEQ ID NO: 5)

[0348] El peso molecular calculado de esta secuencia madura fue 18746,5 Da.

Ejemplo 5: Lavado con AMSA utilizando la proteasa S1 de *Saccharothrix australiensis*

[0349] El rendimiento de lavado de la proteasa S1 de *Saccharothrix australiensis* se evaluó utilizando dos detergentes líquidos diferentes y un detergente en polvo a 2 temperaturas de lavado diferentes en 4 manchas técnicas diferentes utilizando el ensayo de esfuerzo mecánico automático (AMSA).

[0350] Los experimentos se llevaron a cabo como se describió en el método de AMSA para lavado de ropa utilizando un procedimiento de lavado de ciclo único, con la composición detergente y muestras descritas en la tabla 2 y las condiciones experimentales como se especifica en la Tabla 7 a continuación.

Tabla 7: Condiciones experimentales para experimentos de lavado de ropa

Dosis de detergente	detergente modelo en polvo A 2,5 g/L, detergente modelo líquido B 2 g/L y 8 g/L o Persil Small&Mighty de Unilever 1,33 g/L
Volumen de solución de prueba	160 micro L
pH	sin alterar
Tiempo de lavado	20 minutos
Temperatura	20°C o 40°C
Dureza del agua	15°dH
Concentración de proteasa	30 nM
Muestra	PC-05, PC-03, CS-37, C-10

[0351] La dureza del agua se ajustó a 15°dH mediante la adición de CaCl_2 , MgCl_2 , y NaHCO_3 ($\text{Ca}^{2+}:\text{Mg}^{2+}:\text{CO}_3^{2-} = 4:1:7,5$) al sistema de prueba. Después del lavado, los tejidos se enjuagaron en agua del grifo y se secaron.

Tabla 8: Valor delta de intensidad del detergente que contiene proteasa S1 de *Saccharothrix australiensis* en comparación con detergente sin proteasa a 20°C.

Muestra	Detergente A (2,5 g/L) a 20°C	Small&Mighty, Persil, Unilever (1,33 g/L) a 20°C	Detergente B (2 g/L) a 20°C	Detergente B (8 g/L) a 20°C
PC-03	1	0	1	1
C-10	3	2	0	0
PC-05	12	3	5	9
CS-37	6	7	7	6

[0352] Los resultados muestran que el detergente que contiene Proteasa S1 de *Saccharothrix australiensis* es más eficaz para la eliminación de manchas en comparación con el detergente sin proteasa. La proteasa S1 de *Saccharothrix australiensis* es eficaz para la eliminación de manchas de sangre y huevos a 20°C.

Tabla 9: Valor delta de intensidad del detergente que contiene proteasa S1 de *Saccharothrix australiensis* en comparación con el detergente sin proteasa a 40°C.

Muestra	Detergente A (2,5 g/L) a 40°C	Small&Mighty, Persil, Unilever (1,33 g/L) a 40°C	Detergente B (2 g/L) a 40°C	Detergente B (8 g/L) a 40°C
PC-03	7	3	3	8
C-10	4	10	8	9
PC-05	50	17	12	36
CS-37	6	15	9	7

[0353] Los resultados muestran que el detergente que contiene Proteasa S1 de *Saccharothrix australiensis* es más eficaz para la eliminación de manchas en comparación con el detergente sin proteasa. La proteasa S1 de *Saccharothrix australiensis* es eficaz para la eliminación de manchas de sangre y huevos a 40°C.

5 **Ejemplo 6:** evaluación de la estabilidad de la proteasa S1 de *Saccharothrix australiensis* en detergente líquido utilizando AMSA

10 [0354] La estabilidad de la proteasa S1 de *Saccharothrix australiensis* en detergente se evaluó examinando el rendimiento de lavado del detergente con la proteasa utilizando un ensayo de esfuerzo mecánico automático a 2 temperaturas de lavado diferentes. Se evaluaron tres condiciones de estabilidad diferentes, que son:
la proteasa se añadió a la composición detergente inmediatamente antes del lavado;
la proteasa se preincubó con el detergente durante 48 horas a 25°C; y
la proteasa se preincubó en solución de lavado durante 30 minutos a 40°C antes de empezar el lavado.

15 [0355] Los experimentos se llevaron a cabo como se describe en el ensayo de tensión mecánica automática (AMSA) para métodos de lavado de ropa utilizando un procedimiento de lavado de ciclo único, con la composición detergente y muestras descritas en la Tabla 2 y las condiciones experimentales como se especifica en la tabla 10 que sigue.

Tabla 10: Condiciones Experimentales para AMSA para la tabla 11

20

Solución de prueba	8 g/L de detergente modelo líquido B
Volumen de solución de prueba	160 micro L
pH	Sin alterar
Tiempo de lavado	20 minutos
Temperatura	20°C o 40°C
Dureza del agua	15°dH
Concentración de proteasa	0 (muestra en blanco) o 30 nM
Muestra	PC-05

[0356] La dureza del agua se ajustó a 15°dH mediante adición de CaCl₂, MgCl₂, y NaHCO₃ (Ca²⁺:Mg²⁺:CO₃⁻ = 4:1:7,5) al sistema de prueba. Después del lavado, los tejidos se enjuagaron en agua del grifo y se secaron.

25 **Tabla 11:** Valor delta de intensidad del detergente que contiene proteasa S1 de *Saccharothrix australiensis* en comparación con detergente sin proteasa en una muestra PC-05

	Rendimiento de lavado a 20°C			Rendimiento de lavado a 40°C		
	Enzima fresca	½ hora de preincubación a 40°C	48 h de estabilidad en detergente a 25°C	Enzima fresca	½ hora de preincubación a 40°C	48 h de estabilidad en detergente a 25°C
<i>Saccharothrix australiensis</i>	108	105	88	92	94	73
<i>Savinase</i> (SEQ ID NO 6)	83	74	80	78	77	73

30 [0357] Los resultados muestran que el detergente que contiene la proteasa S1 de *Saccharothrix australiensis* tiene el mismo rendimiento de lavado después de 48 horas de almacenamiento a 25°C en detergente líquido que la enzima fresca que se añade al detergente inmediatamente antes del lavado. Esto demuestra que, bajo estas condiciones, la proteasa S1 de *Saccharothrix australiensis* posee estabilidad en detergente.

35 [0358] Además, los resultados demuestran que el detergente que contiene la proteasa S1 de *Saccharothrix australiensis* tiene el mismo rendimiento de lavado después de una preincubación de 30 minutos de la solución de lavado a 40°C que la solución de lavado preparada con enzima fresca añadida al detergente inmediatamente antes del lavado. Esto demuestra que, bajo estas condiciones, la proteasa S1 de *Saccharothrix australiensis* posee estabilidad en el lavado.

40 **Ejemplo 7:** actividad de proteasa en ensayo con harina de soja-maíz

45 [0359] Los resultados de la realización del ensayo con harina de soja-maíz anteriormente mencionado se muestran en la Tabla 12 a continuación. La actividad proteolítica de la proteasa S1 de *Saccharothrix australiensis* en harina de soja-maíz aumenta con el aumento del pH de pH 3 a pH 7, y la actividad a pH 6-7 es igual de alta que para la proteasa 10R (proteasa derivada de *Nocardia* sp. cepa 10R, descrita en WO 88/03947) lo que indica que la proteasa S1 de *Saccharothrix australiensis* puede tener el mismo efecto en la hidrólisis de proteínas en el intestino de cerdos y aves, donde el pH es de alrededor de 7, como este producto comercial.

Tabla 12: Actividad de proteasa en harina de soja-maíz a pH 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 y 7.0

pH	Proteasa S1 de <i>Saccharothrix australiensis</i>		Proteasa 10R	
	Media	Desviación estándar	Media	Desviación estándar
3.0	0,18	0,02	0,22	0,06
4.0	0,29	0,05	0,30	0,10
5.0	0,58	0,11	0,71	0,01
6.0	1,81	0,03	1,81	0,14
7.0	2,65	0,00	2,92	0,11

[0360] La Figura 1 muestra la actividad en harina de soja-maíz de la proteasa S1 de *Saccharothrix australiensis* en comparación con la proteasa 10R.

Ejemplo 8: ensayo de digestión *in vitro*

[0361] Se realizó un ensayo de digestión *in vitro* como se ha descrito anteriormente donde se comparó la proteasa S1 de *Saccharothrix australiensis* con la proteasa 10R.

[0362] Los resultados se muestran en la Tabla 13 a continuación. La proteasa S1 de *Saccharothrix australiensis* aumentó el grado de hidrólisis de proteínas en las muestras tanto como la proteasa 10R, lo que indica que las dos proteasas son igual de eficaces para la hidrólisis de proteínas presentes en una dieta de soja-maíz.

Tabla 13: el grado de hidrólisis de proteínas (GH) como porcentaje en las muestras de digestión *in vitro* después del tratamiento con Proteasa S1 de *Saccharothrix australiensis* o proteasa 10R

Enzima (mg de proteína enzimática /kg de pienso)	GH (%)	
	Media 1	Desviación típica
Sin enzima	30,15 ^b	0,51
Proteasa S1 de <i>Saccharothrix australiensis</i> (100)	31,81 ^{ab}	0,75
Proteasa 10R (100)	32,39 ^a	1,29

¹ Las distintas letras en superíndice indican diferencias significativas (P<0,05).

Ejemplo 9: actividad proteolítica en contenido material digerido del buche, molleja e íleon de pollos broiler

[0363] Se recogió material digerido del buche, molleja e íleon de pollos broiler de 21 días de edad alimentados con una dieta de maíz-soja, se liofilizó y se molió utilizando un molinillo pequeño de café. Las muestras molidas se suspendieron (47% p/v) en los siguientes tampones y se dejaron hidratar a 4°C durante la noche (sin agitación):

Tampón para el buche: 100 mM de HEPES, 1 mM de CaCl₂·2 H₂O, 150 mM de KCl, Triton X-100 al 0,01%, ajustado a pH 5 mediante HCl

Tampón para la molleja: 100 mM de ácido succínico, 1 mM de CaCl₂·2 H₂O, 150 mM de KCl, Triton X-100 al 0,01%, ajustado a pH 1.67 mediante HCl

Tampón para el íleon: 100 mM de HEPES, 1 mM de CaCl₂·2 H₂O, 150 mM de KCl, Triton X-100 al 0,01%, ajustado a pH 7.2 mediante HCl

[0364] El pH resultante fue: pH 5 en las muestras de buche; pH 3 en las muestras de molleja; y pH 7 en las muestras de íleon. Las suspensiones se calentaron a 40°C y se dispensó 1 ml en tubos mantenidos a 40°C.

Tres tubos representando muestras en blanco (T₀) se centrifugaron inmediatamente (3000 x g, 0°C, 10 min) y se congelaron los sobrenadantes. Cada enzima (200 mg de proteína enzimática/kg de sustrato) en 50 µl de tampón de 100 mM de acetato sódico (9,565 g/l de NaOAc, 1,75 g/l de ácido acético, 5 mM de CaCl₂, 0,01% de BSA, 0,01% de Tween20, pH 6.0) o sólo tampón de acetato sódico (50 µL) para las muestras en blanco se añadieron a los tubos, y se incubaron las muestras de buche y de íleon durante 3 horas (T₃), mientras que las muestras de molleja se incubaron durante 1 hora (T₁) a 40°C con agitación (500 r.p.m.). Las muestras se centrifugaron (3000 x g, 0°C, 10 min) y los sobrenadantes se recuperaron y se congelaron. La actividad proteolítica se determinó mediante el análisis de las aminas primarias utilizando el ensayo con dialdehído orto-ftálico (OPA). Los resultados se muestran en la Tabla 14. Para cada uno de los tipos de material digerido (de buche, molleja e íleon) hubo una diferencia significativa entre el nivel de aminas primarias solubles en la muestra en blanco T₀ y en las muestras en blanco incubadas durante 1 o 3 horas. Esta diferencia se puede atribuir a la solubilización y actividad de las proteasas presentes en el sustrato y originadas o bien a partir de las materias primas de la dieta o del animal. La proteasa S1 de *Saccharothrix australiensis* aumentó numéricamente el nivel de aminas primarias solubles en los tres ensayos en comparación con la forma en blanco incubada durante 1 o 3 horas sin proteasa.

Tabla 14: Actividad proteolítica de la proteasa S1 de *Saccharothrix australiensis* en comparación con la proteasa 10R cuando se incuba con material digerido de broiler y se expresa como nivel de aminas primarias medido por el ensayo OPA (OD₃₄₀ x factor de dilución)

Tratamiento	Buche (3 horas)	Molleja (1 hora)	Íleon (3 horas)
Muestra en blanco (T ₀)	2,21 ± 0,02 ^d	2,95 ± 0,02 ^c	9,37 ± 0,08 ^b
Muestra en blanco	3,54 ± 0,02 ^c	3,85 ± 0,13 ^a	14,42 ± 0,52 ^a
Proteasa 10R	3,85 ± 0,07 ^{ab}	3,87 ± 0,21 ^a	14,74 ± 0,16 ^a
Proteasa S1 de <i>Saccharothrix australiensis</i>	3,73 ± 0,08 ^{abc}	3,79 ± 0,12 ^{ab}	14,01 ± 0,58 ^a
^{a,b,c,d} Los valores dentro de una columna que no están conectados por las mismas letras de superíndice son diferentes estadísticamente, según lo determina la prueba Tukey Kramer ($\alpha=0,05$) proporcionada por el procedimiento ANOVA (SAS Institute Inc.).			

LISTADO DE SECUENCIAS

- 5 [0365]
- <110> Novozymes A/S
- <120> POLIPÉPTIDOS CON ACTIVIDAD DE PROTEASA Y POLINUCLEÓTIDOS QUE CODIFICAN LOS MISMOS
- <130> 12132-WO-PCT
- 10 <160> 7
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 1505
- <212> DNA
- 15 <213> *Saccharothrix australiensis*
- <220>
- <221> CDS
- <222> (101)..(1405)
- <220>
- 20 <221> sig_peptide
- <222> (101)..(187)
- <400> 1

ES 2 628 190 T3

agttatgact cgactggcat atccgccacc tcgctcagcc ggctagcgtc gtccgcacgg	60
ccccgcatcc cgtgtcacca cccctgcaag gagacaacgg atg act cga cgc atc	115
Met Thr Arg Arg Ile	
1 5	
gcc gcc gcc gtc gcc gtg gcg gtc atg agc gct gcc ggt gtg gca gcc	163
Ala Ala Ala Val Ala Val Ala Val Met Ser Ala Ala Gly Val Ala Ala	
10 15 20	
gct ctg acc acc gcc gcg aac gcc ggt cca ccg aca acg cac cag gag	211
Ala Leu Thr Thr Ala Ala Asn Ala Gly Pro Pro Thr Thr His Gln Glu	
25 30 35	
gag agc ggc ctc atc gcc gcg atg gcg cgc gac ttc aag atc acg ccc	259
Glu Ser Gly Leu Ile Ala Ala Met Ala Arg Asp Phe Lys Ile Thr Pro	
40 45 50	
gac cag gcg cgc gcc cgg ctc gtc cgg gag gcc aag gcc gcg acc acc	307
Asp Gln Ala Arg Ala Arg Leu Val Arg Glu Ala Lys Ala Ala Thr Thr	
55 60 65	
gag cag agc ctg aag tcg cgg ctc ggc ggc cac tac gcg ggc gcc tgg	355
Glu Gln Ser Leu Lys Ser Arg Leu Gly Gly His Tyr Ala Gly Ala Trp	
70 75 80 85	
ctg aac gag ggc gcc acc gaa ctc gtc gtc gcc gtc acc gac gcg gcg	403
Leu Asn Glu Gly Ala Thr Glu Leu Val Val Ala Val Thr Asp Ala Ala	
90 95 100	
cag gcc aag gtg gtc gag gac gcc ggc gcg acg ccg aag gtc gtg cag	451
Gln Ala Lys Val Val Glu Asp Ala Gly Ala Thr Pro Lys Val Val Gln	
105 110 115	
cgc agc cag atc cag ctc gac gag ctg aag gcc aag ctg gac gcg aac	499

ES 2 628 190 T3

Arg	Ser	Gln	Ile	Gln	Leu	Asp	Glu	Leu	Lys	Ala	Lys	Leu	Asp	Ala	Asn	
		120					125					130				
aag	aac	gcg	ccg	aag	gac	gtg	ccc	gcg	tgg	tac	gtc	gac	gtg	aag	acc	547
Lys	Asn	Ala	Pro	Lys	Asp	Val	Pro	Ala	Trp	Tyr	Val	Asp	Val	Lys	Thr	
	135					140					145					
aac	tcc	gtg	gtc	gtg	ctg	gcc	cgc	aac	acc	gcg	agc	gcc	aag	gcg	ttc	595
Asn	Ser	Val	Val	Val	Leu	Ala	Arg	Asn	Thr	Ala	Ser	Ala	Lys	Ala	Phe	
150					155					160					165	
gcc	cgc	gcc	agc	ggt	ctg	agc	gag	gcg	gac	gtc	cgg	atc	gag	cag	tcc	643
Ala	Arg	Ala	Ser		Leu	Ser	Glu	Ala	Asp	Val	Arg	Ile	Glu	Gln	Ser	
				170					175					180		
acc	gag	gac	ccg	cgc	ccg	ctg	atc	gac	gtc	atc	ggc	ggc	aac	gcg	tac	691
Thr	Glu	Asp	Pro	Arg	Pro	Leu	Ile	Asp	Val	Ile	Gly	Gly	Asn	Ala	Tyr	
			185					190					195			
tac	atg	ggc	agc	ggc	ggt	cgc	tgc	tcg	gtc	ggc	ttc	tcg	gtc	aac	ggc	739
Tyr	Met	Gly	Ser	Gly	Gly	Arg	Cys	Ser	Val	Gly	Phe	Ser	Val	Asn	Gly	
	200						205					210				
ggc	ttc	gtg	acg	gcg	ggc	cac	tgc	ggc	cgg	gtc	ggc	acc	acg	acc	acc	787
Gly	Phe	Val	Thr	Ala	Gly	His	Cys	Gly	Arg	Val	Gly	Thr	Thr	Thr	Thr	
	215					220					225					
cag	ccc	agc	ggc	acg	ttc	gcc	ggt	tcc	acc	ttc	ccc	ggc	cgg	gac	tac	835
Gln	Pro	Ser	Gly	Thr	Phe	Ala	Gly	Ser	Thr	Phe	Pro	Gly	Arg	Asp	Tyr	
230					235					240					245	
gcc	tgg	gtc	cgc	gtg	agc	tcg	ggc	aac	acc	atg	cgc	ggc	ctg	gtc	aac	883
Ala	Trp	Val	Arg	Val	Ser	Ser	Gly	Asn	Thr	Met	Arg	Gly	Leu	Val	Asn	
				250					255				260			
cgc	tac	ccc	ggc	acc	gtg	ccg	gtg	aag	ggc	tcc	aac	gag	tcg	tcc	gtc	931
Arg	Tyr	Pro	Gly	Thr	Val	Pro	Val	Lys	Gly	Ser	Asn	Glu	Ser	Ser	Val	
			265					270					275			
ggc	gcg	tcg	gtc	tgc	cgt	tcc	ggc	tcg	acg	acg	ggt	tgg	cac	tgc	ggc	979
Gly	Ala	Ser	Val	Cys	Arg	Ser	Gly	Ser	Thr	Thr	Gly	Trp	His	Cys	Gly	
	280						285					290				
acc	atc	cag	cag	aag	aac	acc	tcc	gtg	acg	tac	ccc	gag	ggc	acc	atc	1027
Thr	Ile	Gln	Gln	Lys	Asn	Thr	Ser	Val	Thr	Tyr	Pro	Glu	Gly	Thr	Ile	
	295					300					305					
tcc	ggt	gtg	acc	cgg	acc	aac	gcc	tgc	gcc	gag	ccc	ggc	gac	tcg	ggc	1075
Ser	Gly	Val	Thr	Arg	Thr	Asn	Ala	Cys	Ala	Glu	Pro	Gly	Asp	Ser	Gly	
310					315					320					325	
ggt	tcg	tgg	ctc	acc	ggc	gac	cag	gcc	cag	ggc	gtc	acc	tcc	ggt	ggt	1123
Gly	Ser	Trp	Leu	Thr	Gly	Asp	Gln	Ala	Gln	Gly	Val	Thr	Ser	Gly	Gly	
				330					335					340		
tcc	ggg	aac	tgc	tca	tcc	ggc	ggc	acg	acg	tac	ttc	cag	ccg	gtg	aac	1171
Ser	Gly	Asn	Cys	Ser	Ser	Gly	Gly	Thr	Thr	Tyr	Phe	Gln	Pro	Val	Asn	
			345					350					355			
ccg	atc	ctc	cag	gcg	tac	ggc	ctc	cag	ctg	gtc	atc	gag	ggc	ggc	ccg	1219
Pro	Ile	Leu	Gln	Ala	Tyr	Gly	Leu	Gln	Leu	Val	Ile	Glu	Gly	Gly	Pro	
		360					365					370				

ES 2 628 190 T3

```

acc ggc acc acc gga ccg acc acg acg tcc agc aac ccg ggc ggc acg      1267
Thr Gly Thr Thr Gly Pro Thr Thr Thr Ser Ser Asn Pro Gly Gly Thr
   375                      380                      385

acc tgg cag cca ggc gtc gcg tac acg gcc ggt acc acc gtc acg tac      1315
Thr Trp Gln Pro Gly Val Ala Tyr Thr Ala Gly Thr Thr Val Thr Tyr
   390                      395                      400                      405

gag ggc gtc ggg tac gag tgc ttg cag ggg cac acg tcc caa atc ggc      1363
Glu Gly Val Gly Tyr Glu Cys Leu Gln Gly His Thr Ser Gln Ile Gly
                   410                      415                      420

tgg gag ccg tcc gcg gtg ccc gct ctg tgg gag cgc gtg ggc      1405
Trp Glu Pro Ser Ala Val Pro Ala Leu Trp Glu Arg Val Gly
                   425                      430                      435

tagcggcaag cttcgcgcgc gggggcgggg cccgactcgc gtcgggcccc ccttccccac      1465

gcgcctaccg gggatgacgg ggcgtttgcg gaggcgcccc      1505

```

<210> 2

<211> 435

<212> PRT

5 <213> *Saccharothrix australiensis*

<400> 2

```

Met Thr Arg Arg Ile Ala Ala Ala Val Ala Val Ala Val Met Ser Ala
1           5           10           15

Ala Gly Val Ala Ala Ala Leu Thr Thr Ala Ala Asn Ala Gly Pro Pro
                20           25           30

Thr Thr His Gln Glu Glu Ser Gly Leu Ile Ala Ala Met Ala Arg Asp
          35           40           45

Phe Lys Ile Thr Pro Asp Gln Ala Arg Ala Arg Leu Val Arg Glu Ala
   50           55           60

Lys Ala Ala Thr Thr Glu Gln Ser Leu Lys Ser Arg Leu Gly Gly His
65           70           75           80

Tyr Ala Gly Ala Trp Leu Asn Glu Gly Ala Thr Glu Leu Val Val Ala
          85           90           95

Val Thr Asp Ala Ala Gln Ala Lys Val Val Glu Asp Ala Gly Ala Thr
          100          105          110

Pro Lys Val Val Gln Arg Ser Gln Ile Gln Leu Asp Glu Leu Lys Ala
          115          120          125

Lys Leu Asp Ala Asn Lys Asn Ala Pro Lys Asp Val Pro Ala Trp Tyr
          130          135          140

```

ES 2 628 190 T3

Val 145	Asp	Val	Lys	Thr	Asn 150	Ser	Val	Val	Val	Leu 155	Ala	Arg	Asn	Thr	Ala 160
Ser	Ala	Lys	Ala	Phe 165	Ala	Arg	Ala	Ser	Gly 170	Leu	Ser	Glu	Ala	Asp 175	Val
Arg	Ile	Glu	Gln 180	Ser	Thr	Glu	Asp	Pro 185	Arg	Pro	Leu	Ile	Asp 190	Val	Ile
Gly	Gly	Asn 195	Ala	Tyr	Tyr	Met	Gly 200	Ser	Gly	Gly	Arg	Cys 205	Ser	Val	Gly
Phe 210	Ser	Val	Asn	Gly	Gly	Phe 215	Val	Thr	Ala	Gly	His 220	Cys	Gly	Arg	Val
Gly 225	Thr	Thr	Thr	Thr	Gln 230	Pro	Ser	Gly	Thr	Phe 235	Ala	Gly	Ser	Thr	Phe 240
Pro	Gly	Arg	Asp	Tyr 245	Ala	Trp	Val	Arg	Val 250	Ser	Ser	Gly	Asn	Thr	Met 255
Arg	Gly	Leu	Val 260	Asn	Arg	Tyr	Pro	Gly 265	Thr	Val	Pro	Val	Lys 270	Gly	Ser
Asn	Glu	Ser 275	Ser	Val	Gly	Ala	Ser 280	Val	Cys	Arg	Ser	Gly 285	Ser	Thr	Thr
Gly 290	Trp	His	Cys	Gly	Thr	Ile 295	Gln	Gln	Lys	Asn	Thr 300	Ser	Val	Thr	Tyr
Pro 305	Glu	Gly	Thr	Ile	Ser	Gly 310	Val	Thr	Arg	Thr 315	Asn	Ala	Cys	Ala	Glu 320
Pro	Gly	Asp	Ser	Gly 325	Gly	Ser	Trp	Leu	Thr 330	Gly	Asp	Gln	Ala	Gln 335	Gly
Val	Thr	Ser	Gly 340	Gly	Ser	Gly	Asn 345	Cys	Ser	Ser	Gly	Gly	Thr 350	Thr	Tyr
Phe	Gln	Pro 355	Val	Asn	Pro	Ile	Leu 360	Gln	Ala	Tyr	Gly	Leu 365	Gln	Leu	Val
Ile 370	Glu	Gly	Gly	Pro	Thr	Gly 375	Thr	Thr	Gly	Pro	Thr 380	Thr	Thr	Ser	Ser
Asn 385	Pro	Gly	Gly	Thr	Thr	Trp 390	Gln	Pro	Gly	Val 395	Ala	Tyr	Thr	Ala	Gly 400

ES 2 628 190 T3

Thr Thr Val Thr Tyr Glu Gly Val Gly Tyr Glu Cys Leu Gln Gly His
405 410 415

Thr Ser Gln Ile Gly Trp Glu Pro Ser Ala Val Pro Ala Leu Trp Glu
420 425 430

Arg Val Gly
435

<210> 3
<211> 1305
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic gene

<400> 3

atgacacgtc gcattgccgc tgcagttgca gtagctgtaa tgtctgcggc aggagttgct	60
gcagctctta cgacggctgc taacgctgga cctccaacta cgcatcagga agaatacagga	120
cttatcgctg caatggctcg tgactttaag attacaccgg atcaagcacg tgctcgctt	180
gtacgtgaag cgaaagcagc aactacagaa caatctttga aatctcgttt gggaggccac	240
tatgctggcg catggcttaa cgaaggtgct actgaattag tagttgctgt tactgatgcc	300
gcacaagcga aagttgttga agatgcggga gctacgccta aggtagtaca acgttcacaa	360
atccaattgg acgagcttaa agcaaaactt gacgctaaca aaaacgctcc aaaagacgta	420
cctgcatggt atgttgatgt aaagacaaat tcagtagtag ttcttgctcg taacacagcg	480
tctgcaaaag catttgctcg cgcatctgga ttatcagaag ctgacgttcg tatcgaacag	540
tctactgaag acccagctcc gttaatcgac gttattggtg gcaatgcgta ttacatgggt	600
tctggaggcc gttgctcagt aggatcttct gtaaattggcg gtttcggttac agctgggtcac	660
tgtggctcgtg taggcacaaac tactacacaa cttctctggta cttttgctgg ctctactttc	720
ccaggctcgc actatgcttg ggttcgtggt tcttctggaa atacgatgcg tggacttgta	780
aatcgttacc ctgggtactgt acctgttaaa ggatctaata aatcatcagt aggcgcttct	840
gtttgtcggt ctggcagcac gacaggttgg cactgcggaa ctattcagca gaaaaacaca	900
tctgttactt accctgaggg aactatttct ggagtaactc gtacaaatgc gtgcgcagaa	960
cctgggtgact ctgggtggatc atggcttact ggtgatcagg ctcaaggagt aacatctgga	1020
ggctctggta actgctcttc tgggtggcaca acgtatttcc aacctgttaa cccaatctta	1080
caagcatacg gccttcaatt agttattgaa ggtggaccaa ctggtacaac aggtcctacg	1140
acaacatctt ctaaccctgg aggcacaact tggcaacctg gtgttgcata cacggctggc	1200

ES 2 628 190 T3

actactgtta cgtacgaggg cgttgggttac gaatgccttc aaggtcacac atctcagatc 1260

ggctgggaac ctagcgcagt tcctgccctt tgggaacgtg ttggc 1305

<210> 4

<211> 7

<212> PRT

5 <213> *Saccharothrix australiensis*

<400> 4

Ile Asp Val Ile Gly Gly Asn
1 5

<210> 5

10 <211> 186

<212> PRT

<213> *Saccharothrix australiensis*

<400> 5

ES 2 628 190 T3

Ile Asp Val Ile Gly Gly Asn Ala Tyr Tyr Met Gly Ser Gly Gly Arg
1 5 10 15

Cys Ser Val Gly Phe Ser Val Asn Gly Gly Phe Val Thr Ala Gly His
20 25 30

Cys Gly Arg Val Gly Thr Thr Thr Thr Gln Pro Ser Gly Thr Phe Ala
35 40 45

Gly Ser Thr Phe Pro Gly Arg Asp Tyr Ala Trp Val Arg Val Ser Ser
50 55 60

Gly Asn Thr Met Arg Gly Leu Val Asn Arg Tyr Pro Gly Thr Val Pro
65 70 75 80

Val Lys Gly Ser Asn Glu Ser Ser Val Gly Ala Ser Val Cys Arg Ser
85 90 95

Gly Ser Thr Thr Gly Trp His Cys Gly Thr Ile Gln Gln Lys Asn Thr
100 105 110

Ser Val Thr Tyr Pro Glu Gly Thr Ile Ser Gly Val Thr Arg Thr Asn
115 120 125

Ala Cys Ala Glu Pro Gly Asp Ser Gly Gly Ser Trp Leu Thr Gly Asp
130 135 140

Gln Ala Gln Gly Val Thr Ser Gly Gly Ser Gly Asn Cys Ser Ser Gly
145 150 155 160

Gly Thr Thr Tyr Phe Gln Pro Val Asn Pro Ile Leu Gln Ala Tyr Gly
165 170 175

Leu Gln Leu Val Ile Glu Gly Gly Pro Thr
180 185

5

<210> 6
<211> 269
<212> PRT
<213> Bacillus clausii

10 <400> 6

ES 2 628 190 T3

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

ES 2 628 190 T3

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

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

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

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

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

<210> 7

<211> 188

<212> PRT

5 <213> Nocardiosis sp. (protease 10)

<400> 7

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

Val Gly Phe Ala Ala Thr Asn Ala Ala Gly Gln Pro Gly Phe Val Thr
20 25 30

Ala Gly His Cys Gly Arg Val Gly Thr Gln Val Thr Ile Gly Asn Gly
35 40 45

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

Val Arg Gly Thr Ser Asn Phe Thr Leu Thr Asn Leu Val Ser Arg Tyr
65 70 75 80

Asn Thr Gly Gly Tyr Ala Thr Val Ala Gly His Asn Gln Ala Pro Ile
85 90 95

Gly Ser Ser Val Cys Arg Ser Gly Ser Thr Thr Gly Trp His Cys Gly
100 105 110

Thr Ile Gln Ala Arg Gly Gln Ser Val Ser Tyr Pro Glu Gly Thr Val
115 120 125

Thr Asn Met Thr Arg Thr Thr Val Cys Ala Glu Pro Gly Asp Ser Gly
130 135 140

ES 2 628 190 T3

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

Ser Gly Asn Cys Arg Thr Gly Gly Thr Thr Phe Tyr Gln Glu Val Thr
165 170 175

Pro Met Val Asn Ser Trp Gly Val Arg Leu Arg Thr
180 185

REIVINDICACIONES

1. Polipéptido aislado con actividad de proteasa, seleccionado del grupo consistente en:
 - (a) un polipéptido que tiene al menos 85% de identidad de secuencia con el polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2, donde el polipéptido maduro corresponde a los aminoácidos 189 a 374 de la SEQ ID NO: 2;
 - (b) un polipéptido codificado por un polinucleótido con al menos 85% identidad de secuencia con la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 1, donde el polinucleótido maduro corresponde a los nucleótidos 665 a 1222 de la SEQ ID NO: 1; y
 - (c) un fragmento del polipéptido de (a) o (b) que tiene actividad de proteasa,
 donde el polipéptido tiene actividad de proteasa mejorada entre 37°C y 60°C, en comparación con la proteasa 10R (SEQ ID NO: 7).
2. Polipéptido según la reivindicación 1, que comprende o consiste en la SEQ ID NO: 2 o el polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2.
3. Polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, que es una variante del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2 que comprende una sustitución, delección, y/o inserción en una o más posiciones.
4. Composición que comprende el polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-3.
5. Composición según la reivindicación 4 que es una composición detergente tal como una composición para el lavado de ropa o el lavado automático de vajilla.
6. Composición según la reivindicación 5 que comprende además una o más enzimas adicionales seleccionadas de entre proteasas, amilasas, lipasas, cutinasas, celulasas, endoglucanasas, xiloglucanasas, pectinasas, pectín liasas, xantanases, peroxidases, haloperoxigenasas, catalasas, mananasas o cualquier mezcla de las mismas.
7. Composición según la reivindicación 5 o 6 que comprende uno o más componentes seleccionados de entre tensioactivos, constructores, etc.
8. Polinucleótido aislado que codifica el polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-3.
9. Constructo de ácidos nucleicos o vector de expresión que comprende el polinucleótido según la reivindicación 8 operativamente enlazado a una o más secuencias de control que dirigen la producción del polipéptido en un huésped de expresión.
10. Célula huésped recombinante que comprende el polinucleótido según la reivindicación 8 operativamente enlazado a una o más secuencias de control que dirigen la producción del polipéptido.
11. Método para producir el polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que comprende:
 - (a) cultivar una célula, que en su forma de tipo salvaje produce el polipéptido, bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido; y
 - (b) recuperar el polipéptido.
12. Método para producir un polipéptido con actividad de proteasa según las reivindicaciones 1-3, que comprende:
 - (a) cultivar la célula huésped según la reivindicación 10 bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido; y
 - (b) recuperar el polipéptido.
13. Método para mejorar el valor nutricional de un pienso para animales, donde al menos una proteasa de cualquiera de las reivindicaciones 1-3 se añade al pienso.
14. Aditivo de pienso para animales que comprende
 - a. al menos una proteasa de cualquiera de las reivindicaciones 1-3; y
 - b. al menos una vitamina liposoluble, y/o
 - c. al menos una vitamina hidrosoluble, y/o
 - d. al menos un oligoelemento.
15. Aditivo de pienso para animales según la reivindicación 14, que comprende además amilasa, fitasa, xilanasas, galactanasas, alfa-galactosidasas, proteasa, fosfolipasa, y/o beta-glucanasas.
16. Pienso para animales con un contenido bruto de proteína de 50 a 800 g/kg y que comprende al menos una proteasa de cualquiera de las reivindicaciones 1-3.
17. Método para el tratamiento de proteínas, que comprende el paso de añadir al menos una proteasa según cualquiera de las reivindicaciones 1-3 a al menos una proteína o fuente de proteína.

18. Método según la reivindicación 17, donde la soja está incluida en al menos una fuente de proteína.
19. Uso de al menos una proteasa según cualquiera de las reivindicaciones 1-3 en detergentes.
- 5 20. Composición de pienso para animales que comprende el polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-3.
- 10 21. Composición de pienso para animales según la reivindicación 20, que comprende además una o más amilasas, fitasas, xilanasas, galactanasas, alfa-galactosidasas, proteasas, fosfolipasas, beta-glucanasas o cualquier mezcla de las mismas.

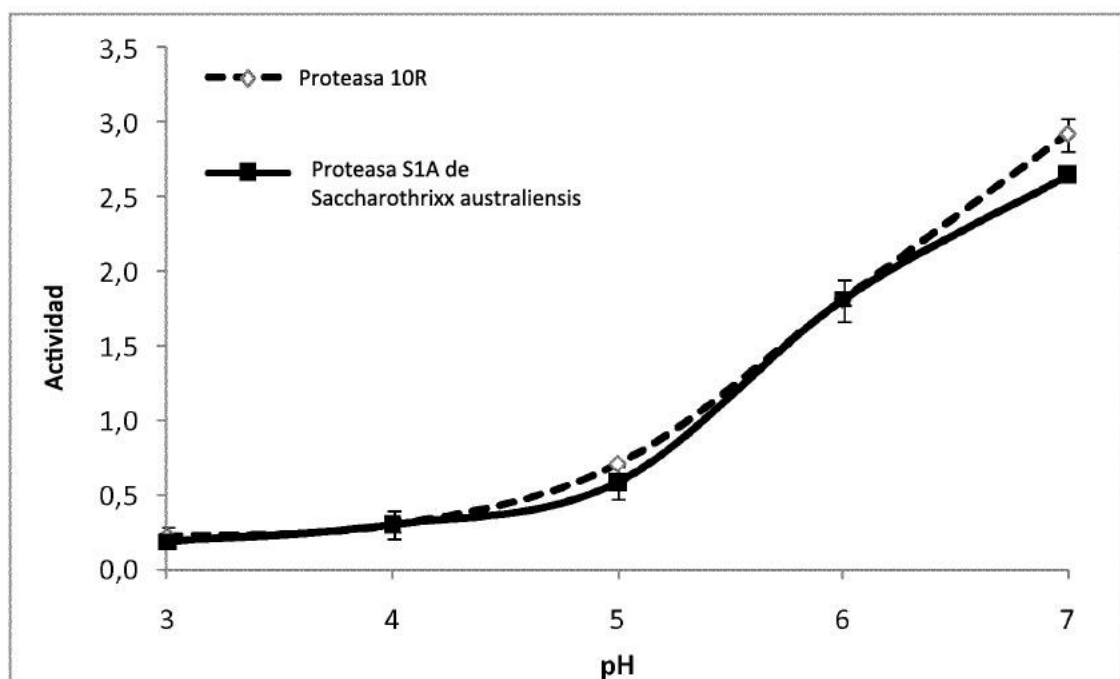


Fig. 1