(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 694 398**

(51) Int. Cl.:

C11D 3/386 (2006.01)
C12N 9/54 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.05.2011** **PCT/US2011/035389**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **10.11.2011** **WO11140364**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.05.2011** **E 11730124 (2)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.08.2018** **EP 2566961**

(54) Título: **Composiciones y métodos que comprenden variantes de subtilisina**

(30) Prioridad:

12.10.2010 US 392188 P
12.10.2010 US 392364 P
06.05.2010 US 332006 P
06.05.2010 US 332151 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.12.2018

(73) Titular/es:

DANISCO US INC. (50.0%)
925 Page Mill Road
Palo Alto, CA 94304, US y
THE PROCTER & GAMBLE COMPANY (50.0%)

(72) Inventor/es:

ALEKSEYEV, VIKTOR YURYEVICH;
AMIN, NEELAM, S.;
AUGUSTYN, KATHERINE;
CASCAO-PEREIRA, LUIS GUSTAVO;
COLLIER, KATHERINE, D.;
ESTELL, DAVID, A.;
KELLIS, JR., JAMES, T.;
POULOSE, AYROOKARAN, J.;
SOUTER, PHILIP FRANK;
WARD, GLENN STEVEN y
YAO, JIAN

(74) Agente/Representante:

RIZZO , Sergio

ES 2 694 398 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

Composiciones y métodos que comprenden variantes de subtilisina

CAMPO DE LA INVENCIÓN

[0001] La presente invención da a conocer variantes de serina proteasa. En concreto, la presente invención da a conocer variantes de serina proteasa que presentan una o más sustituciones en comparación con una serina proteasa de referencia. Además, la presente invención da a conocer composiciones que comprenden estas variantes de serina proteasa. En algunas formas de realización, la presente invención da a conocer composiciones de limpieza que comprenden al menos una de estas variantes de serina proteasa.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

[0002] Aunque las serina proteasas se conocen desde hace tiempo en la técnica de las enzimas industriales, subsiste una necesidad de obtener proteasas modificadas que sean adecuadas para condiciones y usos concretos.

[0003] En el documento WO 99/20771 se describen variantes de serina proteasa derivadas de especies de bacilo que contienen una o más sustituciones que alteran la carga total de dicha proteasa, provocando que dicha proteasa presente una mayor efectividad en composiciones detergentes que la versión previa de una serina proteasa.

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

[0004] La presente invención da a conocer variantes de serina proteasa según se define en la reivindicación 1. Además, la presente invención da a conocer composiciones que comprenden estas variantes de serina proteasa. En algunas formas de realización, la presente invención da a conocer composiciones de limpieza que comprenden al menos una de estas variantes de serina proteasa según se define en las reivindicaciones anexas.

[0005] La presente invención da a conocer variantes de subtilisina aisladas según se define en la reivindicación 1.

[0006] La presente descripción también da a conocer variantes de proteasa que presentan una o más de las siguientes características: a) un índice de rendimiento del Método de Ensayo 2 de al menos 1,1, al menos 1,2, al menos 1,3, al menos 1,4, al menos 1,5, al menos 1,6, al menos 1,7, al menos 1,8, al menos 1,9, al menos 2, desde 1,1 hasta aproximadamente 10, desde 1,1 hasta aproximadamente 8, o incluso desde 1,1 hasta aproximadamente 5; b) un índice de rendimiento del Método de Ensayo 3 de al menos 1,1, al menos 1,2, al menos 1,3, al menos 1,4, al menos 1,5, al menos 1,6, al menos 1,7, al menos 1,8, al menos 1,9, al menos 2, desde 1,1 hasta aproximadamente 10, desde 1,1 hasta aproximadamente 8, o incluso desde 1,1 hasta aproximadamente 5; c) un índice de rendimiento del Método de Ensayo 4 de al menos 1,0, al menos 1,1, al menos 1,2, al menos 1,3, al menos 1,4, al menos 1,5, al menos 1,6, al menos 1,7, al menos 1,8, al menos 1,9, al menos 2, desde 1,0 hasta aproximadamente 10, desde 1,0 hasta aproximadamente 8, o incluso desde 1,0 hasta aproximadamente 5; y/o d) un índice de rendimiento del Método de Ensayo 6 de al menos 1,0, al menos 1,1, al menos 1,2, al menos 1,3, al menos 1,4, al menos 1,5, al menos 1,6, al menos 1,7, al menos 1,8, al menos 1,9, al menos 2, desde 1,0 hasta aproximadamente 10, desde 1,0 hasta aproximadamente 8, o incluso desde 1,0 hasta aproximadamente 5.

[0007] La presente invención también da a conocer ácidos nucleicos aislados que comprenden secuencias polinucleotídicas que codifican las variantes de subtilisina reivindicadas. La presente invención da a conocer además vectores de expresión que comprenden las secuencias de ácidos nucleicos que codifican las variantes de subtilisina dadas a conocer en el presente documento. En algunas formas de realización adicionales, el ácido nucleico en el vector de expresión está ligado de forma operativa a un promotor. La presente invención también da a conocer células hospedadoras que comprenden los vectores de expresión expuestos en el presente documento. En algunas formas de realización, las células hospedadoras son células hospedadoras de *Bacillus*. En algunas formas de realización adicionales, las células hospedadoras son células hospedadoras de *B. subtilis*.

[0008] La presente invención también da a conocer métodos para producir al menos una variante de subtilisina, que comprenden: transformar una célula hospedadora con un vector de expresión que comprende al menos un ácido nucleico que codifica al menos una variante de subtilisina dada a conocer en el presente documento para producir una célula hospedadora transformada; y cultivar la célula hospedadora transformada en condiciones adecuadas para la producción de al menos una variante de subtilisina, para producir al menos una variante de subtilisina. En algunas formas de realización, los métodos comprenden además extraer la variante de subtilisina producida. En algunas formas de realización adicionales, el ácido nucleico está ligado de forma operativa en el vector de expresión a un promotor. En algunas formas de realización adicionales, el ácido nucleico está ligado de forma operativa en el vector de expresión a un promotor. La presente invención también da a conocer células hospedadoras que comprenden los vectores de expresión dados a conocer en el presente documento. En algunas formas de realización, las células hospedadoras son células hospedadoras de *Bacillus*. En algunas formas de realización adicionales, las células hospedadoras son células hospedadoras de *B. subtilis*.

[0009] La presente invención da a conocer también composiciones de limpieza que comprenden al menos una variante de subtilisina según se define en las reivindicaciones. En algunas formas de realización, las composiciones de limpieza son una composición granulada, en polvo, sólida, en barra, líquida, en pastillas, en gel o en pasta. En algunas formas de realización adicionales, las composiciones de limpieza son composiciones detergentes. En todavía algunas formas de realización adicionales, las composiciones de limpieza son composiciones detergentes de agua fría, composiciones detergentes de pH bajo, y/o composiciones detergentes compactas. En algunas formas de realización adicionales, las composiciones de limpieza son composiciones detergentes para ropa, composiciones detergentes para vajilla, y/o composiciones detergentes para superficies duras. En algunas formas de realización adicionales, los detergentes para vajilla son composiciones detergentes lavavajillas a mano, o composiciones detergentes para lavavajillas automático. En algunas formas de realización adicionales, las composiciones de limpieza son composiciones detergentes para ropa. En todavía algunas formas de realización adicionales, las composiciones de limpieza comprenden además al menos un agente blanqueador. En algunas formas de realización adicionales, las composiciones de limpieza son sin fosfato, mientras que en otras formas de realización las composiciones de limpieza contienen fosfato. En algunas formas de realización adicionales, las composiciones de limpieza comprenden además al menos una enzima adicional. En todavía algunas formas de realización adicionales, en las composiciones de limpieza la al menos una enzima adicional se selecciona del grupo que consiste en hemicelulasas, celulasas, peroxidasas, proteasas, metaloproteasas, xilanasas, lipasas, fosfolipasas, esterasas, perhidrolasas, cutinasas, pectinasas, pectato liasas, mananasas, queratinasas, reductasas, oxidasas, fenoloxidasas, lipoxigenasas, ligninasas, pululanasas, tanasas, pentosanasas, malanasas, β-glucanasas, arabinosidasas, hialuronidasas, condroitinasas, lacasas, y amilasas, o cualquier combinación de estas. Tal composición puede no ser un producto de limpieza para tejidos y para el hogar.

[0010] La presente invención da a conocer también métodos de limpieza, que comprenden poner en contacto una superficie o un artículo con una composición de limpieza que comprende al menos una variante de subtilisina según se define en las reivindicaciones. En algunas formas de realización, los métodos de limpieza comprenden poner en contacto una superficie o un artículo con al menos una composición de limpieza dada a conocer en el presente documento. En algunas formas de realización, los métodos comprenden además enjuagar la superficie o el artículo tras poner en contacto la superficie o el artículo, respectivamente, con la composición de limpieza. En algunas formas de realización, el artículo es de vajilla, mientras que, en otras formas de realización, el artículo es un tejido. En algunas formas de realización, los métodos comprenden además la etapa de enjuagar la superficie o el artículo tras poner en contacto la superficie o el artículo con la composición de limpieza. En algunas formas de realización adicionales, los métodos comprenden además la etapa de secar la superficie o el artículo tras enjuagar la superficie o el artículo. En algunas formas de realización, las composiciones de limpieza comprenden al menos una variante de subtilisina que no es una proteasa de agua fría.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0011]

La figura 1 da a conocer un alineamiento de las proteasas de referencia maduras, que incluyen: BPN' (SEQ ID N.º 1) y GG36 (SEQ ID N.º 2). Cada posición de aminoácido de cada variante de proteasa descrita en el presente documento, incluyendo cada variante de proteasa de agua fría, se numera conforme a la numeración de la posición de aminoácido correspondiente en la secuencia de aminoácidos de la proteasa subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens* (SEQ ID N.º 1), como se muestra en la figura 1, determinada por el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la variante de proteasa con la secuencia de aminoácidos de la proteasa subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens.* Así, a no ser que se especifique otra cosa en el presente documento, las posiciones de sustitución se proporcionan en relación con BPN'.

La figura 2 muestra un mapa de pHPLT-GG36.

La figura 3 muestra un mapa de pRA68.

La figura 4 muestra un mapa de pRA96.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

[0012] La presente invención da a conocer variantes de serina proteasa conforme a lo definido en la reivindicación 1. Además, la presente invención da a conocer composiciones que comprenden estas variantes de serina proteasa. En algunas formas de realización, la presente invención da a conocer composiciones de limpieza que comprenden al menos una de estas variantes de serina proteasa.

Definiciones

[0013] A no ser que se indique otra cosa, la práctica de la presente invención implica técnicas convencionales utilizadas habitualmente en biología molecular, ingeniería de proteínas, microbiología, y ADN recombinante, que se encuentran dentro del nivel de conocimiento de la técnica. Dichas técnicas resultan conocidas para los

expertos en la materia y se describen en numerosas obras de referencia y textos conocidos para los expertos en la materia.

[0014] Salvo que se defina de otro modo en el presente documento, todos los términos científico-técnicos empleados poseen en el presente texto el mismo significado que el que entienden comúnmente los expertos en la materia a la que pertenece esta invención. Los expertos en la materia conocen muchos diccionarios técnicos. Aunque cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en el presente documento se puede utilizar en la práctica de la presente invención, en el presente documento se describen algunos métodos y materiales adecuados. Por consiguiente, los términos definidos justo a continuación se encuentran definidos de manera más completa en referencia a la Memoria en su conjunto. Asimismo, tal como se utilizan en el presente documento, los términos singulares “un”, “una”, “el” y “la” incluyen la referencia al plural salvo que el contexto indique claramente lo contrario. Los intervalos numéricos incluyen los números que definen el intervalo. Salvo que se indique de otro modo, los ácidos nucleicos están escritos de izquierda a derecha en una orientación de 5’ a 3’; las secuencias de aminoácidos están escritas de izquierda a derecha en una orientación de amino a carboxi, respectivamente. Se entiende que la presente invención no se encuentra limitada a la metodología, protocolos y reactivos concretos descritos, puesto que estos pueden variar en función del contexto en que sean utilizados por los expertos en la materia.

[0015] La práctica de la presente invención emplea, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de purificación de proteínas, biología molecular, microbiología, técnicas de ADN recombinante y secuenciación de proteínas, todas ellas incluidas en el conocimiento de los expertos en la materia.

[0016] Asimismo, los encabezados proporcionados en el presente documento no constituyen limitaciones a los diversos aspectos o formas de realización de la invención, que pueden tomarse por referencia a la memoria descriptiva en su conjunto. Por consiguiente, los términos definidos inmediatamente a continuación se definen de forma más completa con referencia a la memoria descriptiva en su conjunto. No obstante, con el fin de facilitar la comprensión de la invención, se definen a continuación una serie de términos.

[0017] Según se utiliza en el presente documento, los términos “proteasa” y “proteinasa” se refieren a una proteína enzimática que presenta la capacidad de descomponer otras proteínas. Una proteasa posee la capacidad de llevar a cabo la “proteólisis”, que inicia el catabolismo de proteínas mediante la hidrólisis de enlaces peptídicos que unen aminoácidos entre sí en una cadena de péptidos o polipéptidos que forma la proteína. Esta actividad de una proteasa como una enzima capaz de digerir proteínas se denomina “actividad proteolítica”. Existen numerosos procedimientos conocidos para medir la actividad proteolítica (véase, p. ej., Kalisz, “Microbial Proteinases”, en: Fiechter (ed.), Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, [1988]). Por ejemplo, se puede determinar la actividad proteolítica mediante ensayos comparativos que analizan la capacidad de la proteasa respectiva para hidrolizar un sustrato comercial. Entre los ejemplos de sustratos útiles para el análisis de actividad de proteasa o proteolítica incluyen, sin carácter limitativo, dimetil caseína (Sigma C-9801), colágeno bovino (Sigma C-9879), elastina bovina (Sigma E-1625) y queratina bovina (ICN Biomedical 902111). Los ensayos colorimétricos que utilizan estos sustratos se conocen bien en la técnica (véase, p. ej., WO 99/34011 y la patente estadounidense n.º 6,376,450. El ensayo pNA (véase p. ej., Del Mar *et al.*, Anal. Biochem. 99:316-320 [1979]) también se utiliza para determinar la concentración de enzima activa en las fracciones recogidas durante la elución en gradiente. Este ensayo mide la tasa con la que se libera p-nitroanilina conforme la enzima hidroliza el sustrato sintético soluble, succinil-alanina-alanina-prolina-fenilalanina-p-nitroanilida (suc-AAPF-pNA). La tasa de producción de color amarillo a partir de la reacción de hidrólisis se mide a 410 nm en un espectrofotómetro y es proporcional a la concentración de enzima activa. Además, las mediciones de absorbancia a 280 nanómetros (nm) se pueden utilizar para determinar la concentración total de proteínas. La proporción de enzimas activas/proteínas totales proporciona la pureza enzimática.

[0018] Según se utiliza en el presente documento, el término “subtilisina” hace referencia a cualquier miembro de la familia de serina proteasa S8 conforme a lo descrito en MEROPS - la base de datos de peptidasas (véase, Rawlings *et al.*, MEROPS: the peptidase database, Nucl Acids Res, n.º 34 de la base de datos, D270-272 [2006]). Según lo descrito en ese documento, la familia de peptidasa S8 contiene la subtilisina serina endopeptidasa y sus homólogos (Rawlings y Barrett, Biochem J., 290:205-218 [1993]). La familia S8, también conocida como la familia subtilasa, es la segunda familia más grande de serina peptidasas. Actualmente, se han determinado las estructuras terciarias de varios miembros de la familia S8. Una estructura proteica S8 típica consta de tres capas con una lámina β de siete cadenas situada entre dos capas de hélices. La subtilisina (S08.001) es el tipo de estructura del clan SB (SB). A pesar de que presentan distinta estructura, los sitios activos de subtilisina y quimotripsina (S01.001) pueden estar superpuestos, lo cual sugiere que la similitud es el resultado de la evolución convergente en lugar de divergente.

[0019] Según se utilizan en el presente documento, los términos “variante de proteasa”, “proteasa variante”, “variante de serina proteasa”, “serina proteasa variante”, “variante de subtilisina”, “proteasa mutante”, se utilizan para referirse a proteasas que son similares a una proteasa de referencia (que puede ser una proteasa subtilisina natural), sobre todo en cuanto a su función, pero presentan mutaciones en su secuencia de aminoácidos que las hace diferentes en su secuencia respecto a la proteasa de tipo natural o a cualquier proteasa inicial de referencia (esto es, proteasa “parental”) de la que derive la variante de proteasa. En algunas formas de realización, la

presente invención da a conocer “variantes GG36” (o “variantes de subtilisina GG36”), donde las mutaciones están presentes en la secuencia GG36 madura expuesta en la SEQ ID N.º 2. Sin embargo, no se pretende que la proteasa de referencia se limite a ninguna secuencia de aminoácidos concreta. Además, se pretende que el término abarque variantes de una proteasa parental donde la secuencia de la proteasa parental sea al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, o un 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 2.

[0020] Según se utiliza en el presente documento, el término “variante de proteasa de agua fría” hace referencia a una variante de proteasa de una proteasa parental, donde la proteasa subtilisina GG36 de *B. lentus* presenta la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º 2, donde dicha variante de proteasa presenta una o más de las siguientes características: a) un índice de rendimiento del Método de Ensayo 2 de al menos 1,1, al menos 1,2, al menos 1,3, al menos 1,4, al menos 1,5, al menos 1,6, al menos 1,7, al menos 1,8, al menos 1,9, al menos 2, desde 1,1 hasta aproximadamente 10, desde 1,1 hasta aproximadamente 8, o incluso desde 1,1 hasta aproximadamente 5; b) un índice de rendimiento del Método de Ensayo 3 de al menos 1,1, al menos 1,2, al menos 1,3, al menos 1,4, al menos 1,5, al menos 1,6, al menos 1,7, al menos 1,8, al menos 1,9, al menos 2, desde 1,1 hasta aproximadamente 10, desde 1,1 hasta aproximadamente 8, o incluso desde 1,1 hasta aproximadamente 5; c) un índice de rendimiento del Método de Ensayo 4 de al menos 1,0, al menos 1,1, al menos 1,2, al menos 1,3, al menos 1,4, al menos 1,5, al menos 1,6, al menos 1,7, al menos 1,8, al menos 1,9, al menos 2, desde 1,0 hasta aproximadamente 10, desde 1,0 hasta aproximadamente 8, o incluso desde 1,0 hasta aproximadamente 5; y/o d) un índice de rendimiento del Método de Ensayo 6 de al menos 1,1, al menos 1,2, al menos 1,3, al menos 1,4, al menos 1,5, al menos 1,6, al menos 1,7, al menos 1,8, al menos 1,9, al menos 2, desde 1,0 hasta aproximadamente 10, desde 1,0 hasta aproximadamente 8, o incluso desde 1,0 hasta aproximadamente 5. El Método de Ensayo 2, el Método de Ensayo 3, el Método de Ensayo 4 y el Método de Ensayo 6 se describen expresamente más adelante en la sección de Ejemplo 1 titulada “Métodos de Ensayo”. Además, se pretende que el término abarque variantes de una proteasa parental donde la secuencia de la proteasa parental sea al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, o un 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º 2.

[0021] En algunos aspectos de la presente descripción, la proteasa parental (esto es, la proteasa “de referencia” o “inicial”) es una proteasa comercializada, incluyendo, sin carácter limitativo, las proteasas comercializadas con los nombres comerciales SAVINASE®, POLARZYME®, KANNASE®, LIQUINASE®, LIQUINASE ULTRA®, SAVINASE ULTRA®, OVOZYME®, (de Novozymes A/S); MAXACAL®, PROPERASE®, PURAFECT®, FN3®, FN4® y PURAFECT OXP®, PURAFAST™, PURAFECT® PRIME, PURAMAX® (de Danisco US, Genencor Division); y las disponibles a través de Henkel/Kemira, a saber, BLAP (secuencia que se muestra en la figura 29 del documento US 5,352,604 con las siguientes mutaciones S99D + S101 R + S103A + V104I + G159S, denominada a partir de ahora BLAP) y BLAP X (BLAP con S3T + V4I + V205I).

[0022] Según se utiliza en el presente documento, el término “polipéptido variante” hace referencia a un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que difiere en al menos un residuo de aminoácido de la secuencia de aminoácidos de un polipéptido parental o de referencia (incluyendo, sin carácter limitativo, polipéptidos de tipo natural).

[0023] Tal como se utiliza en el presente documento, “el género *Bacillus*” incluye todas las especies del género “*Bacillus*”, como bien saben los expertos en la materia, incluyendo, sin carácter limitativo, *B. subtilis, B. licheniformis, B. lentus, B. brevis, B. stearothermophilus, B. alcalophilus*, *B. amyloliquefaciens, B. clausii, B. halodurans, B. megaterium, B. coagulans, B. circulans, B. lautus,* y *B. thuringiensis.* Se reconoce que el género *Bacillus* se sigue sometiendo a reorganización taxonómica. Por lo tanto, se pretende que el género incluya especies que hayan sido reclasificadas, incluyendo, sin carácter limitativo, organismos tales como *B. stearothermophilus*, que actualmente se denomina “*Geobacillus stearothermophilus*”. La producción de endosporas resistentes en presencia de oxígeno se considera la característica definitoria del género *Bacillus*, aunque esta característica también se aplica a los recién mencionados *Alicyclobacillus, Amphibacillus, Aneurinibacillus, Anoxybacillus, Brevibacillus, Filobacillus, Gracilibacillus, Halobacillus, Paenibacillus, Salibacillus, Thermobacillus, Ureibacillus* y *Virgibacillus.*

[0024] Los términos “polinucleótido” y “ácido nucleico”, que se utilizan indistintamente en el presente documento, hacen referencia a un polímero de cualquier longitud de nucleótidos monómeros unidos de forma covalente en una cadena. El ADN (ácido desoxirribonucleico), un polinucleótido que comprende desoxirribonucleótidos, y el ARN (ácido ribonucleico), un polímero de ribonucleótidos, son ejemplos de polinucleótidos o ácidos nucleicos que presentan distinta función biológica. Los polinucleótidos o ácidos nucleicos incluyen, sin carácter limitativo, un ADN de cadena simple, doble o triple, ADN genómico, ADNc, híbrido ADN-ARN, o un polímero que comprenda bases de purina y pirimidina, u otras bases de nucleótidos naturales, modificadas de forma química o bioquímica, no naturales o derivatizadas. A continuación, se indican ejemplos no limitativos de polinucleótidos: genes, fragmentos de genes, fragmentos cromosómicos, marcador(es) de secuencia expresada (EST, por sus siglas en inglés), exones, intrones, ARN mensajero (ARNm), ARN de transferencia (ARNt), ARN ribosómico (ARNr), ribozimas, ADN complementario (ADNc), polinucleótidos recombinantes, polinucleótidos ramificados, plásmidos, vectores, ADN aislado de cualquier secuencia, ARN aislado de cualquier secuencia, sondas de ácido nucleico, y cebadores. En algunas formas de realización, los polinucleótidos comprenden nucleótidos

modificados, tales como nucleótidos metilados y análogos de nucleótidos, uracilo, otros azúcares y grupos de unión tales como fluororribosa y tioato, y ramas de nucleótidos. En una forma de realización concreta, se interrumpe una secuencia de nucleótidos con componentes no nucleotídicos.

[0025] Según se utiliza en el presente documento, el término “mutación” hace referencia a cambios realizados en una secuencia de aminoácidos o de ácidos nucleicos de partida. Se pretende que el término abarque sustituciones, inserciones y deleciones.

[0026] Según se utiliza en el presente documento, el término “vector” hace referencia a un constructo de ácido nucleico o constructo de polinucleótido utilizado para introducir o transferir ácido(s) nucleico(s) o polinucleótido(s) en una célula o tejido diana. Un vector se utiliza normalmente para introducir ADN exógeno en otra célula o tejido. Un vector comprende por lo general una secuencia de ADN que es un transgén y una secuencia de polinucleótidos más grande que actúa como el “esqueleto” del vector. El vector sirve normalmente para transferir información genética, tal como el transgén insertado, a una célula o tejido diana con el fin de aislar, multiplicar o expresar el inserto en la célula o tejido diana. Entre los vectores se incluyen plásmidos, vectores de clonación, bacteriófagos, virus (p. ej., vector viral), cósmidos, vectores de expresión, vectores lanzadera, casetes, etc. Un vector incluye normalmente un origen de replicación, un sitio de clonación múltiple, y un marcador seleccionable. El proceso para insertar un vector en una célula diana se denomina normalmente transfección. La transfección de una célula con un vector viral se denomina normalmente transducción. La presente invención incluye, en algunas formas de realización, un vector que comprende una secuencia de ADN que codifica una variante de proteasa definida en las reivindicaciones que está ligada de forma operativa a una prosecuencia adecuada (*p. ej.*, de secreción, secuencia de péptido señal, etc.) capaz de efectuar la expresión de la secuencia de ADN en un hospedador adecuado.

[0027] Tal como se utiliza en el presente documento, el término “casete de expresión”, “plásmido de expresión” o “vector de expresión” hace referencia a un constructo de ácido nucleico o vector generado de manera recombinante o sintética para la expresión de un ácido nucleico de interés (p. ej., un transgén o ácido nucleico exógeno) en una célula diana. El ácido nucleico de interés expresa normalmente una proteína de interés. Un vector de expresión o casete de expresión comprende normalmente una secuencia nucleotídica promotora que conduce o impulsa la expresión del ácido nucleico exógeno. El vector o casete de expresión también incluye normalmente cualquier otro elemento de ácido nucleico especificado que permita la transcripción de un ácido nucleico concreto en una célula diana. Un casete de expresión recombinante se puede incorporar en un plásmido, cromosoma, ADN mitocondrial, ADN plastidial, virus, o fragmento de ácido nucleico. Algunos vectores de expresión poseen la capacidad de incorporar y expresar fragmentos de ADN heterólogos en una célula hospedadora. Se comercializan muchos vectores de expresión procariotas y eucariotas. La selección de vectores de expresión adecuados se encuadra dentro del conocimiento de los expertos en la materia. La selección de vectores de expresión apropiados para la expresión de una proteína de una secuencia de ácido nucleico incorporada en el vector de expresión se incluye en los conocimientos de los expertos en la materia.

[0028] Un constructo de ADN es un segmento de ácido nucleico construido de forma artificial que se puede introducir en una célula o tejido diana. Un constructo de ADN comprende normalmente un inserto de ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de interés que ha sido subclonada en un vector. El vector puede contener genes de resistencia bacteriana para su crecimiento en bacterias y un promotor para la expresión de la proteína de interés en un organismo. El ADN se puede generar *in vitro* mediante PCR o cualquier otra(s) técnica(s) conocida(s) por los expertos en la materia. En algunas formas de realización, el constructo de ADN comprende una secuencia de ácido nucleico de interés. En algunas formas de realización, la secuencia se encuentra ligada de forma operativa a elementos adicionales, tales como elementos de control (p. ej., promotores, etc.). El constructo de ADN puede comprender además un marcador seleccionable y puede comprender también una secuencia de entrada flanqueada por cajas de homología. El constructo puede comprender otras secuencias no homólogas, añadidas a los extremos (p. ej., secuencias o flancos de relleno). En algunas formas de realización, los extremos de la secuencia están cerrados, de tal forma que el constructo de ADN forma un círculo cerrado. La secuencia de ácido nucleico de interés, que se incorpora en el constructo de ADN utilizando técnicas conocidas en el ámbito de especialización, puede ser un ácido nucleico de tipo natural, mutante o modificado. En algunas formas de realización, el constructo de ADN comprende una o más secuencias de ácido nucleico homóloga(s) respecto al cromosoma de la célula hospedadora. En otras formas de realización, el constructo de ADN comprende una o más secuencias nucleotídicas no homólogas. Una vez ensamblado el constructo de ADN *in vitro*, se puede utilizar, por ejemplo, para: 1) insertar secuencias heterólogas en una secuencia diana deseada de una célula hospedadora; y/o 2) mutagenizar una región del cromosoma de la célula hospedadora (esto es, sustituir una secuencia endógena por una secuencia heteróloga); 3) delecionar genes diana; y/o 4) introducir un plásmido de replicación en el hospedador. En el presente documento, “constructo de ADN” se emplea indistintamente con “casete de expresión”.

[0029] Tal como se utiliza en el presente documento, un “plásmido” hace referencia a una molécula de ADN extracromosómico que es capaz de replicarse de forma independiente al ADN cromosómico. Un plásmido es bicatenario (ds) y puede ser circular, y se utiliza normalmente como un vector de clonación.

[0030] Tal como se utiliza en el presente documento en el contexto de introducción de una secuencia de ácido nucleico en una célula, el término “introducido” se refiere a cualquier método adecuado para transferir la secuencia de ácido nucleico en la célula. Dichos métodos de introducción incluyen, sin carácter limitativo, fusión de protoplastos, transfección, transformación, electroporación, conjugación y transducción (véase, p. ej., Ferrari *et al.*, “Genetics”, en Hardwood *et al.* (eds.), Bacillus, Plenum Publishing Corp., pp. 57-72 [1989]).

[0031] La transformación hace referencia a la alteración genética de una célula como resultado de la absorción, la incorporación genómica y la expresión de material genético (p. ej., ADN).

[0032] Según se utiliza en el presente documento, un ácido nucleico está “ligado de forma operativa” a otra secuencia de ácido nucleico cuando se establece una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, un promotor o potenciador se encuentra ligado de forma operativa a una secuencia que codifica nucleótidos si el promotor afecta a la transcripción de la secuencia codificante. Un sitio de unión al ribosoma se puede encontrar ligado de forma operativa a una secuencia codificante si se sitúa de tal forma que facilite la traducción de la secuencia codificante. Normalmente, las secuencias de ADN “ligadas de forma operativa” son contiguas. No obstante, los potenciadores no tienen por qué ser contiguos. El vínculo se logra mediante ligación en sitios de restricción convenientes. Si dichos sitios no existen, se pueden utilizar conectores o adaptadores de oligonucleótidos sintéticos conforme a la práctica convencional.

[0033] Según se utiliza en el presente documento, el término “gen” hace referencia a un polinucleótido (p. ej., un segmento de ADN) que codifica un polipéptido e incluye regiones anteriores y posteriores a las regiones codificantes, así como secuencias intervinientes (intrones) entre segmentos codificantes individuales (exones).

[0034] Según se utiliza en el presente documento, “recombinante”, al emplearse en referencia a una célula, indica normalmente que la célula ha sido modificada mediante la introducción de una secuencia de ácido nucleico heteróloga o que la célula deriva de una célula modificada de esta forma. Por ejemplo, una célula recombinante puede comprender un gen no hallado de manera idéntica en la forma nativa (no recombinante) de la célula, o una célula recombinante puede comprender un gen nativo (hallado en la forma nativa de la célula) pero que haya sido modificado y reintroducido en la célula. Una célula recombinante puede comprender un ácido nucleico endógeno de la célula que haya sido modificada sin extraer el ácido nucleico de la célula; tales modificaciones incluyen las obtenidas mediante sustitución génica, mutación específica del sitio, y técnicas relacionadas conocidas por los expertos en la materia. La tecnología de ADN recombinante incluye técnicas para la producción de ADN recombinante *in vitro* y la transferencia del ADN recombinante a células en las que este se puede expresar o propagar, produciendo así un polipéptido recombinante. “Recombinar”, “recombinado/a(s)” y “recombinación” de polinucleótidos o ácidos nucleicos hace referencia por lo general al conjunto o combinación de dos o más cadenas o fragmentos de ácidos nucleicos o de polinucleótidos para generar un nuevo polinucleótido o ácido nucleico. El polinucleótido o ácido nucleico recombinante se denomina en ocasiones quimera. Un ácido nucleico o polipéptido es “recombinante” cuando es artificial o está modificado, o deriva de una proteína o ácido nucleico artificial o modificado/a.

[0035] En el sentido en que se usa en el presente documento, el término “amplificación” génica o de ácidos nucleicos designa un proceso mediante el cual se replican desproporcionadamente secuencias de ADN específicas de tal modo que el ácido nucleico o gen amplificado se torna presente en un mayor número de copias que en las que estaba presente al principio en el genoma. En algunas formas de realización, la selección de células mediante cultivo en presencia de un fármaco (p. ej., un inhibidor de una enzima que se puede inhibir) da lugar a la amplificación del gen endógeno que codifica el producto génico necesario para el cultivo en presencia del fármaco o a la amplificación de secuencias exógenas (es decir, de entrada) que codifican este producto génico o de ácido nucleico, o a ambas.

[0036] La “amplificación” es un caso especial de replicación de ácido nucleico que implica la especificidad de molde. Se ha de contrastar con la replicación de molde no específica (es decir, replicación que depende del molde pero que no depende de un molde específico). La especificidad de molde se distingue en este caso de la fidelidad de replicación (es decir, la síntesis de la secuencia polinucleotídica apropiada) y de la especificidad de nucleótido (ribonucleótido o desoxirribonucleótido). La especificidad de molde se describe frecuentemente en cuanto a la especificidad de “diana”. Las secuencias diana son “dianas” en el sentido de que se busca diferenciarlas de otro ácido nucleico. Las técnicas de amplificación se han diseñado principalmente para esta diferenciación.

[0037] Tal como se utiliza en el presente documento, el término “cebador” hace referencia a un oligonucleótido (un polímero de residuos nucleotídicos), ya sea de origen natural como en una digestión de restricción purificada o que esté producido de forma sintética, que es capaz de actuar como punto de iniciación de la síntesis cuando se pone en condiciones en las que se induce la síntesis de un producto de extensión de cebador que es complementario a una cadena de ácido nucleico (esto es, en presencia de nucleótidos y de un agente inductor tal como ADN polimerasa y con una temperatura y pH adecuados). Un cebador es preferiblemente monocatenario para lograr una eficacia máxima en la amplificación, aunque, de manera alternativa, puede ser bicatenario. En caso de que sea bicatenario, se trata en primer lugar el cebador para separar sus hebras antes de que se utilicen para preparar productos de extensión. En algunas formas de realización, el cebador es un oligodesoxirribonucleótido. El cebador debe ser lo suficientemente largo como para iniciar la síntesis de

productos de extensión en presencia del agente inductor. La longitud exacta de un cebador depende de diversos factores, entre los que se incluye la temperatura, el origen del cebador y el uso del método.

[0038] En el sentido en que se utiliza en el presente documento, el término “sonda” hace referencia a un oligonucleótido, ya sea de origen natural o en una digestión de restricción purificada o que esté producido de forma sintética, recombinante o mediante amplificación por PCR, que normalmente es capaz de hibridar con otro oligonucleótido de interés. Una sonda puede ser monocatenaria o bicatenaria. Las sondas resultan útiles para detectar, identificar y aislar secuencias de genes concretos. Se contempla que cualquier sonda utilizada en la presente invención estará marcada con cualquier “molécula informadora”, de modo que sea detectable en cualquier sistema de detección, entre los que se incluyen, sin carácter limitativo, sistemas enzimáticos (p. ej., ELISA, así como ensayos histoquímicos basados en enzimas), fluorescentes, radiactivos y luminiscentes. No se pretende que la presente invención esté limitada a ningún sistema de detección ni marca en concreto.

[0039] En el sentido en que se utiliza en el presente documento, el término “diana”, al utilizarse en referencia a la reacción en cadena de la polimerasa, designa la región del ácido nucleico unida por los cebadores empleados para la reacción en cadena de la polimerasa. Por tanto, se busca diferenciar la “diana” de otras secuencias de ácido nucleico. Un “segmento” de nucleótido es una región de un ácido nucleico dentro de la secuencia de ácido nucleico diana.

[0040] Tal como se utiliza en el presente documento, el término “reacción en cadena de la polimerasa” (PCR) hace referencia a los métodos de las patentes estadounidenses n.os 4,683,195 4,683,202, y 4,965,188 que incluyen métodos para aumentar la concentración de un segmento de una secuencia diana en una mezcla de ADN genómico sin clonar ni purificar. Este proceso para amplificar la secuencia diana es muy conocida en la técnica.

[0041] Tal como se utiliza en el presente documento, el término “reactivos de amplificación” se refiere a aquellos reactivos (p. ej., trifosfatos de desoxirribonucleótido, tampón, etc.) necesarios para la amplificación salvo los cebadores, el molde de ácido nucleico y la enzima de amplificación. Normalmente, los reactivos de amplificación, junto con otros componentes de reacción, están dispuestos y contenidos en un recipiente de reacción (tubo de ensayo, micropocillo, etc.).

[0042] Según se utiliza en el presente documento, el término “endonucleasa de restricción” o “enzima de restricción” hace referencia a una enzima (p. ej., enzima bacteriana) que es capaz de cortar ADN bicatenario o monocatenario en una secuencia de nucleótidos específica, o cercana a esta, conocida como sitio de restricción. La secuencia de nucleótidos que comprende el sitio de restricción se reconoce y se escinde mediante una endonucleasa de restricción o enzima de restricción determinada y habitualmente es el sitio para la inserción de fragmentos de ADN. Un sitio de restricción se puede modificar en un vector de expresión o constructo de ADN.

[0043] La “recombinación homóloga” hace referencia al intercambio de fragmentos de ADN entre dos moléculas de ADN o pares de cromosomas en el sitio de secuencias de nucleótidos idénticas o prácticamente idénticas. En algunas formas de realización, la integración cromosómica es recombinación homóloga.

[0044] Se considera que un ácido nucleico o polinucleótido “codifica” un polipéptido si, en su estado nativo o cuando ha sido manipulado mediante métodos conocidos por los expertos en la materia, se puede transcribir y/o traducir para producir el polipéptido o un fragmento de este. Se considera también que la cadena antisentido de dicho ácido nucleico codifica la secuencia.

[0045] Como se conoce en la técnica, se puede transcribir una secuencia de ADN mediante un ARN polimerasa para producir una secuencia de ARN, aunque una secuencia de ARN se puede transcribir inversamente mediante transcriptasa inversa para producir una secuencia de ADN.

[0046] “Cepa hospedadora” o “célula hospedadora” designa un hospedador adecuado para un vector de expresión que comprende una secuencia de ADN de interés. La secuencia de ADN de interés puede expresar una proteína de interés en la cepa hospedadora o en la célula hospedadora.

[0047] Una “proteína” o “polipéptido” comprende una secuencia polimérica de residuos de aminoácidos. Los términos “proteína” y “polipéptido” se utilizan indistintamente en el presente documento. A lo largo de la presente descripción, se utiliza el código único de 3 letras para aminoácidos definido conforme a la Comisión conjunta IUPAC-IUB sobre nomenclatura bioquímica (JCBN). La única letra X hace referencia a cualquiera de los veinte aminoácidos. Queda entendido también que más de una secuencia de nucleótidos puede codificar un polipéptido debido a la degeneración del código genético. Las mutaciones se designan mediante el código de una letra para el aminoácido parental, seguida por un número de posición de dos o tres dígitos y a continuación por el código de una letra para la variante de aminoácido. Por ejemplo, la glicina (G) que muta en la posición 87 a serina (S) se representa como “G087S” o “G87S”. Las mutaciones múltiples se indican insertando un “-” entre las mutaciones. Las mutaciones en las posiciones 87 y 90 se representan como “G087S-A090Y”, “G87S-A90Y”, “G87S + A90Y”, o bien “G087S + A090Y”. Para las deleciones, se utiliza el código de una letra “Z”. En el caso de una inserción relativa a la secuencia parental, el código de una letra “Z” se encuentra en el lado izquierdo del número de posición. Para una deleción, el código de una letra “Z” se encuentra en el lado derecho del número de posición. Para las inserciones, el número de posición es el número de posición anterior al/a los aminoácido(s) insertado(s),

más 0.01 para cada aminoácido. Por ejemplo, una inserción de tres aminoácidos alanina (A), serina (S) y tirosina (Y) entre las posiciones 87 y 88 se representa como “Z087.01A-Z087.02S-Z087.03Y”. Así, la combinación de todas las mutaciones expuestas anteriormente junto con una deleción en la posición 100 es: “G087S- Z087.01A-Z087.02S-Z087.03Y-A090Y-A100Z”.

[0048] Una “prosecuencia” o “secuencia propeptídica” se refiere a una secuencia de aminoácidos entre la secuencia de péptido señal y la secuencia de proteasa madura que es necesaria para la secreción de la proteasa. La escisión de la prosecuencia o secuencia propeptídica da como resultado una proteasa madura activa.

[0049] El término “secuencia señal” o “péptido señal” se refiere a una secuencia de residuos de aminoácidos que puede participar en la secreción o el transporte directo de la forma madura o anterior de una proteína. La secuencia señal se localiza normalmente en una posición N-terminal respecto a la secuencia proteica anterior o madura. La secuencia señal puede ser endógena o exógena. Un ejemplo de secuencia señal exógena comprende los primeros siete residuos de aminoácidos de la secuencia señal de la subtilisina de *Bacillus subtilis* fusionados con el resto de la secuencia señal de la subtilisina de *Bacillus lentus* (ATCC 21536). Normalmente, una secuencia señal está ausente en la proteína madura. Normalmente, se escinde una secuencia señal de la proteína mediante una peptidasa señal después de transportar la proteína.

[0050] El término “secuencia señal híbrida” se refiere a secuencias señal en las que parte de la secuencia se obtiene a partir del hospedador de expresión fusionado con la secuencia señal del gen que se pretende expresar. En algunas formas de realización, se utilizan secuencias sintéticas.

[0051] El término forma “madura” de una proteína, polipéptido o péptido hace referencia a la forma funcional de la proteína, polipéptido o péptido sin la secuencia de péptido señal ni la secuencia propeptídica.

[0052] El término forma “precursora” o “anterior” de una proteína o péptido se refiere a una forma madura de la proteína que presenta una prosecuencia ligada de forma operativa al terminal amino o carbonilo. El precursor puede presentar también una secuencia “señal” ligada de forma operativa al terminal amino de la prosecuencia. El precursor puede presentar también polinucleótidos adicionales que estén implicados en la actividad postraduccional (p. ej., polinucleótidos escindidos a partir de esta para dejar la forma madura de una proteína o péptido).

[0053] El término “de tipo natural” en referencia a una secuencia de aminoácidos o secuencia de ácido nucleico indica que la secuencia de aminoácidos o la secuencia de ácido nucleico es una secuencia nativa o de origen natural. Tal como se utiliza en el presente documento, el término “de origen natural” se refiere a cualquier biomolécula (p. ej., proteínas, aminoácidos, o secuencias de ácidos nucleicos) hallada en la naturaleza (esto es, que no ha sido manipulada por medio de métodos recombinantes).

[0054] Según se utiliza en el presente documento, el término “de origen no natural” hace referencia a cualquier biomolécula no hallada en la naturaleza (p. ej., ácidos nucleicos recombinantes producidos en el laboratorio).

[0055] En el sentido en que se utiliza en el presente documento con respecto a posiciones de residuo de aminoácido, “correspondiente a”, “corresponde a” o “se corresponde con” designa un residuo de aminoácido en la posición enumerada en una proteína o péptido, o un residuo de aminoácido que es análogo, homólogo o equivalente a un residuo enumerado en una proteína o péptido. Según se utiliza en el presente documento, “región correspondiente” se refiere, por lo general, a una posición análoga en proteínas relacionadas o en una proteína de referencia.

[0056] Los términos “derivado/a(s) de” y “obtenido/a(s) a partir de” no se refieren únicamente a una proteasa producida o que se puede producir mediante una cepa del organismo en cuestión, sino también a una proteasa codificada por una secuencia de ADN aislada de dicha cepa y producida en un organismo hospedador que contiene dicha secuencia de ADN. De forma adicional, el término hace referencia a una proteasa codificada por una secuencia de ADN de origen sintético y/o de ADNc y que presenta las características identificativas de la proteasa en cuestión. A modo de ejemplo, las “proteasas derivadas de *Bacillus*” se refieren a las enzimas que presentan actividad proteolítica y que son producidas de forma natural por *Bacillus*, así como a serina proteasas como las producidas por fuentes de *Bacillus* pero que, a través del uso de técnicas de ingeniería genética, son producidas por organismos distintos a *Bacillus* transformados con un ácido nucleico que codifica las serina proteasas.

[0057] El término “idéntico(s)”, en el contexto de dos ácidos nucleicos o secuencias polipeptídicas, hace referencia a los residuos en las dos secuencias que son iguales cuando se alinean para una correspondencia máxima, medida utilizando uno de los siguientes algoritmos de análisis o comparación de secuencias.

[0058] En el sentido en que se utiliza en el presente documento, “genes homólogos” designa al menos un par de genes de especies distintas, pero normalmente relacionadas, que se corresponden entre sí y que son idénticos o muy similares entre sí. El término abarca genes que se separan mediante especiación (es decir, el desarrollo de nuevas especies) (p. ej., genes ortólogos), así como genes que se hayan separado mediante duplicación cromosómica (por ejemplo, genes parálogos).

[0059] Según se utiliza en el presente documento, “homología” hace referencia a similitud o identidad de secuencias, siendo preferible la identidad. Se puede determinar la homología utilizando técnicas convencionales conocidas en la técnica (Véase, p. ej., Smith y Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 [1981]; Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 [1970]; Pearson y Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444 [1988]; programas informáticos como GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el paquete de *software* de genética Wisconsin (Genetics Computer Group, Madison, Wisconsin); y Devereux *et al.*, Nucl. Acid Res. 12:387-395 [1984]). Un ejemplo de un algoritmo útil es PILEUP. PILEUP crea un alineamiento múltiple de secuencias a partir de un grupo de secuencias relacionadas utilizando alineamientos de pares progresivos. También puede trazar un árbol que muestre las relaciones de agrupación empleadas para crear el alineamiento. PILEUP utiliza una simplificación del método de alineamiento progresivo de Feng y Doolittle (véase, Feng y Doolittle, J. Mol. Evol. 35:351-360 [1987]). El método es similar al descrito por Higgins y Sharp (véase, Higgins y Sharp, CABIOS 5:151-153 [1989]). Entre los parámetros de PILEUP útiles se incluye un peso de hueco (*gap weight*) por defecto de 3,00, un peso de longitud de hueco (*gap length weight*) por defecto de 0,10, y huecos finales ponderados (*weighted end gaps*). Otro ejemplo de un algoritmo útil es el algoritmo BLAST, descrito por Altschul *et al.* (véase, Altschul *et al.*, J. Mol. Biol. 215:403-410 [1990]; y Karlin y Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-578 [1993]). Un programa BLAST especialmente útil es el programa WU-BLAST-2 (véase, Altschul *et al.*, Meth. Enzymol. 266:460-480 [1996]). WU-BLAST-2 utiliza varios parámetros de búsqueda, muchos de los cuales se establecen para los valores por defecto. Se establecen los parámetros ajustables con los siguientes valores: espacio de solapamiento (*overlap span*) = 1, fracción de solapamiento (*overlap fraction*) = 0,125, umbral de palabra (*word threshold*) (T) = 11. Los parámetros HSP S y HSP S2 son valores dinámicos y están establecidos por el propio programa en función de la composición de la secuencia específica y de la composición de la base de datos concreta en la que se busca la secuencia de interés. No obstante, los valores se pueden ajustar para aumentar la sensibilidad.

[0060] El porcentaje de identidad de secuencias entre una secuencia de referencia y una secuencia de interés de prueba puede ser determinado fácilmente por un experto en la materia. El porcentaje de identidad que comparten las secuencias de polinucleótidos o las secuencias polipeptídicas se determina mediante comparación directa de la información de la secuencia entre las moléculas alineando las secuencias y determinando la identidad mediante métodos conocidos en la técnica. Un ejemplo de un algoritmo que resulta adecuado para determinar la similitud de secuencias es el algoritmo BLAST (véase, Altschul, *et al.*, J. Mol. Biol., 215:403-410 [1990]). El *software* para llevar a cabo los análisis BLAST está disponible públicamente a través del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (National Center for Biotechnology Information). Este algoritmo implica, en primer lugar, identificar pares de secuencias de alta puntuación (HSP, por sus siglas en inglés) mediante la identificación de palabras cortas de longitud W en la secuencia problema (*query*) que coinciden o cumplen con alguna puntuación umbral T de valor positivo al alinearse con una palabra de la misma longitud en una secuencia de la base de datos. Estas coincidencias de palabras iniciales próximas actúan como puntos de partida para encontrar HSP más largos que las contengan. Las coincidencias de palabras se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada una de las dos secuencias que se comparan hasta donde se pueda aumentar la puntuación de alineamiento acumulativa. La extensión de las coincidencias de palabras se detiene cuando: la puntuación de alineamiento acumulativa disminuye en la cantidad X a partir de un valor máximo alcanzado; la puntuación acumulativa es cero o inferior; o se alcanza el final de cualquier secuencia. Los parámetros W, T y X del algoritmo BLAST determinan la sensibilidad y la velocidad del alineamiento. El programa BLAST utiliza por defecto una longitud de palabra (W) de 11, los alineamientos de matriz de puntuación BLOSUM62 (véase, Henikoff y Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915) (B) de 50, expectación (E) de 10, M'5, N'-4, y una comparación de ambas cadenas.

[0061] El algoritmo BLAST realiza a continuación un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (véase, p. ej., Karlin y Altschul, *supra*). Una medida de similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de suma más pequeña (P(N)), que proporciona una indicación de la probabilidad con la que un emparejamiento entre dos secuencias de nucleótidos o de aminoácidos ocurriría al azar. Por ejemplo, un ácido nucleico se considera similar a un ácido nucleico de serina proteasa de la presente invención si la probabilidad de suma más pequeña en una comparación del ácido nucleico de prueba con respecto a un ácido nucleico de serina proteasa es inferior a aproximadamente 0,1, más preferiblemente inferior a aproximadamente 0,01, y siendo lo más preferible inferior a aproximadamente 0,001. En caso de que el ácido nucleico de prueba codifique un polipéptido de serina proteasa, se considera similar a un ácido nucleico de serina proteasa especificado si los resultados de comparación en una probabilidad de suma más pequeña son inferiores a aproximadamente 0,5, y más preferiblemente inferiores a aproximadamente 0,2.

[0062] El porcentaje “idéntico” o “de identidad” en el contexto de dos o más secuencias de ácidos nucleicos o de polipéptidos hace referencia a dos o más secuencias que son iguales o presentan un porcentaje especificado de residuos de ácido nucleico o de residuos de aminoácido, respectivamente, que son iguales al compararlas y alinearlas para determinar una similitud máxima utilizando un algoritmo de comparación de secuencias o mediante inspección visual. El “porcentaje de identidad de secuencias”, o “% de identidad”, o “% de identidad de secuencias” o “% de identidad de secuencias de aminoácidos” de una secuencia de aminoácidos objeto con respecto a una secuencia de aminoácidos de referencia (es decir, secuencia problema) significa que la secuencia de aminoácidos objeto es idéntica (es decir, a nivel de aminoácido por aminoácido) en un porcentaje

especificado con respecto a la secuencia de aminoácidos problema a lo largo de una longitud de comparación cuando las secuencias están alineadas de manera óptima. Así, un 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos o un 80 % de identidad con respecto a dos secuencias de aminoácidos significa que un 80 % de los residuos de aminoácidos en dos secuencias de aminoácidos alineadas de manera óptima son idénticos.

[0063] El "porcentaje de identidad de secuencias", o "% de identidad", o "% de identidad de secuencias" o "% de identidad de secuencias de nucleótidos" de una secuencia de ácido nucleico objeto con respecto a una secuencia de ácido nucleico de referencia (es decir, secuencia problema) significa que la secuencia de ácido nucleico objeto es idéntica (es decir, a nivel de nucleótido por nucleótido para una secuencia polinucleotídica) en un porcentaje especificado con respecto a la secuencia problema a lo largo de una longitud de comparación cuando las secuencias están alineadas de forma óptima. Así, un 80 % de identidad de secuencia de nucleótidos o un 80 % de identidad con respecto a dos secuencias de ácido nucleico significa que un 80 % de los residuos de nucleótidos en dos secuencias de ácidos nucleicos alineadas de manera óptima son idénticos.

[0064] En algunas formas de realización, el "porcentaje de identidad de secuencias", o "% de identidad de secuencias", o "% de identidad" de una secuencia objeto con respecto a una secuencia problema se puede calcular alineando de manera óptima las dos secuencias y comparando las dos secuencias alineadas de manera óptima a lo largo de la longitud de comparación. Se determina el número de posiciones en el alineamiento óptimo en los que aparecen residuos idénticos en ambas secuencias, proporcionando de esta forma el número de posiciones emparejadas, y a continuación se divide el número de posiciones emparejadas por el número total de posiciones de la longitud de comparación (el cual, a no ser que se especifique otra cosa, es la longitud de la secuencia problema). El número resultante se multiplica por 100 para obtener el porcentaje de identidad de secuencias de la secuencia objeto con respecto a la secuencia problema.

[0065] "Alineamiento óptimo" o "alineada(s) de forma óptima" hace referencia al alineamiento de dos (o más) secuencias que proporciona la mayor puntuación de porcentaje de identidad. Por ejemplo, se puede conseguir un alineamiento óptimo de dos secuencias de proteínas alineando manualmente las secuencias de tal forma que el número máximo de residuos de aminoácidos idénticos en cada secuencia se alineen entre sí, o utilizando programas informáticos o procedimientos descritos en el presente documento o conocidos en la técnica. Se puede conseguir un alineamiento óptimo de dos secuencias de ácidos nucleicos alineando manualmente las secuencias de tal forma que el número máximo de residuos de nucleótidos idénticos en cada secuencia se alineen entre sí, o utilizando programas o procedimientos informáticos descritos en el presente documento o conocidos en la técnica.

[0066] En algunas formas de realización, dos secuencias polipeptídicas se consideran "alineadas de forma óptima" cuando se alinean utilizando parámetros definidos, como una matriz de sustitución de aminoácidos determinada, penalización por existencia de hueco (también denominada penalización por apertura de hueco), y penalización por extensión de hueco, para lograr la máxima puntuación de similitud posible para ese par de secuencias. La matriz de puntuación BLOSUM62 (véase, Henikoff y Henikoff, *supra*) se utiliza a menudo como matriz de sustitución de puntuación por defecto en algoritmos de alineamiento de secuencias polipeptídicas (p. ej., BLASTP). Se impone la penalización por existencia de hueco para la introducción de un único hueco de aminoácido en una de las secuencias alineadas, y se impone la penalización por extensión de hueco para cada posición de residuo en el hueco. Entre los ejemplos de parámetros de alineamiento empleados se incluyen: matriz de puntuación BLOSUM62, penalización por existencia de hueco = 11, y penalización por extensión de hueco = 1. La puntuación de alineamiento se determina por medio de las posiciones de aminoácidos de cada secuencia en las que comienza y termina el alineamiento (p. ej., la ventana de alineamiento), y opcionalmente mediante la inserción de un hueco o de múltiples huecos en una o ambas secuencias, con el fin de lograr la máxima puntuación de similitud posible.

[0067] Se puede determinar un alineamiento óptimo entre dos o más secuencias manualmente mediante inspección visual o utilizando un ordenador, como, por ejemplo, sin carácter limitativo, el programa BLAST para secuencias de aminoácidos y el programa BLASTN para secuencias de ácido nucleico (véase, por ejemplo, Altschul *et al.*, Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402 (1997); véase también, el sitio web del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (National Center for Biotechnology Information (NCBI)).

[0068] Se puede considerar que un polipéptido de interés es "considerablemente idéntico" a un polipéptido de referencia si el polipéptido de interés comprende una secuencia de aminoácidos que presenta al menos aproximadamente un 70 %, al menos aproximadamente un 75 %, al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 85 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 91 %, al menos aproximadamente un 92 %, al menos aproximadamente un 93 %, al menos aproximadamente un 94 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 %, al menos aproximadamente un 99 %, o al menos aproximadamente un 99,5 % de identidad de secuencias con respecto a la secuencia de aminoácidos del polipéptido de referencia. El porcentaje de identidad entre tales dos polipéptidos se puede determinar manualmente mediante inspección de las dos secuencias polipeptídicas alineadas de forma óptima o bien utilizando programas informáticos o algoritmos (p. ej., BLAST, ALIGN, CLUSTAL) que utilicen parámetros convencionales. Un indicativo de que dos polipéptidos son considerablemente idénticos es que el primer polipéptido reacciona inmunitariamente de forma cruzada con

el segundo polipéptido. Normalmente, los polipéptidos que difieren en sustituciones de aminoácidos conservadoras reaccionan inmunitariamente de forma cruzada. Por tanto, un polipéptido es considerablemente idéntico a un segundo polipéptido, por ejemplo, cuando los dos péptidos difieren únicamente en una sustitución conservadora de aminoácidos o en una o más sustituciones conservadoras de aminoácidos.

[0069] Se puede considerar que un ácido nucleico de interés es “considerablemente idéntico” a un ácido nucleico de referencia si el ácido nucleico de interés comprende una secuencia nucleotídica que presenta al menos aproximadamente un 70 %, al menos aproximadamente un 75 %, al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 85 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 91 %, al menos aproximadamente un 92 %, al menos aproximadamente un 93 %, al menos aproximadamente un 94 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 %, al menos aproximadamente un 99 %, o al menos aproximadamente un 99,5 % de identidad de secuencias con respecto a la secuencia nucleotídica del ácido nucleico de referencia. El porcentaje de identidad entre tales dos ácidos nucleicos se puede determinar manualmente mediante inspección de las dos secuencias de ácido nucleico alineadas de forma óptima o bien utilizando programas informáticos o algoritmos (p. ej., BLAST, ALIGN, CLUSTAL) que utilicen parámetros convencionales. Un indicativo de que dos secuencias de ácido nucleico son considerablemente idénticas es que las dos moléculas de ácido nucleico hibridan entre sí en condiciones rigurosas (por ejemplo, en un intervalo de exigencia de medio a alto).

[0070] Un ácido nucleico o polinucleótido está “aislado” cuando está parcialmente o completamente separado de otros componentes, incluyendo, a modo de ejemplo y sin carácter limitativo, otras proteínas, ácidos nucleicos, células, etc. Del mismo modo, un polipéptido, proteína o péptido está “aislado” cuando está parcialmente o completamente separado de otros componentes, incluyendo, a modo de ejemplo y sin carácter limitativo, otras proteínas, ácidos nucleicos, células, etc. A nivel molar, una especie aislada es más abundante que otras especies en una composición. Por ejemplo, una especie aislada puede comprender al menos aproximadamente un 50 %, aproximadamente un 70 %, aproximadamente un 80 %, aproximadamente un 85 %, aproximadamente un 90 %, aproximadamente un 91 %, aproximadamente un 92 %, aproximadamente un 93 %, aproximadamente un 94 %, aproximadamente un 95 %, aproximadamente un 96 %, aproximadamente un 97 %, aproximadamente un 98 %, aproximadamente un 99 %, o aproximadamente un 100 % (a nivel molar) de todas las especies macromoleculares presentes. Preferiblemente, la especie de interés está purificada hasta la homogeneidad esencial (esto es, no se pueden detectar especies contaminantes en la composición mediante métodos de detección convencionales). Se puede determinar la pureza y la homogeneidad utilizando una serie de técnicas conocidas en el ámbito de especialización, como electroforesis en gel de agarosa o de poliacrilamida de una muestra de proteína o de ácido nucleico, seguida de visualización tras la tinción. Si se desea, se puede utilizar una técnica de alta resolución, tal como una cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés) o un medio similar, para purificar el material.

[0071] El término “purificado(s)” aplicado a ácidos nucleicos o polipéptidos denota por lo general un ácido nucleico o polipéptido que es esencialmente libre de otros componentes según lo determinado mediante técnicas analíticas conocidas en la técnica (p. ej., un polipéptido o polinucleótido purificado forma una banda discreta en un gel de electroforesis, eluido cromatográfico, y/o en un medio sujeto a centrifugación en gradiente de densidad). Por ejemplo, un ácido nucleico o polipéptido que da lugar esencialmente a una banda en un gel de electroforesis está “purificado”. Un ácido nucleico o polipéptido purificado es al menos aproximadamente un 50 % puro, habitualmente al menos aproximadamente un 75 %, aproximadamente un 80 %, aproximadamente un 85 %, aproximadamente un 90 %, aproximadamente un 91 %, aproximadamente un 92 %, aproximadamente un 93 %, aproximadamente un 94 %, aproximadamente un 95 %, aproximadamente un 96 %, aproximadamente un 97 %, aproximadamente un 98 %, aproximadamente un 99 %, aproximadamente un 99,5 %, aproximadamente un 99,6 %, aproximadamente un 99,7 %, aproximadamente un 99,8 % o más puro (p. ej., porcentaje en peso a nivel molar). Un polipéptido o polinucleótido considerablemente puro de la invención (p. ej., una variante de proteasa o polinucleótido considerablemente puro que codifique una variante de proteasa de la invención, respectivamente) comprenderá normalmente al menos aproximadamente un 55 %, aproximadamente un 60 %, aproximadamente un 70 %, aproximadamente un 80 %, aproximadamente un 85 %, aproximadamente un 90 %, aproximadamente un 91 %, aproximadamente un 92 %, aproximadamente un 93 %, aproximadamente un 94 %, aproximadamente un 95 %, aproximadamente un 96 %, aproximadamente un 97 %, aproximadamente un 98 %, aproximadamente un 99 %, aproximadamente un 99,5 % o más en peso (a nivel molar) de todas las especies macromoleculares en una composición concreta.

[0072] Tal como se utiliza en el presente documento, el término “mutagénesis combinatoria” o “combinatorio/a(s)” se refiere a métodos mediante los cuales se generan bibliotecas de variantes de ácido nucleico de una secuencia de ácido nucleico de referencia. En estas bibliotecas, las variantes contienen una o varias mutaciones elegidas a partir de un conjunto predeterminado de mutaciones. Los métodos también dan a conocer medios para introducir mutaciones aleatorias que no pertenecían al conjunto predeterminado de mutaciones. Algunos de dichos métodos incluyen los expuestos en la patente estadounidense n.º 6,582,914. Algunos de dichos métodos de mutagénesis combinatoria incluyen y/o abarcan métodos incorporados en kits disponibles comercialmente (p. ej., kit de mutagénesis dirigida multisitio de QUIKCHANGE® (Stratagene), fusión de PCR/PCR de extensión).

[0073] Tal como se utiliza en el presente documento, “que presenta(n) propiedades mejoradas”, empleado en relación con una variante de proteasa, hace referencia a una variante de proteasa con un rendimiento de limpieza o de lavado mejorado o potenciado, y/o a una estabilidad mejorada o potenciada opcionalmente con un rendimiento de limpieza o de lavado mantenido, con respecto a la proteasa de referencia correspondiente (p. ej., proteasa de tipo natural o de origen natural). Las propiedades mejoradas de una variante de proteasa pueden comprender un rendimiento de limpieza o de lavado mejorado y/o una estabilidad mejorada. En algunas formas de realización, la invención da a conocer variantes de proteasa de la invención que muestran una o más de las siguientes propiedades: eficacia mejorada de lavado de manos, eficacia mejorada de lavavajillas manual o a mano, eficacia mejorada de lavavajillas automático, eficacia mejorada de lavado de ropa, y/o estabilidad mejorada con respecto a una proteasa de referencia (p. ej., una proteasa de tipo natural, tal como una subtilisina de tipo natural).

[0074] Según se utiliza en el presente documento, el término “ensayo funcional” hace referencia a un ensayo que proporciona un indicativo de la actividad de una proteína. En algunas formas de realización, el término se refiere a sistemas de ensayo en los que se analiza una proteína para determinar su capacidad para llevar a cabo su función habitual. Por ejemplo, en el caso de enzimas, un ensayo funcional implica determinar la eficacia de la enzima a la hora de catalizar una reacción.

[0075] Tal como se utiliza en el presente documento, el término “propiedad meta” se refiere a la propiedad del gen inicial que se pretende alterar. No se pretende que la presente invención esté limitada a ninguna propiedad meta en concreto. No obstante, en algunas formas de realización, la propiedad meta es la estabilidad de un producto génico (p. ej., resistencia a la desnaturalización, proteólisis u otros factores degradantes), mientras que, en otras formas de realización, se altera el nivel de producción en un hospedador de producción.

[0076] El término “propiedad” o equivalentes gramaticales de este en el contexto de un ácido nucleico, conforme se utiliza en el presente documento, hace referencia a cualquier característica o atributo de un ácido nucleico que se pueda seleccionar o detectar. Estas propiedades incluyen, aunque sin carácter limitativo, una propiedad que afecte a la unión a un polipéptido, una propiedad conferida en una célula que comprenda un ácido nucleico concreto, una propiedad que afecte a la transcripción génica (p. ej., fuerza del promotor, reconocimiento del promotor, regulación del promotor, función potenciadora), una propiedad que afecte al procesamiento de ARN (p. ej., empalme de ARN, estabilidad de ARN, conformación de ARN, y modificación postranscripcional), una propiedad que afecte a la traducción (p. ej., nivel, regulación, unión de ARNm a proteínas ribosomales, modificación postraduccional). Por ejemplo, se puede alterar un sitio de unión para un factor de transcripción, polimerasa, factor de regulación, etc., de un ácido nucleico para producir características deseadas o para identificar características no deseables.

[0077] El término “propiedad” o equivalentes gramaticales del mismo en el contexto de un polipéptido (incluyendo proteínas), tal como se utiliza en el presente documento, hace referencia a cualquier característica o atributo de un polipéptido que se puede seleccionar o detectar. Estas propiedades incluyen, aunque sin carácter limitativo, estabilidad oxidativa, especificidad de sustrato, actividad catalítica, actividad enzimática, estabilidad térmica, estabilidad alcalina, perfil de actividad del pH, resistencia a la degradación proteolítica, proporción de K_M, k_{cat}, k_{cat}/k_M, plegamiento de proteínas, inducción de una respuesta inmune, capacidad para unirse a un ligando, capacidad para unirse a un receptor, capacidad para ser secretado, capacidad para ser visualizado en la superficie de una célula, capacidad para oligomerizar, capacidad para funcionar como señal, capacidad para estimular la proliferación celular, capacidad para inhibir la proliferación celular, capacidad para inducir apoptosis, capacidad para modificarse mediante fosforilación o glucosilación, y/o capacidad para tratar enfermedades, etc.

[0078] Tal como se utiliza en el presente documento, el término “cribado” posee su significado habitual en la técnica. En un ejemplo de proceso de cribado, se proporciona un ácido nucleico mutante o polipéptido variante codificado a partir de este, y se evalúa o se determina una propiedad del ácido nucleico mutante o polipéptido variante, respectivamente. La propiedad determinada del ácido nucleico mutante o polipéptido variante se puede comparar con una propiedad del ácido nucleico precursor (parental) correspondiente o con la propiedad del polipéptido parental correspondiente, respectivamente.

[0079] Será evidente para los expertos en la materia que el proceso de cribado para obtener un ácido nucleico o proteína con una propiedad alterada depende de la propiedad del material de partida, cuya modificación pretende ser facilitada mediante la producción del ácido nucleico mutante. Por consiguiente, el experto en la materia podrá observar que la invención no está limitada a ninguna propiedad específica que se pretenda cribar y que la siguiente descripción de propiedades incluye únicamente ejemplos ilustrativos. En la técnica se describen, por lo general, métodos para cribar cualquier propiedad concreta. Por ejemplo, se puede medir la unión, el pH, la especificidad, etc., antes y después de la mutación, donde un cambio indica una alteración. Preferiblemente, los cribados se llevan a cabo de forma que presentan una elevada productividad, incluyendo múltiples muestras cribadas simultáneamente, entre las que se incluyen, sin carácter limitativo, ensayos que utilizan matrices, presentación en fagos, y múltiples sustratos y/o indicadores.

[0080] Tal como se utiliza en el presente documento, en algunas formas de realización, un proceso de cribado abarca una o más etapas de selección en la(s) que las variantes de interés se enriquecen a partir de una población de variantes. Los ejemplos de estas formas de realización incluyen la selección de variantes que

confieren una ventaja de crecimiento al organismo hospedador, así como la presentación en fagos o cualquier otro método de presentación, donde las variantes se pueden obtener a partir de una población de variantes en función de sus propiedades catalíticas o de unión. En algunas formas de realización, se somete a estrés una biblioteca de variantes (p. ej., por calor, desnaturalización, etc.) y, posteriormente, se identifican en un cribado variantes que están todavía intactas o enriquecidas mediante selección. Se pretende que el término abarque cualquier medio adecuado para la selección. De hecho, no se pretende que la presente invención se vea limitada a ningún método de cribado en concreto.

[0081] Los términos “secuencia modificada de ácido nucleico” y “gen modificado” se utilizan indistintamente en el presente documento para referirse a una secuencia de ácido nucleico que incluye una deleción, inserción o interrupción de la secuencia de ácido nucleico de origen natural (es decir, de tipo natural). En algunas formas de realización, el producto de expresión de la secuencia modificada de ácidos nucleicos es una proteína truncada (p. ej., si la modificación es una deleción o interrupción de la secuencia). En algunas formas de realización, la proteína truncada conserva actividad biológica. En formas de realización alternativas, el producto de expresión de la secuencia modificada de ácido nucleico es una proteína alargada (p. ej., modificaciones que comprenden una inserción en la secuencia de ácido nucleico). En algunas formas de realización, una inserción de nucleótido en la secuencia de ácido nucleico da como resultado una proteína truncada (p. ej., cuando la inserción deriva en la formación de un codón de parada). Así, una inserción puede dar como resultado una proteína truncada, o bien una proteína alargada como un producto de expresión.

[0082] Una secuencia de ácido nucleico “mutante” se refiere normalmente a una secuencia de ácido nucleico que presenta una alteración en al menos un codón que tiene lugar en una secuencia de tipo natural de la célula hospedadora, de tal forma que el producto de expresión de la secuencia de ácido nucleico mutante es una proteína con una secuencia de aminoácidos alterada con respecto a la proteína de tipo natural. El producto de expresión puede presentar una capacidad funcional alterada (p. ej., actividad enzimática potenciada).

[0083] En el sentido en que se utiliza en el presente documento, la frase “alteración de la especificidad de sustrato” se refiere a cambios en la especificidad de sustrato de una enzima. En algunas formas de realización, un cambio en la especificidad de sustrato se define como un cambio de k_{cat} y/o K_m para un sustrato concreto, como resultado de mutaciones de la enzima o alteración de las condiciones de reacción. La especificidad de sustrato de una enzima se determina comparando las eficiencias catalíticas que esta muestra con distintos sustratos. Estas determinaciones se utilizan en concreto a la hora de evaluar la eficacia de las enzimas mutantes, puesto que, por lo general, se desea producir variantes de enzimas que presenten mayores proporciones de k_{cat}/K_m para sustratos de interés. No obstante, no se pretende que la presente invención esté limitada a ninguna composición de sustrato o especificidad de sustrato concreta.

[0084] En el sentido en que se utiliza en el presente documento, “propiedad de superficie” se emplea en referencia a una carga electrostática, así como a propiedades tales como la hidrofobicidad y la hidrofilicidad mostradas por la superficie de una proteína.

[0085] Tal como se utiliza en el presente documento, el término “carga neta” se define como la suma de todas las cargas presentes en una molécula. Se realizan “cambios en la carga neta” de una molécula de proteína parental para proporcionar una variante que presente una carga neta que difiera de la de la molécula parental (es decir, la variante presenta una carga neta que no es igual a la de la molécula parental). Por ejemplo, la sustitución de un aminoácido neutro por un aminoácido con carga negativa, o de un aminoácido con carga positiva por un aminoácido neutro, da como resultado una carga neta de -1 con respecto a la molécula parental. La sustitución de un aminoácido con carga positiva por un aminoácido con carga negativa da como resultado una carga neta de -2 con respecto a la molécula parental. La sustitución de un aminoácido neutro por un aminoácido con carga positiva, o de un aminoácido con carga negativa por un aminoácido neutro, da como resultado una carga neta de +1 con respecto a la molécula parental. La sustitución de un aminoácido con carga negativa por un aminoácido con carga positiva da como resultado una carga neta de +2 con respecto a la molécula parental. La carga neta de una proteína parental se puede alterar también mediante la deleción y/o inserción de aminoácidos cargados.

[0086] Los términos “térmicamente estable(s)”, “termoestable(s)”, “termoestabilidad” y “estabilidad térmica” se refieren a proteasas que conservan una cantidad determinada de actividad enzimática tras la exposición a temperaturas identificadas durante un período de tiempo determinado en condiciones imperantes durante el proceso proteolítico, de hidrolización, de limpieza u otro proceso de la invención, mientras se exponen a temperaturas alteradas. El término “temperaturas alteradas” abarca temperaturas incrementadas o reducidas. En algunas formas de realización, las proteasas conservan al menos aproximadamente un 50 %, aproximadamente un 60 %, aproximadamente un 70 %, aproximadamente un 75 %, aproximadamente un 80 %, aproximadamente un 85 %, aproximadamente un 90 %, aproximadamente un 92 %, aproximadamente un 95 %, aproximadamente un 96 %, aproximadamente un 97 %, aproximadamente un 98 %, o aproximadamente un 99 % de actividad proteolítica tras la exposición a temperaturas alteradas durante un período de tiempo determinado, por ejemplo, al menos aproximadamente 60 minutos, aproximadamente 120 minutos, aproximadamente 180 minutos, aproximadamente 240 minutos, aproximadamente 300 minutos, etc.

[0087] El término “estabilidad potenciada” en el contexto de una proteasa de oxidación, quelante, térmica y/o de pH estable hace referencia a una mayor actividad proteolítica mantenida a lo largo del tiempo en comparación con otras proteasas (p. ej., proteasas subtilisina) y/o enzimas de tipo natural.

[0088] El término “estabilidad reducida” en el contexto de una proteasa de oxidación, quelante, térmica y/o de pH estable hace referencia a una menor actividad proteolítica preservada a lo largo del tiempo en comparación con otras proteasas (p. ej., proteasas subtilisina) y/o enzimas de tipo natural.

[0089] El término “actividad de limpieza” se refiere a un rendimiento de limpieza logrado por una variante de proteasa o proteasa de referencia en condiciones imperantes durante el proceso proteolítico, de hidrolización, de limpieza, o durante otro proceso de la invención. En algunas formas de realización, se puede determinar el rendimiento de limpieza de una variante de proteasa o proteasa de referencia utilizando diversos ensayos para la limpieza de una o más diversas manchas sensibles a enzimas en un artículo o superficie (p. ej., una mancha derivada de alimentos, hierba, sangre, tinta, leche, aceite y/o proteína de huevo). El rendimiento de limpieza de una variante de proteasa o proteasa de referencia se puede determinar sometiendo la mancha en el artículo o superficie a condición(es) de lavado convencional(es) y evaluando el grado de eliminación de la mancha mediante la utilización de diversas metodologías de cromatografía, de espectrofotometría, u otras metodologías cuantitativas. En la técnica se conocen ejemplos de ensayos y métodos de limpieza, e incluyen, sin carácter limitativo, los descritos en el documento WO 99/34011 y en la patente estadounidense 6,605,458, así como los ensayos y métodos de limpieza incluidos en los Ejemplos que se ofrecen más adelante.

[0090] El término “cantidad efectiva de limpieza” de una variante de proteasa o proteasa de referencia se refiere a la cantidad de proteasa que alcanza un nivel deseado de actividad enzimática en una composición de limpieza específica. Dichas cantidades efectivas se determinan con facilidad por parte de un experto en la materia y dependen de muchos factores, tales como la proteasa concreta utilizada, la aplicación de limpieza, la composición específica de la composición de limpieza, y el hecho de si se necesita una composición líquida o seca (por ejemplo, granulada, en pastilla, en barra), etc.

[0091] El término “material adjunto de limpieza” hace referencia a cualquier material líquido, sólido o gaseoso incluido en la composición de limpieza distinto de una variante de proteasa de la invención. En algunas formas de realización, las composiciones de limpieza de la presente invención incluyen uno o más materiales adjuntos de limpieza. Cada material adjunto de limpieza se selecciona normalmente en función del tipo y forma concretos de la composición de limpieza (p. ej., líquida, granulada, en polvo, en barra, en pasta, en espray, en pastilla, en gel, en espuma, u otra composición). Preferiblemente, cada material adjunto de limpieza es compatible con la enzima proteasa utilizada en la composición.

[0092] El término “rendimiento potenciado” en el contexto de actividad de limpieza hace referencia a una actividad de limpieza mayor o incrementada por parte de una enzima en ciertas manchas sensibles a enzimas, tales como huevo, leche, hierba, tinta, aceite y/o sangre, según lo determinado mediante la evaluación habitual posterior a un ciclo de lavado y/o múltiples ciclos de lavado convencionales.

[0093] El término “rendimiento reducido”, en el contexto de actividad de limpieza, hace referencia a una actividad de limpieza menor o reducida por parte de una enzima en ciertas manchas sensibles a enzimas, tales como huevo, leche, hierba o sangre, según lo determinado mediante la evaluación habitual posterior a un ciclo de lavado convencional.

[0094] El término “rendimiento comparativo” en el contexto de actividad de limpieza de una variante de proteasa de la invención se refiere a al menos aproximadamente un 60 %, al menos aproximadamente un 70 %, al menos aproximadamente un 75 %, al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 85 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 91 %, al menos aproximadamente un 92 %, al menos aproximadamente un 93 %, al menos aproximadamente un 94 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 %, al menos aproximadamente un 99 %, al menos aproximadamente un 99,5 % de la actividad de limpieza de una proteasa comparativa o de referencia (p. ej., proteasas comercializadas), incluyendo, a modo de ejemplo y sin carácter limitativo, la proteasa OPTIMASE™ (Genencor), productos de proteasa PURAFECT™ (Genencor), proteasa SAVINASE™ (Novozymes), variantes de BPN' (véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º Re 34,606), proteasa RELASE™, DURAZYME™, EVERLASE™, KANNASE™ (Novozymes), proteasas MAXACAL™, MAXAPEM™, PROPERASE™ (Genencor; véase también la patente estadounidense n.º Re 34,606; las patentes estadounidenses n.ºs 5,700,676; 5,955,340; 6,312,936; y 6,482,628), y productos de variante de proteasa de *B. lentus* (p. ej., los descritos en WO 92/21760, WO 95/23221 y/o WO 97/07770). Se puede determinar el rendimiento de limpieza comparando las variantes de proteasas de la presente invención con proteasas subtilisina de referencia en diversos ensayos de limpieza relativos a manchas sensibles a enzimas, tales como hierba, sangre, tinta, aceite y/o leche, según lo determinado mediante metodologías habituales de espectrofotometría o analíticas tras condiciones convencionales del ciclo de lavado.

[0095] Tal como se utiliza en el presente documento, el término “producto de consumo” hace referencia a un producto de limpieza del hogar y de tejidos. Según se utiliza en el presente documento, el término “producto de limpieza del hogar y de tejidos” o “producto de limpieza doméstica y de tejidos” incluye productos que, por lo

general, se pretende utilizar o emplear en la forma en la que se venden y que se destinan a tratar tejidos, superficies duras y cualquier otra superficie, y sistemas de limpieza destinados en su totalidad al cuidado y a la limpieza de superficies inanimadas, así como productos acondicionadores para tejidos y otros productos diseñados específicamente para el cuidado y el mantenimiento de tejidos, y productos para el saneamiento del aire, incluidos: saneamiento del aire, que incluye ambientadores y sistemas difusores de aroma, cuidado del automóvil, cuidado de mascotas, cuidado del ganado, cuidado personal, limpieza de joyas, lavavajillas, acondicionamiento de tejidos (incluyendo suavizantes y/o aromatizadores), detergentes para ropa, aditivos y/o cuidados para lavar y enjuagar la ropa, composiciones de pretratamiento de limpieza, limpieza de superficies duras y/o tratamiento que incluye limpiasuelos y limpiabaños, limpiacristales y/o tratamientos para cristales, limpiadores y/o tratamientos para azulejos, limpiadores y/o tratamientos para cerámica, y otros limpiadores para su uso institucional o por parte de los usuarios. En algunas formas de realización, los productos de limpieza del hogar y de tejidos son adecuados para su uso sobre heridas y/o sobre la piel. El “producto de limpieza del hogar y de tejidos” incluye productos institucionales y para los compradores.

[0096] Tal como se utiliza en el presente documento, el término “productos de limpieza ni del hogar ni de tejidos” hace referencia a composiciones que se añaden a otras composiciones para producir un producto final que puede ser un producto de limpieza del hogar y de tejidos.

[0097] Tal como se utiliza en el presente documento, el término “composición de limpieza institucional” se refiere a productos adecuados para su uso en instituciones, incluyendo, sin carácter limitativo, escuelas, hospitales, fábricas, comercios, empresas, edificios, restaurantes, complejos de oficinas y residenciales, plantas de procesamiento y/o fabricación, hospitales veterinarios, granjas industriales, ranchos industriales, etc.

[0098] Según se utiliza en el presente documento, “composición de limpieza y/o tratamiento” es un subconjunto de productos de limpieza del hogar y de tejidos que incluye, a no ser que se indique otra cosa, composiciones adecuadas para la limpieza y/o el tratamiento de artículos. Tales productos incluyen, aunque sin carácter limitativo, productos para tratar tejidos, superficies duras y cualquier otra superficie en el ámbito de la limpieza del hogar y de tejidos, incluyendo: saneamiento del aire, entre los que se incluyen ambientadores y sistemas difusores de aroma, cuidado del automóvil, lavavajillas, acondicionamiento de tejidos (incluyendo suavizantes y/o aromatizadores), detergentes para ropa, aditivos y/o cuidado para lavar y enjuagar la ropa, limpieza y/o tratamiento de superficies duras, incluidos limpiasuelos y limpiabaños, agentes de lavado “de alto rendimiento” o multiuso granulados o en polvo, especialmente detergentes de limpieza; agentes de lavado multiusos líquidos, en gel o en pasta, especialmente los denominados tipos líquidos de alto rendimiento; detergentes líquidos para tejidos delicados; agentes para lavavajillas a mano o agentes para lavavajillas ligeros, especialmente del tipo muy espumoso; agentes para lavavajillas a máquina, incluyendo los diversos tipos en pastillas, granulados, líquidos y abrillantadores para su uso doméstico e institucional: limpiadores jabonosos para automóviles o alfombras, limpiadores para baños, incluyendo limpiadores para el inodoro; así como complementos de limpieza, tales como aditivos blanqueadores y los tipos “quitamanchas en barra” o de pretratamiento, productos cargados de sustrato, tales como hojas suavizantes para la secadora.

[0099] De hecho, tal como se utiliza en el presente documento, la “composición de limpieza” o “fórmula de limpieza” de la invención hace referencia a cualquier composición de la invención que resulte útil para quitar o eliminar un compuesto (p. ej., un compuesto no deseado) de un objeto, artículo o superficie que se pretenda limpiar, incluyendo, a modo de ejemplo y sin carácter limitativo, un tejido, un artículo de tela, una pieza de vajilla, un artículo de mesa, un artículo de cristalería, lentes de contacto, otro sustrato sólido, pelo (champú) (incluyendo pelo humano o de animal), piel (jabón y/o crema), dientes (enjuagues bucales, pastas de dientes), superficie de un artículo u objeto (p. ej., superficies duras, como la superficie dura de una mesa, la parte superior de una mesa, una pared, un mueble, el suelo, el techo, un artículo que no sea de vajilla, un artículo que no pertenezca a artículos de mesa, etc.), filtros, membranas (p. ej., membranas de filtración, incluyendo, sin carácter limitativo, membranas de ultrafiltración), etc. El término abarca cualquier material y/o compuesto añadido seleccionado para el tipo concreto de composición de limpieza deseada y la forma del producto (p. ej., composición líquida, en gel, granulada, en espray, u otra composición), siempre y cuando la composición sea compatible con la proteasa y otra(s) enzima(s) utilizada(s) en la composición. La selección específica de los materiales de la composición de limpieza se lleva a cabo fácilmente al tener en cuenta la superficie, el objeto, el artículo o el tejido que se pretende limpiar, y la forma deseada de la composición para las condiciones de limpieza durante el uso.

[0100] Las composiciones de limpieza y fórmulas de limpieza incluyen cualquier composición que sea adecuada para limpiar, blanquear, desinfectar y/o esterilizar cualquier objeto, artículo y/o superficie. Entre tales composiciones y fórmulas se incluyen, a modo de ejemplo y sin carácter limitativo, composiciones líquidas y/o sólidas, incluyendo composiciones de limpieza y detergentes (p. ej., composiciones detergentes o de limpieza textil líquidas, en pastillas, en gel, en barra, granuladas y/o sólidas y composiciones detergentes para tejidos delicados); composiciones y fórmulas de limpieza para superficies duras, como encimeras y ventanas de cristal, madera, cerámica y metal; limpiadores de alfombras; limpiadores de hornos; ambientadores para tejidos; suavizantes para ropa; y composiciones detergentes o de limpieza potenciadoras para el lavado de ropa, composiciones de limpieza de aditivos para ropa, y composiciones de limpieza quitamanchas para ropa; composiciones lavavajillas, incluyendo composiciones lavavajillas manuales o a mano (p. ej., detergentes

lavavajillas “manuales” o “a mano”) y composiciones para lavavajillas automático (p. ej., “detergentes para lavavajillas automático”).

[0101] La composición de limpieza o fórmulas de limpieza, tal como se utilizan en el presente documento, incluyen, salvo que se indique otra cosa, agentes de lavado en forma granulada o en polvo multiusos o de alto rendimiento, especialmente detergentes de limpieza; agentes de lavado multiusos en forma líquida, granulada, en gel, sólida, en pastilla o en pasta, especialmente los tipos denominados detergentes líquidos de alto rendimiento (HDL) o detergentes en polvo de alto rendimiento (HDD); detergentes líquidos para tejidos delicados; agentes de lavavajillas a mano o manuales, incluyendo los del tipo muy espumoso; agentes para lavavajillas manuales o a mano, agentes para lavavajillas automático, agentes de lavado de artículos de vajilla o artículos de mesa, incluyendo los diversos tipos en pastillas, en polvo, sólidos, granulados, líquidos, en gel y abrillantadores para su uso doméstico e institucional; agentes de limpieza líquidos y desinfectantes, incluyendo los tipos de lavado de manos antibacterianos, barras de limpieza, enjuagues bucales, limpiadores para dentaduras postizas, limpiadores jabonosos para automóviles, limpiadores jabonosos para alfombras, limpiabaños; champús y productos para enjuagar el cabello de humanos y de otros animales; geles y sales de baño y limpiadores de metales; así como complementos de limpieza, tales como aditivos de blanqueo y los tipos “quitamanchas en barra” o de pretratamiento. En algunas formas de realización, las composiciones granuladas están en forma “compacta”; en algunas formas de realización, las composiciones líquidas están en forma “concentrada”.

[0102] Tal como se utiliza en el presente documento, el término “composiciones de limpieza para tejidos” incluye composiciones detergentes para el lavado de ropa manual o automático, incluyendo composiciones de aditivos para lavar la ropa y composiciones adecuadas para su uso en el proceso de remojo y/o pretratamiento de tejidos con manchas (p. ej., prendas de ropa, textiles de hogar, y otros materiales textiles).

[0103] Según se utiliza en el presente documento, las “composiciones de limpieza no destinadas a tejidos” incluyen composiciones de limpieza de superficies no textiles (esto es, que no son tejidos), incluyendo, a modo de ejemplo y sin carácter limitativo, composiciones detergentes para lavavajillas automático, a mano o manual, composiciones de limpieza bucal, composiciones de limpieza para dentaduras postizas, y composiciones para la limpieza personal.

[0104] Según se utiliza en el presente documento, el término “composición de limpieza y/o tratamiento para tejidos y/o superficies duras” es un subconjunto de composiciones de limpieza y tratamiento que incluye, a no ser que se indique otra cosa, agentes de lavado multiusos en forma granulada o en polvo o “de alto rendimiento”, especialmente detergentes de limpieza; agentes de lavado multiusos en forma líquida, en gel o en pasta, especialmente los tipos denominados líquidos de alto rendimiento; detergentes líquidos para tejidos delicados; agentes de lavavajillas a mano o agentes de lavavajillas de bajo rendimiento, sobre todo los del tipo muy espumoso; agentes de lavavajillas a máquina, que incluyen los diversos tipos en pastillas, granulados, líquidos y abrillantadores para uso doméstico e institucional; agentes limpiadores y desinfectantes líquidos, limpiadores jabonosos para automóviles o alfombras, limpiabaños, incluyendo productos de limpieza para el inodoro; productos de acondicionamiento para tejidos, incluyendo suavizantes y/o ambientadores que pueden ser en forma líquida, sólida y/o de una hoja para secadora; así como complementos de limpieza, tales como como aditivos de blanqueo y los tipos de “quitamanchas en barra” o pretratamiento, productos cargados de sustrato, como hojas suavizantes para añadir a la secadora. La totalidad de dichos productos aplicables pueden encontrarse en forma convencional, concentrada o incluso muy concentrada, incluso hasta el punto de que dichos productos pueden ser, en ciertos aspectos, no acuosos.

[0105] Tal como se utiliza en el presente documento, el término “composición detergente” o “fórmula detergente” se utiliza en referencia a una composición que se pretende utilizar en un medio de lavado para la limpieza de objetos sucios o manchados, incluyendo objetos o artículos de un tejido concreto y/o que no sean de tejido. Dichas composiciones de la presente invención no están limitadas a ninguna composición o fórmula detergente concreta. De hecho, en algunas formas de realización, los detergentes de la invención comprenden al menos una variante de proteasa de la invención y, además, uno o más tensioactivos, transferasa(s), enzimas hidrolíticas, oxidorreductasas, mejoradores (p. ej., una sal mejoradora), agentes blanqueadores, activadores de blanqueo, agentes blanqueadores azules, tintes fluorescentes, inhibidores del apelmazamiento, agentes secuestrantes, activadores enzimáticos, antioxidantes, y/o agentes solubilizantes. En algunos casos, una sal mejoradora es una mezcla de una sal de silicato y una sal de fosfato, preferiblemente con más silicato (p. ej., metasilicato de sodio) que fosfato (p. ej., tripolifosfato de sodio). Algunas composiciones de la invención, tales como, aunque sin carácter limitativo, composiciones de limpieza o composiciones detergentes, no contienen ningún fosfato (p. ej., sal de fosfato o mejorador de fosfato).

[0106] En el sentido en que se utiliza en el presente documento, el término “blanqueo” hace referencia al tratamiento de un material (por ejemplo, tejido, ropa, pulpa, etc.) o superficie durante un periodo suficiente de tiempo y/o en unas condiciones de pH y temperatura apropiadas para producir un abrillantamiento (es decir, un blanqueamiento) y/o limpieza del material. Entre los ejemplos de sustancias químicas adecuadas para el blanqueo se incluyen, a modo de ejemplo y sin carácter limitativo, ClO_2, H_2O_2, perácidos, NO_2, etc.

[0107] Tal como se utiliza en el presente documento, el “rendimiento de lavado” de una proteasa (p. ej., variante de proteasa de la invención) se refiere a la contribución de una variante de proteasa al lavado, que proporciona

un rendimiento de limpieza adicional al detergente en comparación con el detergente sin la adición de la variante de proteasa a la composición. Se compara el rendimiento de lavado en condiciones relevantes de lavado. En algunos sistemas experimentales, se pueden controlar otros factores relevantes, tales como la composición del detergente, la concentración de espuma, la dureza del agua, el mecanismo de lavado, el tiempo, el pH, y/o la temperatura, de tal forma que se imite(n) la(s) condición(es) habitual(es) para su aplicación doméstica en un determinado sector de mercado (p. ej., lavavajillas a mano o manual, lavavajillas automático, limpieza de vajilla, limpieza de artículos de mesa, limpieza de tejidos, etc.).

[0108] El término “condiciones relevantes de lavado” se utiliza en el presente documento para designar las condiciones, especialmente la temperatura de lavado, el tiempo, el mecanismo de lavado, la concentración de espuma, el tipo de detergente y la dureza del agua, utilizadas realmente en el ámbito doméstico en un sector de mercado de lavavajillas manual, lavavajillas automático o detergente para ropa.

[0109] El término “rendimiento de lavado mejorado” se utiliza para indicar que se obtiene un mejor resultado final en lo que respecta a la eliminación de manchas en condiciones relevantes de lavado, o que se precisa una menor cantidad de variante de proteasa, a nivel de peso, para obtener el mismo resultado final en relación con la proteasa de tipo natural o con la proteasa parental inicial.

[0110] En el sentido en que se utiliza en el presente documento, el término “desinfección” se refiere a la eliminación de contaminantes de las superficies, así como a la inhibición o destrucción de microbios en las superficies de los artículos. No se pretende que la presente invención esté limitada a ninguna superficie o artículo, ni a contaminante(s) o microbios que se pretenda eliminar.

[0111] La forma “compacta” de las composiciones de limpieza del presente documento se refleja mejor por su densidad y, en cuanto a su composición, por la cantidad de sal inorgánica de relleno. Las sales inorgánicas de relleno son ingredientes habituales de composiciones detergentes en forma de polvo. En composiciones detergentes convencionales, las sales de relleno están presentes en cantidades considerables, normalmente de aproximadamente un 17 a aproximadamente un 35 % en peso de la composición total. Por el contrario, en composiciones compactas, la sal de relleno está presente en cantidades no superiores a aproximadamente un 15 % de la composición total. En algunas formas de realización, la sal de relleno está presente en cantidades no superiores a aproximadamente un 10 % o, más preferiblemente, aproximadamente un 5 % en peso de la composición. En algunas formas de realización, las sales inorgánicas de relleno se seleccionan de entre las sales alcalinas y sales de metales alcalinotérreos de sulfatos y cloruros. En algunas formas de realización, la sal de relleno es sulfato de sodio.

[0112] La posición de un residuo de aminoácido en una determinada secuencia de aminoácidos se numera normalmente en el presente documento utilizando la numeración de la posición del residuo de aminoácido correspondiente de la secuencia de aminoácidos BPN' de subtilisina de *B. amyloliquefaciens* que se muestra en la SEQ ID N.º 1. La secuencia de aminoácidos BPN' de subtilisina de *B. amyloliquefaciens* en la SEQ ID N.º 1 actúa, por tanto, como secuencia de referencia. Una secuencia de aminoácidos determinada, tal como una secuencia de aminoácidos de variante de proteasa descrita en el presente documento, se puede alinear con la secuencia BPN' (SEQ ID N.º 1) utilizando un algoritmo de alineamiento según se ha descrito en el presente documento, y un residuo de aminoácido en la secuencia de aminoácidos determinada que se alinea (preferiblemente, se alinea de forma óptima) con un residuo de aminoácido en la secuencia BPN' se puede numerar convenientemente en referencia al residuo de aminoácido correspondiente en la secuencia BPN' de subtilisina. De forma alternativa, si las posiciones de residuo de aminoácido de las secuencias de variante de proteasa subtilisina se numeran utilizando la numeración real de las posiciones de residuo de aminoácido en la secuencia de aminoácidos GG36 (SEQ ID N.º 2), y no en referencia a posiciones de aminoácido correspondientes en la secuencia BPN' tras el alineamiento, se puede describir la variante de proteasa subtilisina como una variante de proteasa de la proteasa GG36 que se muestra en la SEQ ID N.º 2.

[0113] Por lo general, la nomenclatura utilizada en el presente documento y en muchos de los procedimientos de laboratorio de cultivo celular, genética molecular, biología molecular, química de los ácidos nucleicos, y química de proteínas descritos más adelante se conoce y se emplea habitualmente por los expertos en la materia. Los métodos para la producción y manipulación de métodos de ácido nucleico recombinante, síntesis de ácido nucleico, métodos de cultivo celular, e incorporación de transgenes (p. ej., transfección, electroporación) resultan conocidos para los expertos en la materia y se describen en numerosos textos convencionales. Normalmente, se llevan a cabo etapas de síntesis y purificación de oligonucleótidos conforme a las especificaciones. Por lo general, se llevan a cabo técnicas y procedimientos de acuerdo con métodos convencionales conocidos en la técnica y diversas referencias generales que se proporcionan a lo largo del presente documento. Se cree que los procedimientos de este documento son conocidos para los expertos en la materia y se proporcionan en aras de facilitar la lectura.

Polipéptidos

[0114] La presente descripción da a conocer polipéptidos novedosos, que se pueden designar conjuntamente como “polipéptidos de la descripción”. Los polipéptidos incluyen polipéptidos de variante de proteasa aislados, recombinantes, considerablemente puros o de origen no natural, incluyendo, por ejemplo, polipéptidos de

variante de subtilisina, que presentan actividad enzimática (p. ej., actividad proteolítica). En algunas formas de realización, los polipéptidos resultan útiles en aplicaciones de limpieza y se pueden incorporar en composiciones de limpieza que sean útiles en métodos de limpieza de un artículo o de una superficie (p. ej., de la superficie de un artículo) que se necesite limpiar.

[0115] En algunas formas de realización, una variante de proteasa de la invención comprende una "variante de subtilisina". En algunas formas de realización, la invención da a conocer una "variante de proteasa de *Bacillus* sp.". En algunas formas de realización, la invención da a conocer una "variante de subtilisina de *Bacillus* sp.". Se describe una variante de proteasa aislada, recombinante, considerablemente pura, o de origen natural, que posee actividad proteolítica, y dicho polipéptido comprende una secuencia polipeptídica que presenta al menos aproximadamente un 85 %, al menos aproximadamente un 86%, al menos aproximadamente un 87%, al menos aproximadamente un 88%, al menos aproximadamente un 89%, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 91 %, al menos aproximadamente un 92 %, al menos aproximadamente un 93 %, al menos aproximadamente un 94 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 %, al menos aproximadamente un 99 %, al menos aproximadamente un 99,5 %, o un 100 % de identidad de secuencias con respecto a las secuencias de aminoácidos que codifican las variantes de proteasas expuestas en el presente documento.

[0116] Según se ha indicado anteriormente, los polipéptidos variantes de proteasa de la invención poseen actividades enzimáticas (p. ej., actividades proteolíticas), y por lo tanto resultan útiles en aplicaciones de limpieza, incluyendo, sin carácter limitativo, métodos para limpiar artículos de vajilla, artículos de mesa, tejidos, y artículos que presenten superficies duras (p. ej., la superficie dura de una mesa, la parte superior de una mesa, una pared, un mueble, el suelo, el techo, etc.). Más adelante, se describen ejemplos de composiciones de limpieza que comprenden uno o más polipéptidos variantes de proteasa de la invención. La actividad enzimática (p. ej., actividad de proteasa) de un polipéptido variante de proteasa de la invención se puede determinar fácilmente utilizando procedimientos conocidos para los expertos en la materia. Los Ejemplos presentados más adelante describen métodos para evaluar la actividad enzimática, el rendimiento de limpieza, y/o el rendimiento de lavado. El rendimiento de las variantes de proteasa de la invención a la hora de eliminar manchas (p. ej., una mancha proteínica), limpiar superficies duras, o lavar ropa, elemento(s) de vajilla o artículos de mesa, se puede determinar fácilmente utilizando procedimientos conocidos en la técnica y/o utilizando procedimientos expuestos en los Ejemplos.

[0117] Un polipéptido de la descripción puede estar sujeto a diversos cambios, tales como una o más inserciones, deleciones y/o sustituciones de aminoácido, ya sean conservadoras o no conservadoras, incluyendo cuando tales cambios no alteren de forma sustancial la actividad enzimática del polipéptido. Del mismo modo, un ácido nucleico de la invención también puede estar sujeto a diversos cambios, tales como una o más sustituciones de uno o más ácidos nucleicos en uno o más codones, de tal forma que un codón concreto codifique el mismo aminoácido o un aminoácido distinto, dando como resultado una variación silenciosa (p. ej., una mutación en una secuencia nucleotídica deriva en una mutación silenciosa en la secuencia de aminoácidos, por ejemplo, cuando el aminoácido codificado no se ve alterado por la mutación del ácido nucleico) o bien una variación no silenciosa, una o más deleciones de uno o más ácidos nucleicos (o codones) en la secuencia, una o más adiciones o inserciones de uno o más ácidos nucleicos (o codones) en la secuencia, y/o la escisión de uno o más truncamientos de uno o más ácidos nucleicos (o codones) en la secuencia. Muchos de dichos cambios en la secuencia de ácido nucleico pueden no alterar considerablemente la actividad enzimática de la variante de proteasa codificada resultante en comparación con la variante de proteasa codificada por la secuencia de ácido nucleico original. Un ácido nucleico de la invención también se puede modificar para incluir uno o más codones que proporcionan una expresión óptima en un sistema de expresión (p. ej., sistema de expresión bacteriano), mientras que, si se desea, dicho(s) uno o más codón(es) codifica(n) todavía el/los mismo(s) aminoácido(s).

[0118] En algunas formas de realización, la presente descripción da a conocer un género de polipéptidos que comprende polipéptidos variantes de proteasa que presentan la actividad enzimática deseada (p. ej., actividad de proteasa o actividad de rendimiento de limpieza) que comprende secuencias que presentan las sustituciones de aminoácido descritas en el presente documento, y también que comprende una o más sustituciones de aminoácido adicionales, como sustituciones conservadoras o no conservadoras, donde el polipéptido muestra, conserva o mantiene de forma aproximada la actividad enzimática deseada (p. ej., actividad de proteasa o actividad de subtilisina, como se reflejó en la actividad de limpieza o en el rendimiento de la variante de proteasa). Las sustituciones de aminoácidos de acuerdo con la invención pueden incluir, sin carácter limitativo, una o más sustituciones no conservadoras y/o una o más sustituciones conservadoras de aminoácidos. Una sustitución conservadora de residuo de aminoácido implica normalmente intercambiar un miembro perteneciente a una clase funcional de residuos de aminoácidos por un residuo que pertenezca a la misma clase funcional (los residuos de aminoácidos idénticos se consideran homólogos desde el punto de vista funcional o se conservan al calcular el porcentaje de homología funcional). Una sustitución conservadora de aminoácido implica normalmente la sustitución de un aminoácido en una secuencia de aminoácidos por un aminoácido similar desde el punto de vista funcional. Por ejemplo, la alanina, la glicina, la serina y la treonina son similares desde el punto de vista funcional y pueden servir mutuamente, por lo tanto, como sustituciones conservadoras de aminoácidos. El ácido aspártico y el ácido glutámico pueden servir mutuamente como sustituciones conservadoras. La

asparagina y la glutamina pueden servir mutuamente como sustituciones conservadoras. La arginina, la lisina y la histidina pueden servir mutuamente como sustituciones conservadoras. La isoleucina, la leucina, la metionina y la valina pueden servir mutuamente como sustituciones conservadoras. La fenilalanina, la tirosina y el triptófano pueden servir mutuamente como sustituciones conservadoras.

[0119] Se pueden contemplar otros grupos de sustituciones conservadoras de aminoácidos. Por ejemplo, se pueden agrupar los aminoácidos según su función, estructura química o composición similares (p. ej., ácida, básica, alifática, aromática o con contenido de azufre). Por ejemplo, un agrupamiento alifático puede comprender: Glicina (G), Alanina (A), Valina (V), Leucina (L), Isoleucina (I). Otros grupos que contienen aminoácidos y que se consideran sustituciones conservadoras mutuas incluyen: aromáticos: fenilalanina (F), tirosina (Y), triptófano (W); con contenido en azufre: metionina (M), cisteína (C); básicos: arginina (R), lisina (K), histidina (H); ácidos: ácido aspártico (D), ácido glutámico (E); residuos no polares sin carga: cisteína (C), metionina (M) y prolina (P); residuos hidrofílicos sin carga: serina (S), treonina (T), asparagina (N) y glutamina (Q). Los agrupamientos adicionales de aminoácidos resultan conocidos para los expertos en la materia y se describen en diversos libros de texto convencionales. El hecho de listar una secuencia polipeptídica en el presente documento, así como los grupos de sustitución expuestos anteriormente, proporciona un listado explícito de todas las secuencias de polipéptidos sustituidas de manera conservadora.

[0120] Existen más sustituciones conservadoras en las clases de residuo de aminoácido descritas anteriormente, que también, o de forma alternativa, pueden ser adecuadas. Los grupos de conservación para sustituciones que son más conservadoras incluyen: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, y asparagina-glutamina. Así, por ejemplo, en algunas formas de realización, la invención proporciona un polipéptido variante de proteasa aislado o recombinante (p. ej., variante de subtilisina) que presenta actividad proteolítica, comprendiendo dicho polipéptido variante de proteasa una secuencia de aminoácidos que posee al menos aproximadamente un 90 %, aproximadamente un 95 %, aproximadamente un 96 %, aproximadamente un 97 %, aproximadamente un 98 %, aproximadamente un 99 %, o aproximadamente un 99,5 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º 2. No se prevé que una sustitución conservadora de un aminoácido por otro en una variante de proteasa de la invención altere de manera significativa la actividad enzimática o la actividad de rendimiento de limpieza de la variante de proteasa. La actividad enzimática o la actividad de rendimiento de limpieza de la proteasa resultante se puede determinar fácilmente utilizando los ensayos convencionales y los ensayos descritos en el presente documento.

[0121] Las variaciones sustituidas de forma conservadora de una secuencia polipeptídica (p. ej., variantes de proteasa de la invención) incluyen sustituciones de un pequeño porcentaje, en ocasiones inferior a aproximadamente un 25 %, aproximadamente un 20 %, aproximadamente un 15 %, aproximadamente un 14 %, aproximadamente un 13 %, aproximadamente un 12 %, aproximadamente un 11 %, aproximadamente un 10 %, aproximadamente un 9 %, aproximadamente un 8 %, aproximadamente un 7 %, o aproximadamente un 6 % de los aminoácidos de la secuencia polipeptídica, o inferior a aproximadamente un 5 %, aproximadamente un 4 %, aproximadamente un 3 %, aproximadamente un 2 %, o aproximadamente un 1 %, de los aminoácidos de la secuencia polipeptídica, con un aminoácido seleccionado de manera conservadora del mismo grupo de sustitución conservadora.

[0122] Según lo descrito con más detalle en otra sección del presente documento y en los Ejemplos expuestos en la presente memoria descriptiva, los polipéptidos de la descripción pueden presentar capacidades de limpieza que se pueden comparar con proteasas conocidas, incluidas subtilisinas conocidas. Entre los ejemplos de proteasas subtilisinas conocidas se incluyen, a modo de ejemplo y sin carácter limitativo, subtilisina GG36 de *B. lentus*, subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens*, subtilisina BPN'-Y217L de *B. amyloliquefaciens*, y PB92 de *B. clausii*. La secuencia de aminoácidos de la proteína subtilisina GG36 madura de *B. lentus* es:

AQSVPWGISRVQAPAAHNRGLTGSGVKVAVLDTGISTHPDLNIRGGASFVPGEPSTQDGNGHGT
HVAGTIAALNNSIGVLGVAPSAELYAVKVLGASGSGSVSSIAQGLEWAGNNGMHVANLSLGSPS
PSATLEQAVNSATSRGVLVVAASGNSGAGSISYPARYANAMAVGATDQNNNRASFSQYGAGLD
IVAPGVNVQSTYPGSTYASLNGTSMATPHVAGAAALVKQKNPSWSNVQIRNHL
KNTATSLGSTNLYGSGLVNAEAATR (SEQ ID NO:2)

[0123] La secuencia de aminoácidos de la proteína subtilisina BPN' madura de *B. amyloliquefaciens* es:

AQSVPYGVSQIKAPALHSQGYTGSNVKVAVIDSGIDSSHPDLKVAGGASMVPSETNPFQDNNSH
GTHVAGTVAALNNSIGVLGVAPSASLYAVKVLGADGSGQYSWIINGIEWAIANNMDVINMSLG
GPSGSAALKAAVDKAVASGVVVVAAAGNEGTSGSSSTVGYPGKYPSVIAVGAVDSSNQRASFS
SVGPELDVMAPGVSIQSTLPGNKYGAYNGTSMASPHVAGAAALILSKHPNWTNTQVRSSL
ENTTTKLGDSFYYGKGLINVQAAAQ (SEQ ID NO:1)

[0124] La presente invención da a conocer polipéptidos que comprenden variantes de subtilisina de subtilisina de *Bacillus*, donde la variante de subtilisina es como la que se define en la reivindicación 1.

[0125] Preferiblemente, estas proteasas forman parte de una composición detergente que se añade a agua en un proceso de lavado a mano o bien a máquina, normalmente en una lavadora, para formar un líquido de lavado, cuya conductividad sea desde más de aproximadamente 3 mS/cm hasta aproximadamente 30 mS/cm, desde aproximadamente 3,5 mS/cm hasta aproximadamente 20 mS/cm, o incluso desde aproximadamente 4 mS/cm hasta aproximadamente 10 mS/cm.

[0126] Sin querer limitarse a la teoría, se cree que estas mutaciones que alcanzan una carga neta deseada proporcionan un rendimiento general de proteasa mejorado en condiciones de elevada fuerza iónica o alta concentración de detergente; únicamente mediante la cuidadosa combinación de ciertas mutaciones, de entre las cuales se prefieren estas, se pueden obtener dichas proteasas preferidas.

[0127] La presente descripción da a conocer además polipéptidos que comprenden variantes de proteasa que presentan una o más de las siguientes características: a) un índice de rendimiento del Método de Ensayo 2 de al menos 1,1, al menos 1,2, al menos 1,3, al menos 1,4, al menos 1,5, al menos 1,6, al menos 1,7, al menos 1,8, al menos 1,9, al menos 2, desde 1,1 hasta aproximadamente 10, desde 1,1 hasta aproximadamente 8, o incluso desde 1,1 hasta aproximadamente 5; b) un índice de rendimiento del Método de Ensayo 3 de al menos 1,1, al menos 1,2, al menos 1,3, al menos 1,4, al menos 1,5, al menos 1,6, al menos 1,7, al menos 1,8, al menos 1,9, al menos 2, desde 1,1 hasta aproximadamente 10, desde 1,1 hasta aproximadamente 8, o incluso desde 1,1 hasta aproximadamente 5; c) un índice de rendimiento del Método de Ensayo 4 de al menos 1,0, al menos 1,1, al menos 1,2, al menos 1,3, al menos 1,4, al menos 1,5, al menos 1,6, al menos 1,7, al menos 1,8, al menos 1,9, al menos 2, desde 1,0 hasta aproximadamente 10, desde 1,0 hasta aproximadamente 8, o incluso desde 1,0 hasta aproximadamente 5; y/o d) un índice de rendimiento del Método de Ensayo 6 de al menos 1,0, al menos 1,1, al menos 1,2, al menos 1,3, al menos 1,4, al menos 1,5, al menos 1,6, al menos 1,7, al menos 1,8, al menos 1,9, al menos 2, desde 1,0 hasta aproximadamente 10, desde 1,0 hasta aproximadamente 8, o incluso desde 1,0 hasta aproximadamente 5. El Método de Ensayo 2, el Método de Ensayo 3, el Método de Ensayo 4 y el Método de Ensayo 6 se describen explícitamente en la sección del Ejemplo 1 titulada “Métodos de Ensayo”, *infra*.

Ácidos nucleicos de la invención

[0128] La invención da a conocer ácidos nucleicos aislados, de origen no natural, o recombinantes (también denominados en el presente documento “polinucleótidos”), que se pueden denominar en conjunto como “ácidos nucleicos de la invención” o “polinucleótidos de la invención”, que codifican las variantes de subtilisina de la invención. Los ácidos nucleicos de la invención, incluidos todos los descritos más adelante, resultan útiles para la producción recombinante (p. ej., expresión) de polipéptidos, normalmente a través de la expresión de un vector de expresión plasmídico que comprende una secuencia que codifica el polipéptido de interés o un fragmento del mismo. Según se ha descrito anteriormente, los polipéptidos incluyen polipéptidos variantes de proteasa, incluyendo polipéptidos variantes de subtilisina que poseen actividad enzimática (p. ej., actividad proteolítica) y que resultan útiles en aplicaciones de limpieza y composiciones de limpieza para limpiar un artículo o una superficie (p. ej., superficie de un artículo) que precise limpieza.

[0129] En algunos aspectos, la descripción ofrece un ácido nucleico aislado, recombinante, considerablemente puro, o de origen no natural que comprende una secuencia nucleotídica que codifica cualquier polipéptido (incluyendo cualquier proteína de fusión, etc.) descrito anteriormente en la sección titulada “Polipéptidos de la descripción” y en cualquier otra sección del presente documento. La descripción también ofrece un ácido nucleico aislado, recombinante, considerablemente puro, o de origen no natural que comprende una secuencia nucleotídica que codifica una combinación de dos o más de cualquiera de los polipéptidos descritos anteriormente y en cualquier otra sección del presente documento.

[0130] La presente invención ofrece ácidos nucleicos que codifican una variante de subtilisina definida en la reivindicación 1.

[0131] En algunas formas de realización, las variantes de proteasa de agua fría y de elevada fuerza iónica expuestas anteriormente forman parte de una composición detergente que se diluye en agua, normalmente en una lavadora para ropa, con el fin de formar un líquido de lavado detergente para ropa, cuya conductividad sea desde aproximadamente 3 mS/cm hasta aproximadamente 30 mS/cm, desde aproximadamente 3,5 mS/cm hasta aproximadamente 20 mS/cm, o incluso desde aproximadamente 4 mS/cm hasta aproximadamente 10 mS/cm.

[0132] La carga de las variantes de proteasa de agua fría se expresa en relación con la proteasa subtilisina GG36 de tipo natural de *B. lentus* que presenta la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 2. Los aminoácidos que aportan una única carga negativa son D y E, y los que aportan una única carga positiva son R, H y K. Cualquier cambio de aminoácido con respecto a la SEQ ID N.º 2 que modifique una carga se utiliza para calcular la carga de la variante de proteasa de agua fría. Por ejemplo, al introducir una mutación con carga negativa desde una posición neutra de tipo natural, se añadirá una carga neta de -1 a la variante de proteasa de agua fría, mientras que, al introducir una mutación con carga negativa (D o E) desde un residuo de aminoácido positivo de tipo natural (R, H o K), se añadirá una carga neta de -2. La suma de los cambios de carga de todos los residuos de aminoácido que son distintos para la variante de proteasa de agua fría con respecto a la proteasa subtilisina GG36 de tipo natural de *B. lentus* que presenta la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º 2 da como resultado el cambio de carga de la variante de proteasa de agua fría. Sin querer limitarse a la teoría, se

cree que: el intervalo de carga preferido para proteasas de agua fría que se va a utilizar en soluciones detergentes para ropa con baja conductividad es -5, -4, -3, -2, -1, 0, especialmente -2, -1; el intervalo de carga preferido para proteasas de agua fría que se va a utilizar en soluciones detergentes para ropa con alta conductividad es +5, +4, +3, +2, +1, 0, especialmente +2, +1. Al seleccionar correctamente la carga, se pueden obtener niveles inesperadamente mejorados de rendimiento de limpieza en agua fría. Las "soluciones detergentes para ropa de baja conductividad" se definen como soluciones que presentan una conductividad que oscila entre aproximadamente 0,1 mS/cm y aproximadamente 3 mS/cm, desde aproximadamente 0,3 mS/cm hasta aproximadamente 2,5 mS/cm, o incluso desde aproximadamente 0,5 mS/cm hasta aproximadamente 2 mS/cm. Las "soluciones detergentes para ropa de alta conductividad" se definen como soluciones que presentan una conductividad que oscila entre aproximadamente 3 mS/cm y aproximadamente 30 mS/cm, desde aproximadamente 3,5 mS/cm hasta aproximadamente 20 mS/cm, o incluso desde aproximadamente 4 mS/cm hasta aproximadamente 10 mS/cm. Se pretende que los ejemplos anteriores no sean limitativos. Una vez combinadas las mutaciones para optimizar el rendimiento en agua fría, la carga enzimática se puede equilibrar también mediante mutaciones en posiciones adicionales.

[0133] Los ácidos nucleicos de la invención se pueden generar utilizando cualquier técnica de síntesis, manipulación y/o aislamiento adecuada, o combinaciones de las mismas. Por ejemplo, se puede producir un polinucleótido de la invención utilizando técnicas convencionales de síntesis de ácidos nucleicos, tales como técnicas de síntesis en fase sólida conocidas por los expertos en la materia. En tales técnicas, se sintetizan normalmente fragmentos de hasta 50 o más bases de nucleótidos, después se unen (p. ej., mediante métodos de ligación enzimática o química, o métodos de recombinación mediada por polimerasa) para formar básicamente cualquier secuencia de ácido nucleico continua que se desee. La síntesis de los ácidos nucleicos de la invención se puede facilitar también (o lograr de forma alternativa) mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica, incluyendo, sin carácter limitativo, la síntesis química utilizando el método tradicional de la fosforamidita (véase, p. ej., Beaucage *et al.* Tetrahedron Letters 22:1859-69 [1981]); o el método descrito por Matthes *et al.* (véase, Matthes *et al.*, EMBO J. 3:801-805 [1984], como se pone en práctica normalmente en métodos sintéticos automatizados.. Los ácidos nucleicos de la invención se pueden producir también utilizando un sintetizador de ADN automático. Se pueden solicitar ácidos nucleicos personalizados a través de varias fuentes comerciales (p. ej., The Midland Certified Reagent Company, Great American Gene Company, Operon Technologies Inc., y DNA2.0). En la técnica se conocen otras técnicas para sintetizar ácidos nucleicos y principios relacionados (véase. p. ej., Itakura *et al.*, Ann. Rev. Biochem. 53:323 [1984]; e Itakura *et al.*, Science 198:1056 [1984]).

[0134] Como se ha indicado anteriormente, en la técnica se conocen técnicas de ADN recombinante útiles para la modificación de ácidos nucleicos. Por ejemplo, técnicas como la digestión de endonucleasa de restricción, la ligación, la transcripción inversa y la producción de ADNc, y la reacción en cadena de la polimerasa (p. ej., PCR), resultan conocidas para los expertos en la materia y se emplean fácilmente. Los nucleótidos de la invención se pueden obtener también mediante el cribado de bibliotecas de ADNc (p. ej., bibliotecas de ADNc generadas empleando técnicas de mutagénesis utilizadas habitualmente en la técnica, incluidas las descritas en el presente documento) usando una o más sondas de oligonucleótidos que se puedan hibridar o polinucleótidos amplificados por PCR que codifiquen un(os) polipéptido(s) variante(s) de proteasa de la invención. Los procedimientos para el cribado y el aislamiento de clones de ADNc y los procedimientos para la amplificación por PCR resultan conocidos para los expertos en la materia y se describen en referencias convencionales conocidas por los expertos en la materia. Se pueden obtener algunos ácidos nucleicos de la invención alterando un esqueleto polinucleotídico de origen natural (p. ej., que codifica una enzima o proteasa parental) mediante, por ejemplo, un procedimiento de mutagénesis conocido (p. ej., mutagénesis sitio-dirigida, mutagénesis por saturación de sitio, y recombinación *in vitro*).

Métodos para realizar variantes de proteasa modificadas de la invención

[0135] En la técnica se conocen varios métodos que resultan adecuados para generar polinucleótidos modificados de la invención que codifican variantes de proteasa de la invención, incluyendo, a modo de ejemplo y sin carácter limitativo, mutagénesis por saturación de sitio, mutagénesis de barrido, mutagénesis insercional, mutagénesis por deleción, mutagénesis aleatoria, mutagénesis sitio-dirigida y evolución dirigida, así como otros diversos enfoques recombinatorios. Entre los métodos para realizar polinucleótidos y proteínas modificados (p. ej., variantes de proteasa) se incluyen metodologías de barajado de ADN, métodos basados en la recombinación no homóloga de genes, tales como ITCHY (véase Ostermeier *et al.*, 7:2139-44 [1999]), SCRACHY (véase Lutz *et al.* 98:11248-53 [2001]), SHIPREC (véase, Sieber *et al.,* 19:456-60 [2001]), y NRR (véase, Bittker *et al.,* 20:1024-9 [2001]; Bittker *et al.,* 101:7011-6 [2004]), y métodos que se basan en el uso de oligonucleótidos para insertar mutaciones, deleciones y/o inserciones aleatorias y dirigidas (véase, Ness *et al.,* 20:1251-5 [2002]; Coco *et al.,* 20:1246-50 [2002]; Zha *et al.,* 4:34-9 [2003]; Glaser *et al.,* 149:3903-13 [1992]).

Vectores, células y métodos para producir variantes de proteasa de la invención

[0136] La presente invención da a conocer vectores aislados o recombinantes que comprenden al menos un polinucleótido de la invención descrito en el presente documento (p. ej., un polinucleótido que codifica una variante de proteasa de la invención descrita en el presente documento), vectores de expresión o casetes de

expresión aislados o recombinantes que comprenden al menos un ácido nucleico o polinucleótido de la invención, constructos de ADN aislados, considerablemente puros, o recombinantes, que comprenden al menos un ácido nucleico o polinucleótido de la invención, células aisladas o recombinantes que comprenden al menos un polinucleótido de la invención, cultivos celulares que comprenden células que comprenden al menos un polinucleótido de la invención, cultivos celulares que comprenden al menos un ácido nucleico o polinucleótido de la invención, y composiciones que comprenden uno o más de dichos vectores, ácidos nucleicos, vectores de expresión, casetes de expresión, constructos de ADN, células, cultivos celulares, o cualquier combinación o mezcla de los mismos.

[0137] En algunas formas de realización, la invención da a conocer células recombinantes que comprenden al menos un vector (p. ej., vector de expresión o constructo de ADN) de la invención que comprende al menos un ácido nucleico o polinucleótido de la invención. Algunas de tales células recombinantes se transforman o se transfectan con dicho al menos un vector. Normalmente, se hace referencia a dichas células como células hospedadoras. Algunas de dichas células comprenden células bacterianas, incluyendo, sin carácter limitativo, células de *Bacillus* sp., tales como células de *B. subtilis*. La invención también da a conocer células recombinantes (p. ej., células hospedadoras recombinantes) que comprenden al menos una variante de proteasa de la invención.

[0138] En algunas formas de realización, la invención da a conocer un vector que comprende un ácido nucleico o polinucleótido de la invención. En algunas formas de realización, el vector es un vector de expresión o casete de expresión en el que una secuencia polinucleotídica de la invención que codifica una variante de proteasa de la invención está ligada de forma operativa a uno o más segmentos de ácido nucleico necesarios para una expresión génica eficiente (p. ej., un promotor ligado de forma operativa al polinucleótido de la invención que codifica una variante de proteasa de la invención). Un vector puede incluir un terminador de la transcripción y/o un gen de selección, tal como un gen de resistencia a los antibióticos que posibilite el mantenimiento en cultivo continuo de células hospedadoras infectadas por plásmidos mediante el cultivo en medios que contengan antimicrobianos.

[0139] Un vector de expresión puede derivar de ADN plasmídico o viral o, en formas de realización alternativas, contener elementos de ambos. Entre los ejemplos de vectores se incluyen, aunque sin carácter limitativo, pXX, pC194, pJH101, pE194, pHP13 (véase, Harwood y Cutting [eds.], Capítulo 3, Molecular Biological Methods for Bacillus, John Wiley e Hijos [1990]; entre los plásmidos replicativos adecuados para *B. subtilis* se incluyen aquellos listados en la p. 92; véase también, Perego, Integrational Vectors for Genetic Manipulations in Bacillus subtilis, en Sonenshein *et al*., [eds.] Bacillus subtilis and Other Gram-Positive Bacteria: Biochemistry. Physiology and Molecular Genetics, American Society for Microbiology, Washington, D.C., [1993] pp. 615-624).

[0140] Para la expresión y producción de una proteína de interés (p. ej., variante de proteasa) en una célula, al menos un vector de expresión que comprende al menos una copia de un polinucleótido que codifica la proteasa modificada, y que preferiblemente comprende múltiples copias, se transforma en la célula en condiciones adecuadas para la expresión de la proteasa. En algunas formas de realización de la presente invención, una secuencia de polinucleótidos que codifica la variante de proteasa (así como otras secuencias incluidas en el vector) se integra en el genoma de la célula hospedadora, mientras que, en otras formas de realización, un vector plasmídico que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica la variante de proteasa permanece como elemento extracromosómico autónomo en la célula. La invención proporciona tanto elementos extracromosómicos de ácido nucleico como secuencias nucleotídicas entrantes que se integran en el genoma de la célula hospedadora. Los vectores descritos en el presente documento resultan útiles para la producción de las variantes de proteasa de la invención. En algunas formas de realización, un constructo de polinucleótido que codifica la variante de proteasa está presente en un vector de integración que permite la integración y, opcionalmente, la amplificación del polinucleótido que codifica la variante de proteasa en el cromosoma bacteriano. Los expertos en la materia conocen ejemplos de sitios de integración. En algunas formas de realización, la transcripción de un polinucleótido que codifica una variante de proteasa de la invención la lleva a cabo un promotor que es el promotor de tipo natural para la proteasa precursora seleccionada. En algunas otras formas de realización, el promotor es heterólogo a la proteasa precursora, pero es funcional en la célula hospedadora. En concreto, entre los ejemplos de promotores adecuados para su uso en células hospedadoras bacterianas se incluyen, a modo de ejemplo y sin carácter limitativo, los promotores amyE, amyQ, amyL, pstS, sacB, pSPAC, pAprE, pVeg, pHpaII, el promotor del gen de amilasa maltogénica de *B. stearothermophilus*, el gen de amilasa de *B. amyloliquefaciens* (BAN), el gen de proteasa alcalina de *B. subtilis*, el gen de proteasa alcalina de *B. clausii*, el gen de xilosidasa de *B. pumilis*, cryIIIA de *B. thuringiensis*, y el gen de alfa-amilasa de *B. licheniformis*. Entre los promotores adicionales se incluyen, aunque sin carácter limitativo, el promotor A4, así como los promotores del fago lambda P_R o P_L, y los promotores lac, trp o tac de *E. coli*.

[0141] Se pueden producir variantes de proteasa de la presente invención en células hospedadoras de cualquier microorganismo grampositivo adecuado, incluidas bacterias y hongos. Por ejemplo, en algunas formas de realización, la variante de proteasa se produce en células hospedadoras de origen fúngico y/o bacteriano. En algunas formas de realización, las células hospedadoras son de *Bacillus* sp., *Streptomyces* sp., *Escherichia* sp. o *Aspergillus* sp. En algunas formas de realización, las variantes de proteasa las producen células hospedadoras de *Bacillus* sp. Entre los ejemplos de células hospedadoras de *Bacillus* sp. que se pueden utilizar para producir

variantes de proteasa de la invención se incluyen, sin carácter limitativo, *B. licheniformis, B. lentus, B. subtilis, B. amyloliquefaciens, B. lentus, B. brevis, B. stearothermophilus, B. alkalophilus, B. coagulans, B. circulans, B. pumilis, B. thuringiensis, B. clausii,* y *B. megaterium,* así como otros organismos pertenecientes al género *Bacillus*. En algunas formas de realización, se utilizan células hospedadoras de *B. subtilis* para la producción de variantes de proteasa. En las patentes estadounidenses 5,264,366 y 4,760,025 (RE 34,606) se describen diversas cepas hospedadoras de *Bacillus* que se pueden utilizar para producir variantes de proteasa de la invención, aunque se pueden utilizar otras cepas adecuadas.

[0142] Varias cepas bacterianas industriales que se pueden utilizar para producir variantes de proteasa de la invención incluyen cepas de *Bacillus* sp. no recombinantes (esto es, de tipo natural), así como variantes de cepas de origen natural y/o de cepas recombinantes. En algunas formas de realización, la cepa hospedadora es una cepa recombinante, donde se ha introducido un polinucleótido que codifica un polipéptido de interés en el hospedador. En algunas formas de realización, la cepa hospedadora es una cepa hospedadora de *B. subtilis*, y especialmente una cepa hospedadora recombinante de *Bacillus subtilis*. Se conocen numerosas cepas de *B. subtilis*, incluidas, a modo de ejemplo y sin carácter limitativo, la cepa 1A6 (ATCC 39085), 168 (1A01), SB19, W23, Ts85, B637, PB1753 mediante PB1758, PB3360, JH642, 1A243 (ATCC 39,087), ATCC 21332, ATCC 6051, MI113, DE100 (ATCC 39,094), GX4931, PBT 110, y PEP 211 (véase, p. ej., Hoch *et al*., Genetics 73:215-228 [1973]; véanse también las patentes estadounidenses n.ºs 4,450,235 y 4,302,544, y la patente europea EP 0134048). El uso de *B. subtilis* como células hospedadoras de expresión se conoce en la técnica (véanse, p. ej., Palva *et al*., Gene 19:81-87 [1982]; Fahnestock y Fischer, J. Bacteriol., 165:796-804 [1986]; y Wang *et al*., Gene 69:39-47 [1988]).

[0143] En algunas formas de realización, la célula hospedadora de *Bacillus* es una *Bacillus* sp. que incluye una mutación o deleción en al menos uno de los siguientes genes: *degU*, *degS*, *degR* y *degQ*. Preferiblemente, la mutación se da en un gen *degU* y, más preferiblemente, la mutación es *degU(Hy)32* (véase, p. ej., Msadek *et al*., J. Bacteriol. 172:824-834 [1990]; y Olmos *et al*., Mol. Gen. Genet. 253:562-567 [1997]). Una cepa hospedadora adecuada es una de *Bacillus subtilis* que porte una mutación *degU32(Hy)*. En algunas formas de realización, el hospedador *Bacillus* comprende una mutación o deleción en *scoC4* (véase, p. ej., Caldwell *et al*., J. Bacteriol. 183:7329-7340 [2001]); *spoIIE* (véase, p. ej., Arigoni *et al*., Mol. Microbiol. 31:1407-1415 [1999]); y/u *oppA* u otros genes del operón *opp* (véase, p. ej., Perego *et al*., Mol. Microbiol. 5:173-185 [1991]). De hecho, se contempla que cualquier mutación en el operón *opp* que cause el mismo fenotipo que el de una mutación en el gen *oppA* se podrá utilizar en algunas formas de realización de la cepa alterada de *Bacillus* de la invención. En algunas formas de realización, estas mutaciones ocurren solas, mientras que, en otras formas de realización, se encuentran combinaciones de mutaciones. En algunas formas de realización, una cepa alterada de célula hospedadora de *Bacillus* que se puede utilizar para producir una variante de proteasa de la invención es una cepa hospedadora de *Bacillus* que ya incluye una mutación en uno o más de los genes anteriormente mencionados. Además, se pueden utilizar células hospedadoras de *Bacillus* sp. que comprenden mutación(es) y/o deleciones de genes de proteasa endógenos. En algunas formas de realización, la célula hospedadora de *Bacillus* comprende una deleción de los genes *aprE* y *nprE*. En otras formas de realización, la célula hospedadora de *Bacillus* sp. comprende una deleción de 5 genes de proteasa, mientras que, en otras formas de realización, la célula hospedadora de *Bacillus* sp. comprende una deleción de 9 genes de proteasa (véase, p. ej., la publicación de la solicitud de patente estadounidense n.º 2005/0202535.

[0144] Las células hospedadoras se transforman con al menos un ácido nucleico que codifica al menos una variante de proteasa de la invención utilizando cualquier método adecuado conocido en la técnica. Tanto si el ácido nucleico se incorpora en un vector como si se utiliza sin la presencia de ADN plasmídico, este normalmente se introduce en un microorganismo, en algunas formas de realización, preferiblemente una célula de *E. coli* o una célula de *Bacillus* competente. Se conocen métodos para introducir un ácido nucleico (p. ej., ADN) en células de *Bacillus* o en células de *E. coli* utilizando constructos o vectores de ADN plasmídico y transformando dichos constructos o vectores de ADN plasmídico en dichas células. En algunas formas de realización, los plásmidos se aíslan posteriormente de las células de *E. coli* y se transforman en células de *Bacillus*. No obstante, no resulta indispensable utilizar microorganismos intervinientes tales como *E. coli*, y, en algunas formas de realización, se introduce directamente un constructo o vector de ADN en un hospedador *Bacillus*.

[0145] Los expertos en la materia son conocedores de métodos adecuados para introducir secuencias de ácidos nucleicos o de polinucleótidos de la invención en células de *Bacillus* (véanse, p. ej., Ferrari *et al*., "Genetics", en Harwood *et al*. [eds.], Bacillus, Plenum Publishing Corp. [1989], pp. 57-72; Saunders *et al*., J. Bacteriol. 157:718-726 [1984]; Hoch *et al*., J. Bacteriol. 93:1925 -1937 [1967]; Mann *et al*., Current Microbiol. 13:131-135 [1986]; Holubova, Folia Microbiol. 30:97 [1985]; Chang *et al*., Mol. Gen. Genet. 168:11-115 [1979]; Vorobjeva *et al*., FEMS Microbiol. Lett. 7:261-263 [1980]; Smith *et al*., Appl. Env. Microbiol. 51:634 [1986]; Fisher *et al*., Arch. Microbiol. 139:213-217 [1981]; y McDonald, J. Gen. Microbiol. 130:203 [1984]). De hecho, tales métodos, como la transformación, incluida la transformación y la congresión de protoplastos, la transducción, y la fusión de protoplastos, se conocen y son adecuados para su uso en la presente invención. Se utilizan métodos de transformación para introducir un constructo o vector de ADN que comprende un ácido nucleico que codifica una variante de proteasa de la presente invención en una célula hospedadora. Entre los métodos conocidos en la

técnica para transformar células de *Bacillus* se incluyen métodos como la transformación de rescate de marcador plasmídico, lo cual implica la absorción de un plásmido donador por parte de células competentes que portan un plásmido residente parcialmente homólogo (véanse Contente *et al.*, Plasmid 2:555-571 [1979]; Haima *et al.*, Mol. Gen. Genet. 223:185-191 [1990]; Weinrauch *et al.*, J. Bacteriol. 154:1077-1087 [1983]; y Weinrauch *et al.*, J. Bacteriol. 169:1205-1211 [1987]). En este método, el plásmido donador entrante se recombina con la región homóloga del plásmido residente "ayudante" en un proceso que imita la transformación cromosómica.

[0146] Además de métodos utilizados habitualmente, en algunas formas de realización, las células hospedadoras se transforman directamente con un constructo o vector de ADN que comprende un ácido nucleico que codifica una variante de proteasa de la invención (es decir, no se utiliza una célula intermedia para amplificar, o para procesar de otra manera, el constructo o vector de ADN con anterioridad a su introducción en la célula hospedadora). La introducción del constructo o vector de ADN de la invención en la célula hospedadora incluye los métodos físicos y químicos que se conocen en la técnica para introducir una secuencia de ácido nucleico (p. ej., secuencia de ADN) en una célula hospedadora sin su inserción en un plásmido o vector. Tales métodos incluyen, aunque sin carácter limitativo, precipitación con cloruro de calcio, electroporación, ADN desnudo, liposomas, y similares. En formas de realización adicionales, los constructos o vectores de ADN se cotransforman con un plásmido, sin que se inserten en el plásmido. En otras formas de realización, se elimina un marcador selectivo de la cepa alterada de *Bacillus* mediante métodos conocidos en la técnica (véanse, Stahl *et al.*, J. Bacteriol. 158:411-418 [1984]; y Palmeros *et al.*, Gene 247:255 -264 [2000]).

[0147] En algunas formas de realización, las células transformadas de la presente invención se cultivan en medios nutritivos convencionales. Las condiciones de cultivo específicas y adecuadas, como la temperatura, el pH y similares, son conocidas para los expertos en la materia y se describen en la literatura científica. En algunas formas de realización, la invención da a conocer un cultivo (p. ej., cultivo celular) que comprende al menos una variante de proteasa o al menos un ácido nucleico de la invención. También se proporcionan composiciones que comprenden al menos un ácido nucleico, vector, o constructo de ADN de la invención.

[0148] En algunas formas de realización, las células hospedadoras transformadas con al menos una secuencia de polinucleótidos que codifica al menos una variante de proteasa de la invención se cultivan en un medio nutritivo adecuado en condiciones que permiten la expresión de la presente proteasa, tras lo cual se recupera la proteasa resultante del cultivo. El medio utilizado para cultivar las células comprende cualquier medio convencional adecuado para cultivar las células hospedadoras, como medios mínimos o complejos que contienen complementos apropiados. Hay disponibles medios adecuados a través de proveedores comerciales, o se pueden preparar conforme a recetas publicadas (véanse, p. ej., los catálogos de la American Type Culture Collection). En algunas formas de realización, la proteasa producida por las células se recupera del medio de cultivo mediante procedimientos convencionales, incluyendo, a modo de ejemplo y sin carácter limitativo, separar las células hospedadores del medio mediante centrifugación o filtración, precipitar los componentes proteínicos del sobrenadante o líquido filtrado por medio de una sal (p. ej., sulfato de amonio), purificación por cromatografía (p. ej., intercambio iónico, filtrado con gel, afinidad, etc.). Se puede utilizar en la presente invención cualquier método adecuado para recuperar o purificar una variante de proteasa en la presente invención.

[0149] En algunas formas de realización, se secreta una variante de proteasa producida por una célula hospedadora recombinante en el medio de cultivo. Una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio que facilita la purificación se puede utilizar para facilitar la purificación de proteínas solubles. Un vector o constructo de ADN que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica una variante de proteasa puede comprender además una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio que facilita la purificación para facilitar la purificación de la variante de proteasa (véase, p. ej., Kroll *et al.*, DNA Cell Biol. 12:441-53 [1993]). Entre tales dominios que facilitan la purificación se incluyen, a modo de ejemplo y sin carácter limitativo, péptidos quelantes de metales, tales como módulos de histidina-triptófano que permiten la purificación en metales inmovilizados (véase Porath, Protein Expr. Purif. 3:263-281 [1992]), dominios de proteína A que permiten la purificación sobre inmunoglobulina inmovilizada, y el dominio utilizado en el sistema de purificación por extensión/afinidad FLAGS (p. ej., dominios de proteína A disponibles a través de Immunex Corp., Seattle, Washington). La inclusión de una secuencia enlazadora escindible, como Factor XA o enteroquinasa (p. ej., secuencias disponibles a través de Invitrogen, San Diego, California) entre el dominio de purificación y la proteína heteróloga también se puede emplear para facilitar la purificación.

[0150] Se conocen ensayos para detectar y medir la actividad enzimática de una enzima, tal como una variante de proteasa de la invención. Los expertos en la materia también conocen diversos ensayos para detectar y medir la actividad de proteasas (p. ej., variantes de proteasa de la invención). En concreto, hay disponibles ensayos para medir la actividad de proteasa basados en la liberación de péptidos de caseína o hemoglobina solubles en ácido, medida como la absorbancia a 280 nm, o colorimétricamente utilizando el método de Folin, que resulta conocido para los expertos en la materia. Otros ejemplos de ensayos implican la solubilización de sustratos cromogénicos (véase, p. ej., Ward, "Proteinases", en Fogarty (ed.)., Microbial Enzymes and Biotechnology, Applied Science, Londres, [1983], pp. 251-317). Entre otros ejemplos de ensayos se incluyen, aunque sin carácter limitativo, el ensayo succinil-Ala-Ala-Pro-Phe-para-nitroanilida (suc-AAPF-pNA) y el ensayo de sal sódica de sulfonato de 2,4,6-trinitrobenceno (ensayo TNBS). Numerosas referencias adicionales conocidas para los expertos en la materia exponen métodos adecuados (véase, p. ej., Wells *et al.*, Nucleic Acids Res. 11:7911-

7925 [1983]; Christianson *et al.*, Anal. Biochem. 223:119 -129 [1994]; y Hsia *et al.*, Anal Biochem. 242:221-227 [1999]).

[0151] Se pueden utilizar varios métodos para determinar el nivel de producción de una proteasa madura (p. ej., variantes de proteasas maduras de la presente invención) en una célula hospedadora. Dichos métodos incluyen, a modo de ejemplo y sin carácter limitativo, métodos que utilizan anticuerpos policlonales o monoclonales específicos para la proteasa. Entre los ejemplos de métodos se incluyen, sin carácter limitativo, ensayos de inmunoabsorción ligados a enzimas (ELISA), radioinmunoensayos (RIA), inmunoensayos fluorescentes (FIA), y clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS). En la técnica se conocen estos y otros ensayos (véase, p. ej., Maddox *et al.*, J. Exp. Med. 158:1211 [1983]).

[0152] Se describen métodos para realizar o producir una variante de proteasa madura de la invención. Una variante de proteasa madura no incluye un péptido señal ni una secuencia propeptídica. Algunos métodos comprenden realizar o producir una variante de proteasa de la invención en una célula hospedadora bacteriana recombinante, tal como, por ejemplo, una célula de *Bacillus* sp. (p. ej., una célula de *B. subtilis*). En algunos aspectos, la descripción da a conocer un método de producción de una variante de proteasa de la invención, comprendiendo el método cultivar una célula hospedadora recombinante que comprende un vector de expresión recombinante que comprende un ácido nucleico que codifica una variante de proteasa de la invención en condiciones propicias para producir la variante de proteasa. Algunos de tales métodos comprenden además la recuperación de la variante de proteasa del cultivo.

[0153] En algunas formas de realización, la invención da a conocer métodos para producir una variante de proteasa de la invención, comprendiendo los métodos: (a) introducir un vector de expresión recombinante que comprende un ácido nucleico que codifica una variante de proteasa de la invención en una población de células (p. ej., células bacterianas, tales como células de *B. subtilis*); y (b) cultivar las células en un medio de cultivo en condiciones propicias para producir la variante de proteasa codificada por el vector de expresión. Algunos de tales métodos comprenden, además: (c) aislar la variante de proteasa de las células o del medio de cultivo.

Productos de limpieza del hogar y de tejidos

[0154] En algunos aspectos, las variantes de proteasa de la presente descripción se pueden utilizar en composiciones que comprenden un material adjunto y una variante de proteasa, donde la composición es un producto de limpieza del hogar y de tejidos.

[0155] En algunas formas de realización, las composiciones de producto de limpieza del hogar y de tejidos comprenden al menos una variante de proteasa definida en la reivindicación 1.

[0156] En algunos aspectos, las composiciones de producto de limpieza del hogar y de tejidos que comprenden al menos una variante de proteasa comprenden al menos un material adjunto seleccionado de entre un encapsulamiento que comprende un perfume, un agente colorante, tensioactivos, mejoradores, agentes quelantes, agentes inhibidores de transferencia de tintes, dispersantes, enzimas adicionales, estabilizadores de enzimas, materiales catalíticos, activadores de blanqueo, peróxido de hidrógeno, fuentes de peróxido de hidrógeno, perácidos preformados, agentes dispersantes poliméricos, agentes de antirredeposición/eliminación de barro, abrillantadores, supresores de espuma, tintes, perfumes, agentes elastizantes de estructuras, suavizantes para tejidos, portadores, hidrótopos, adyuvantes de procesamiento, disolventes, pigmentos y mezclas de los mismos.

[0157] En algunos aspectos, las composiciones de producto de limpieza del hogar y de tejidos comprenden al menos un material adjunto seleccionado de entre encapsulamientos de perfume, agentes colorantes para tejidos, abrillantadores solubles en agua fría, un catalizador de blanqueo que puede comprender un material seleccionado de entre cationes de iminio, poliones de iminio; zwitteriones de iminio; aminas modificadas; óxidos de amina modificados; N-sulfoniliminas; N-fosfoniliminas; N-aciliminas; dióxidos de tiadiazol; perfluoroiminas; cetonas de azúcar cíclicas y mezclas de las mismas; lipasas de primer lavado; celulasas de limpieza bacteriana; tensioactivos no iónicos de Guerbet; y mezclas de estos.

[0158] En algunos aspectos, las composiciones de producto de limpieza del hogar y de tejidos que comprenden al menos una variante de proteasa comprenden además al menos una proteasa adicional no inmunoequivalente seleccionada de entre subtilisinas (EC 3.4.21.62); proteasas de tipo tripsina o de tipo quimotripsina; metaloproteasas; y mezclas de las mismas.

[0159] En algunos aspectos, las composiciones de producto de limpieza del hogar y de tejidos que comprenden al menos una variante de proteasa comprenden además al menos una proteasa adicional no inmunoequivalente seleccionada de entre: subtilisinas (EC 3.4.21.62) derivadas de *B. subtilis, B. amyloliquefaciens, B. pumilus* y *B. gibsonii*; proteasas tripsina y/o proteasas quimotripsina derivadas de *Cellulomonas*; metaloproteasas derivadas de *Bacillus amyloliquefaciens*; y mezclas de las mismas.

[0160] En algunos aspectos, las composiciones de producto de limpieza del hogar y de tejidos que comprenden al menos una variante de proteasa comprenden además al menos una enzima adicional seleccionada de entre hemicelulasas, peroxidasas, proteasas, celulasas, celobiosa deshidrogenasas, xiloglucanasas, xilanasas,

lipasas, fosfolipasas, esterasas, cutinasas, pectinasas, mananasas, pectato liasas, queratinasas, reductasas, oxidasas, fenoloxidasas, lipoxigenasas, ligninasas, pululanasas, tanasas, pentosanasas, liquenasas glucanasas, arabinosidasas, hialuronidasas, condroitinasas, lacasas, amilasas, y mezclas de estas.

[0161] En algunos aspectos, las composiciones de producto de limpieza del hogar y de tejidos que comprenden al menos una variante de proteasa comprenden además al menos una enzima adicional seleccionada de entre lipasas de primer lavado; alfa-amilasas; celulasas bacterianas de limpieza; y mezclas de las mismas.

[0162] En algunos aspectos, las composiciones de producto de limpieza del hogar y de tejidos que comprenden al menos una variante de proteasa comprenden además al menos uno de los siguientes: un encapsulamiento que comprende un perfume comprende una microcápsula de perfume; un agente colorante que comprende un material seleccionado de entre tintes básicos, ácidos, hidrofóbicos, directos y poliméricos, y conjugados de tintes que presentan una longitud de onda del pico de absorción de 550 nm a 650 nm y mezclas de los mismos; un tensioactivo detersivo que comprende un material seleccionado de entre tensioactivos detersivos aniónicos, tensioactivos detersivos no iónicos, tensioactivos detersivos catiónicos, tensioactivos detersivos zwitteriónicos, y tensioactivos detersivos anfóteros y mezclas de los mismos; un mejorador que comprende un material seleccionado de entre zeolitas, fosfatos, y mezclas de los mismos; una sal de silicato que comprende un material seleccionado de entre silicato de sodio, silicato de potasio y mezclas de los mismos; un abrillantador que comprende un material seleccionado de entre abrillantadores solubles en agua fría y mezclas de los mismos; un polímero carboxilato que comprende un material seleccionado de entre copolímero aleatorio de maleato/acrilato u homopolímero de poliacrilato y mezclas de los mismos; un polímero de liberación de suciedad que comprende un material seleccionado de entre copolímeros de tereftalato y mezclas de los mismos; un polímero celulósico que comprende un material seleccionado de entre alquilcelulosa, alquil alcoxialquilcelulosa, carboxialquilcelulosa, alquil carboxialquilcelulosa y mezclas de las mismas; un catalizador de blanqueo que comprende un material seleccionado de entre cationes de iminio, poliones de iminio; zwitteriones de iminio; aminas modificadas; óxidos de amina modificados; N-sulfoniliminas; N-fosfoniliminas; N-aciliminas; dióxidos de tiadiazol; perfluoroiminas; cetonas de azúcar cíclicas y mezclas de las mismas; un activador de blanqueo que comprende un material seleccionado de entre dodecanoil oxibenceno sulfonato, decanoil oxibenceno sulfonato, ácido decanoil oxibenzoico o sales de los mismos, 3,5,5-trimetil hexanoiloxibenzeno sulfonato, tetraacetiletilendiamina (TAED), nonanoiloxibenceno sulfonato (NOBS) y mezclas de estos; una fuente de peróxido de hidrógeno que comprende un material seleccionado de entre sales inorgánicas de perhidrato, incluyendo sales de metal alcalino, tales como sales de sodio de perborato (normalmente monohidrato o tetrahidrato), de percarbonato, de persulfato, de perfosfato, sales de persilicato, y mezclas de las mismas; un quelante que comprende un material seleccionado de entre DTPA (ácido dietilentriaminopentaacético), HEDP (ácido hidroxietano difosfónico), DTPMP (dietilentriamina penta(ácido metilenfosfónico), ácido etilendiaminodisuccínico (EDDS), hidrato de sal disódica de ácido 1,2-dihidroxibenzeno-3,5-disulfónico, derivados de dichos quelantes; y mezclas de los mismos.

[0163] En algunos aspectos, las composiciones de producto de limpieza del hogar y de tejidos que comprenden al menos una variante de proteasa comprenden un agente colorante para tejidos seleccionado del grupo que consiste en tintes; conjugados de tinte-barro que comprenden al menos un tinte catiónico-básico y una arcilla esmectita; y mezclas de los mismos.

[0164] En algunos aspectos, las composiciones de producto de limpieza del hogar y de tejidos que comprenden al menos una variante de proteasa comprenden al menos un agente colorante para tejidos seleccionado de entre tintes con moléculas pequeñas; tintes poliméricos y mezclas de estos; conjugados de tinte-arcilla que comprenden al menos un tinte catiónico-básico y una arcilla esmectita; y mezclas de los mismos.

[0165] En algunos aspectos, las composiciones de producto de limpieza del hogar y de tejidos que comprenden al menos una variante de proteasa comprenden uno o más de los siguientes ingredientes (en función del peso total de la composición): desde aproximadamente un 0,0005 % en peso a aproximadamente un 0,1 % en peso, desde aproximadamente un 0,001 % en peso a aproximadamente un 0,05 % en peso, o incluso desde aproximadamente un 0,002 % en peso a aproximadamente un 0,03 % en peso de dicha variante de proteasa de agua fría; y uno o más de los siguientes: desde aproximadamente un 0,00003 % en peso a aproximadamente un 0,1 % en peso de agente colorante de tejidos; desde aproximadamente un 0,001 % en peso a aproximadamente un 5 % en peso de cápsulas de perfume; desde aproximadamente un 0,001 % en peso a aproximadamente un 1 % en peso de abrillantadores solubles en agua fría; desde aproximadamente un 0,00003 % en peso a aproximadamente un 0,1 % en peso de catalizadores de blanqueo; desde aproximadamente un 0,00003 % en peso a aproximadamente un 0,1 % en peso de lipasas de primer lavado; desde aproximadamente un 0,00003 % en peso a aproximadamente un 0,1 % en peso de celulasas bacterianas de limpieza; y/o desde aproximadamente un 0,05 % en peso a aproximadamente un 20 % en peso de tensioactivos no iónicos de Guerbet.

[0166] En algunos aspectos, la composición de producto de limpieza del hogar y de tejidos es un detergente para ropa granulado o en polvo que no comprende una proteasa de agua fría.

[0167] En algunos aspectos, la composición de producto de limpieza del hogar y de tejidos es un detergente líquido para ropa, un detergente para lavavajillas.

[0168] Se pretende que el producto de limpieza del hogar y de tejidos se proporcione en cualquier forma adecuada, incluyendo un fluido o sólido. El producto de limpieza del hogar y de tejidos puede estar en forma de una bolsita monodosis, especialmente cuando esté en forma líquida, y normalmente el producto de limpieza del hogar y de tejidos se encuentra contenido, al menos parcialmente, o incluso completamente, en una bolsita hidrosoluble. Además, en algunos aspectos de los productos de limpieza del hogar y de tejidos que comprenden al menos una variante de proteasa, el producto de limpieza del hogar y de tejidos puede presentar cualquier combinación de parámetros y/o características descrita anteriormente.

Composiciones de limpieza

[0169] A no ser que se indique otra cosa, todos los niveles de componentes o composiciones descritos en el presente documento se realizan en referencia al nivel activo de ese componente o composición, y no incluyen impurezas, por ejemplo, subproductos o disolventes residuales, que pueden estar presentes en fuentes comercializadas. Los pesos de los componentes enzimáticos se basan en la proteína activa total. Todos los porcentajes y proporciones se calculan por peso a no ser que se indique lo contrario. Todos los porcentajes y proporciones se calculan en función de la composición total a no ser que se indique lo contrario. En los ejemplos de composiciones detergentes, los niveles de enzimas se expresan por medio de las enzimas puras en peso de la composición total y, a no ser que se especifique otra cosa, los ingredientes del detergente se expresan en peso de las composiciones totales.

[0170] Según se indica en el presente documento, en algunas formas de realización, las composiciones de limpieza de la presente invención comprenden además materiales adjuntos entre los que se incluyen, aunque sin carácter limitativo, tensioactivos, mejoradores, blanqueadores, activadores de blanqueo, catalizadores de blanqueo, otras enzimas, sistemas de estabilización de enzimas, quelantes, abrillantadores ópticos, polímeros de liberación de suciedad, agentes de transferencia de tintes, dispersantes, supresores de espuma, tintes, perfumes, colorantes, sales de relleno, hidrótopos, fotoactivadores, agentes fluorescentes, acondicionadores para tejidos, tensioactivos hidrolizables, conservantes, antioxidantes, agentes antiencogimiento, agentes antiarrugas, germicidas, fungicidas, motas de color, limpiaplata, agentes antideslustre y/o agentes anticorrosión, fuentes de alcalinidad, agentes solubilizantes, portadores, adyuvantes de procesamiento, pigmentos, y agentes de control del pH (véanse, p. ej., las patentes estadounidenses n.ºs 6,610,642, 6,605,458, 5,705,464, 5,710,115, 5,698,504, 5,695,679, 5,686,014 y 5,646,101). Más adelante se ejemplifican con detalle formas de realización de materiales de composición de limpieza concretos. En las formas de realización en las cuales los materiales adjuntos de limpieza no sean compatibles con las variantes de proteasa de la presente invención en las composiciones de limpieza, se utilizan métodos adecuados para mantener separados los materiales adjuntos de limpieza y la(s) proteasa(s) (esto es, para que no estén en contacto entre sí) hasta que la combinación de los dos componentes sea apropiada. Entre tales métodos de separación se incluye cualquier método adecuado conocido en la técnica (p. ej., cápsulas de gel, encapsulamiento, pastillas, separación física, etc.).

[0171] Las composiciones de limpieza de la presente invención se emplean ventajosamente, por ejemplo, en aplicaciones de lavado de ropa, limpieza de superficies duras, aplicaciones de lavavajillas, así como en aplicaciones cosméticas, tales como dentaduras postizas, dientes, pelo y piel. Asimismo, debido a las ventajas únicas de efectividad aumentada en soluciones con temperatura más baja, las enzimas de la presente invención se adaptan de forma óptima para aplicaciones de lavado de ropa. Además, las enzimas de la presente invención se pueden utilizar en composiciones granuladas y líquidas.

[0172] Las presentes composiciones de limpieza y aditivos de limpieza precisan una cantidad efectiva de al menos una de las variantes de proteasa expuestas en el presente documento, solas o combinadas con otras proteasas y/o enzimas adicionales. El nivel requerido de enzima se logra mediante la adición de una o más variantes de proteasa de la presente invención. Normalmente, las presentes composiciones de limpieza comprenden al menos aproximadamente un 0,0001 de porcentaje en peso, desde aproximadamente un 0,0001 hasta aproximadamente un 10, desde aproximadamente un 0,001 hasta aproximadamente un 1, o incluso desde aproximadamente un 0,01 hasta aproximadamente un 0,1 de porcentaje en peso de al menos una de las variantes de proteasa de la presente invención.

[0173] Las composiciones de limpieza del presente documento están formuladas normalmente de tal forma que, durante su uso en operaciones de lavado acuoso, el agua de lavado presentará un pH de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 11,5, o incluso de aproximadamente 7,5 a aproximadamente 10,5. Las fórmulas de producto líquido se formulan normalmente para presentar un pH sin diluir de aproximadamente 3,0 a aproximadamente 9,0, o incluso de aproximadamente 3 a aproximadamente 5. Los productos de lavado de ropa granulados están formulados normalmente para presentar un pH de aproximadamente 9 a aproximadamente 11. Las técnicas para controlar el pH en niveles de uso recomendados incluyen el uso de tampones, bases, ácidos, etc., y resultan conocidas para los expertos en la materia.

[0174] Normalmente, las “composiciones de limpieza con pH bajo” adecuadas presentan un pH sin diluir de aproximadamente 3 a aproximadamente 5, y normalmente no presentan tensioactivos que se hidrolizan en dicho entorno de pH. Tales tensioactivos incluyen tensioactivos de alquilsulfato de sodio que comprenden al menos una fracción de óxido de etileno, o incluso de aproximadamente 1 a aproximadamente 16 moles de óxido de etileno. Tales composiciones de limpieza comprenden normalmente una cantidad suficiente de un modificador de

pH, tal como hidróxido de sodio, monoetanolamina o ácido clorhídrico, para proporcionar tal composición de limpieza con un pH sin diluir de aproximadamente 3 a aproximadamente 5. Dichas composiciones comprenden normalmente al menos una enzima estable en ácido. En algunas formas de realización, las composiciones son líquidas, mientras que, en otras formas de realización, son sólidas. El pH de tales composiciones líquidas se mide normalmente como un pH sin diluir. El pH de tales composiciones sólidas se mide como una solución con 10 % de sólidos de dicha composición, donde el disolvente es agua destilada. En estas formas de realización, todas las mediciones de pH se realizan a 20 ºC, a no ser que se indique otra cosa.

[0175] En algunas formas de realización, cuando la(s) variante(s) de proteasa se emplea(n) en una composición granulada o líquida, es deseable que la variante de proteasa se encuentre en forma de una partícula encapsulada para proteger la variante de proteasa frente a otros componentes de la composición granulada durante su almacenamiento. Además, el encapsulamiento supone también un medio para controlar la disponibilidad de la variante de proteasa durante el proceso de limpieza. En algunas formas de realización, el encapsulamiento potencia el rendimiento de la(s) variante(s) de proteasa y/o enzimas adicionales. A este respecto, las variantes de proteasa de la presente invención se encapsulan con cualquier material de encapsulamiento adecuado conocido en la técnica. En algunas formas de realización, el material de encapsulamiento encapsula normalmente al menos parte del catalizador para la(s) variante(s) de proteasa de la presente invención. Normalmente, el material de encapsulamiento es hidrosoluble y/o dispersable en agua. En algunas formas de realización, el material de encapsulamiento presenta una temperatura de transición vítrea (Tg) de 0 °C o superior. La temperatura de transición vítrea se describe más detalladamente en el documento WO 97/11151. El material de encapsulamiento se selecciona normalmente de entre compuestos de carbohidratos, gomas naturales o sintéticas, quitina, quitosano, celulosa y derivados celulósicos, silicatos, fosfatos, boratos, alcohol polivinílico, polietilenglicol, ceras de parafina, y combinaciones de los mismos. Cuando el material de encapsulamiento es un carbohidrato, este se selecciona normalmente de entre monosacáridos, oligosacáridos, polisacáridos, y combinaciones de los mismos. En algunas formas de realización habituales, el material de encapsulamiento es un almidón (véanse, p. ej., la patente europea EP 0 922 499; y las patentes estadounidenses US 4,977,252; US 5,354,559, y US 5,935,826). En algunas formas de realización, el material de encapsulamiento es una microesfera hecha de plástico, como termoplásticos, acrilonitrilo, metacrilonitrilo, poliacrilonitrilo, polimetacrilonitrilo y mezclas de los mismos; entre las microesferas comercializadas que se pueden utilizar se incluyen, sin carácter limitativo, las suministradas por EXPANCEL® (Stockviksverken, Suecia) y PM 6545, PM 6550, PM 7220, PM 7228, EXTENDOSPHERES®, LUXSIL®, Q-CEL®, y SPHERICEL® (PQ Corp., Valley Forge, Pensilvania).

[0176] Como se ha descrito en el presente documento, las variantes de proteasa de la presente invención se pueden utilizar especialmente en la industria de limpieza, incluyendo, sin carácter limitativo, detergentes para ropa y lavavajillas. Estas aplicaciones someten a las enzimas a diversos tipos de estrés ambiental. Las variantes de proteasa de la presente invención ofrecen ventajas con respecto a muchas enzimas utilizadas actualmente, debido a su estabilidad en diversas condiciones.

[0177] En efecto, existen varias condiciones de lavado, incluidas fórmulas de detergentes variables, volúmenes de agua de lavado, temperaturas de agua de lavado, y períodos de tiempo de lavado, a los que se exponen las proteasas implicadas en el lavado. Además, las fórmulas de detergentes utilizadas en distintas zonas geográficas presentan diferentes concentraciones de sus componentes relevantes presentes en el agua de lavado. Por ejemplo, los detergentes europeos normalmente presentan aproximadamente 4500-5000 ppm de componentes detergentes en el agua de lavado, mientras que los detergentes japoneses normalmente presentan aproximadamente 667 ppm de componentes detergentes en el agua de lavado. En Norteamérica, especialmente en Estados Unidos, los detergentes normalmente presentan aproximadamente 975 ppm de componentes detergentes en el agua de lavado.

[0178] Un sistema de baja concentración de detergente incluye detergentes donde menos de aproximadamente 800 ppm de los componentes detergentes están presentes en el agua de lavado. Los detergentes japoneses se consideran normalmente sistemas de baja concentración de detergente, debido a que presentan aproximadamente 667 ppm de componentes detergentes en el agua de lavado.

[0179] Una concentración media de detergente incluye detergentes en los que entre aproximadamente 800 ppm y aproximadamente 2000 ppm de los componentes detergentes están presentes en el agua de lavado. Los detergentes norteamericanos se consideran por lo general sistemas de concentración media de detergente, debido a que presentan aproximadamente 975 ppm de componentes detergentes en el agua de lavado. Brasil normalmente presenta aproximadamente 1500 ppm de componentes detergentes en el agua de lavado.

[0180] Un sistema de alta concentración de detergente incluye detergentes que presentan más de aproximadamente 2000 ppm de los componentes detergentes en el agua de lavado. Los detergentes europeos se consideran por lo general sistemas de alta concentración de detergente, debido a que presentan aproximadamente 4500-5000 ppm de componentes detergentes en el agua de lavado.

[0181] Los detergentes latinoamericanos son normalmente detergentes de alta espuma con mejorador de fosfato, y la gama de detergentes utilizados en América Latina puede encuadrarse tanto en las concentraciones de detergente medias como en las altas, puesto que oscilan entre 1500 ppm y 6000 ppm de componentes

detergentes en el agua de lavado. Como se ha mencionado anteriormente, Brasil normalmente presenta aproximadamente 1500 ppm de componentes detergentes en el agua de lavado. No obstante, en otras zonas geográficas de detergentes de alta espuma con mejorador de fosfato, que no se limitan a otros países latinoamericanos, se pueden encontrar sistemas de alta concentración de detergente de hasta aproximadamente 6000 ppm de componentes detergentes presentes en el agua de lavado.

[0182] A la vista de lo anterior, es obvio que las concentraciones de composiciones detergentes en soluciones de lavado convencionales en todo el mundo oscilan desde menos de aproximadamente 800 ppm de composición detergente ("zonas geográficas con baja concentración de detergente"), por ejemplo aproximadamente 667 ppm en Japón, hasta entre aproximadamente 800 ppm y aproximadamente 2000 ppm ("zonas geográficas de concentración media de detergente"), por ejemplo aproximadamente 975 ppm en EE. UU. y aproximadamente 1500 ppm en Brasil, y hasta más de aproximadamente 2000 ppm ("zonas geográficas de alta concentración de detergente"), por ejemplo entre aproximadamente 4500 ppm y aproximadamente 5000 ppm en Europa, y aproximadamente 6000 ppm en zonas geográficas de alta espuma con mejorador de fosfato.

[0183] Las concentraciones de las soluciones de lavado habituales se determinan empíricamente. Por ejemplo, en EE. UU., una lavadora convencional soporta un volumen de aproximadamente 64,4 l de solución de lavado. Por consiguiente, para obtener una concentración de aproximadamente 975 ppm de detergente en la solución de lavado, se deben añadir aproximadamente 62,79 g de composición detergente en los 64,4 l de solución de lavado. Esta cantidad es la cantidad normal medida en el agua de lavado por el usuario utilizando el vaso medidor proporcionado con el detergente.

[0184] A modo de ejemplo adicional, en distintas zonas geográficas se utilizan diferentes temperaturas de lavado. La temperatura del agua de lavado en Japón es normalmente inferior a la que se utiliza en Europa. Por ejemplo, la temperatura del agua de lavado en Norteamérica y en Japón oscila normalmente entre aproximadamente 10 y aproximadamente 30 °C (p. ej., aproximadamente 20 °C), mientras que la temperatura del agua de lavado en Europa se encuentra normalmente entre aproximadamente 30 y aproximadamente 60 °C (p. ej., aproximadamente 40 °C). Sin embargo, en aras de ahorrar energía, muchos usuarios están empezando a cambiar a lavados en agua fría. Asimismo, en algunas otras regiones, se utiliza normalmente agua fría para lavar ropa, así como en aplicaciones de lavavajillas. En algunas formas de realización, el "lavado en agua fría" de la presente invención utiliza "detergente para agua fría" adecuado para lavar a temperaturas de aproximadamente 10 °C a aproximadamente 40 °C, o de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 30 °C, o de aproximadamente 15 °C a aproximadamente 25 °C, así como todas las otras combinaciones situadas en el intervalo de aproximadamente 15 °C a aproximadamente 35 °C, y todos los intervalos situados entre 10 °C y 40 °C.

[0185] A modo de ejemplo adicional, en zonas geográficas diferentes se presentan distintas durezas del agua. La dureza del agua se describe habitualmente en función de la mezcla de Ca^{2+}/Mg^{2+} en granos por galón (o partes por millón). La dureza es una medida de la cantidad de calcio (Ca^{2+}) y magnesio (Mg^{2+}) en el agua. La mayor parte del agua en Estados Unidos es dura, aunque el grado de dureza varía. El agua moderadamente dura (60-120 ppm) a dura (121-181 ppm) presenta entre 60 y 181 partes por millón (para convertir las partes por millón a granos por galón estadounidense se divide el n.º de ppm entre 17,1 para dar como resultado los granos por galón) de minerales que endurecen el agua.

Agua	Granos por galón	Partes por millón
Blanda	menos de 1,0	menos de 17
Ligeramente dura	de 1,0 a 3,5	de 17 a 60
Moderadamente dura	de 3,5 a 7,0	de 60 a 120
Dura	de 7,0 a 10,5	de 120 a 180
Muy dura	más de 10,5	más de 180

[0186] La dureza del agua europea es normalmente mayor de aproximadamente 10,5 (por ejemplo, de aproximadamente 10,5 a aproximadamente 20,0) granos por galón de mezcla de Ca^{2+}/Mg^{2+} (mayor de aproximadamente 180 ppm; por ejemplo, de aproximadamente 180 ppm a aproximadamente 342 ppm) (p. ej., aproximadamente 15 granos por galón de mezcla de Ca^{2+}/Mg^{2+}; aproximadamente 256 ppm). La dureza del agua en Norteamérica es normalmente superior a la dureza del agua en Japón, pero inferior a la dureza del agua en Europa. Por ejemplo, la dureza del agua norteamericana puede oscilar entre aproximadamente 3 y aproximadamente 10 granos (entre aproximadamente 50 y aproximadamente 170 ppm), entre aproximadamente 3 y aproximadamente 8 granos (entre aproximadamente 50 y aproximadamente 136 ppm) o aproximadamente 6 granos (aproximadamente 102 ppm). La dureza del agua japonesa es normalmente inferior a la dureza del agua norteamericana, habitualmente menor de aproximadamente 4, por ejemplo, aproximadamente 3 granos por galón de mezcla de Ca^{2+}/Mg^{2+} (menos de aproximadamente 68,4, por ejemplo, aproximadamente 51,3 ppm de mezcla de Ca^{2+}/Mg^{2+}).

[0187] Por consiguiente, en algunas formas de realización, la presente invención da a conocer variantes de proteasa que muestran un sorprendente rendimiento de lavado en al menos un conjunto de condiciones de lavado (p. ej., temperatura del agua, dureza del agua, y/o concentración de detergente). En algunas formas de realización, las variantes de proteasa de la presente invención muestran un rendimiento de lavado potenciado en comparación con proteasas subtilisina comercializadas actualmente. Así, en algunas formas de realización de la presente invención, las variantes de proteasa expuestas en el presente documento muestran una estabilidad oxidativa mejorada, una estabilidad térmica mejorada, funciones de limpieza mejoradas en diversas condiciones, y/o una estabilidad quelante mejorada. Asimismo, las variantes de proteasa de la presente invención se pueden utilizar en composiciones de limpieza que no incluyen detergentes, de nuevo por sí solas o en combinación con mejoradores y estabilizadores.

[0188] En algunas formas de realización de la presente invención, las composiciones de limpieza comprenden al menos una variante de proteasa de la presente invención a un nivel comprendido entre aproximadamente un 0,00001 % y aproximadamente un 10 % en peso de la composición, y comprendiendo el resto (p. ej., de aproximadamente un 99,999 % a aproximadamente un 90,0 %) materiales adjuntos de limpieza en peso de la composición. En algunas otras formas de realización de la presente invención, las composiciones de limpieza de la presente invención comprenden al menos una variante de proteasa a un nivel de aproximadamente un 0,0001 % a aproximadamente un 10 %, de aproximadamente un 0,001 % a aproximadamente un 5 %, de aproximadamente un 0,001 % a aproximadamente un 2 %, de aproximadamente un 0,005 % a aproximadamente un 0,5 % en peso de la composición, y comprendiendo el resto de la composición de limpieza (p. ej., de aproximadamente un 99,9999 % a aproximadamente un 90,0 %, de aproximadamente un 99,999 % a aproximadamente un 98 %, de aproximadamente un 99,995 % a aproximadamente un 99,5 % en peso) materiales adjuntos de limpieza.

[0189] En algunas formas de realización, las composiciones de limpieza de la presente invención comprenden una o más enzimas detergentes adicionales, las cuales ofrecen ventajas de rendimiento de limpieza y/o de cuidado de tejidos y/o lavavajillas. Entre los ejemplos de enzimas adecuadas se incluyen, aunque sin carácter limitativo, hemicelulasas, celulasas, peroxidasas, proteasas, xilanasas, lipasas, fosfolipasas, esterasas, cutinasas, pectinasas, pectato liasas, mananasas, queratinasas, reductasas, oxidasas, fenoloxidasas, lipoxigenasas, ligninasas, pululanasas, tanasas, pentosanasas, malanasas, β-glucanasas, arabinosidasas, hialuronidasas, condroitinasas, lacasas y amilasas, o cualquier combinación o mezcla de las mismas. En algunas formas de realización, se utiliza una combinación de enzimas (esto es, un “cóctel”) que comprende enzimas aplicables convencionales, como proteasa, lipasa, cutinasa y/o celulasa junto con amilasa.

[0190] Además de las variantes de proteasa expuestas en el presente documento, se puede utilizar cualquier otra proteasa adecuada en las composiciones de la presente invención. Entre las proteasas adecuadas se incluyen aquellas de origen animal, vegetal o microbiano. En algunas formas de realización, se utilizan proteasas microbianas. En algunas formas de realización, se incluyen mutantes químicamente o genéticamente modificadas. En algunas formas de realización, la proteasa es una serina proteasa, preferiblemente una proteasa microbiana alcalina o una proteasa de tipo tripsina. Entre los ejemplos de proteasas alcalinas se incluyen subtilisinas, especialmente las derivadas de *Bacillus* (p. ej., subtilisina de *lentus,* subtilisina de *amyloliquefaciens,* subtilisina Carlsberg, subtilisina 309, subtilisina 147 y subtilisina 168). Entre los ejemplos adicionales se incluyen las proteasas mutantes descritas en las patentes estadounidenses n. os RE 34,606, 5,955,340, 5,700,676, 6,312,936, y 6,482,628. Otros ejemplos de proteasas incluyen, aunque sin carácter limitativo, tripsina (p. ej., de origen porcino o bovino), y la proteasa de *Fusarium* descrita en el documento WO 89/06270. En algunas formas de realización, las enzimas proteasas comercializadas que se pueden utilizar en la presente invención incluyen, aunque sin carácter limitativo, MAXATASE®, MAXACAL™, MAXAPEM™, OPTICLEAN®, OPTIMASE®, PROPERASE®, PURAFECT®, PURAEECT® OXP, PURAMAX™, EXCELLASE™, y PURAFAST™ (Genencor); ALCALASE®, SAVINASE®, PRIMASE®, DURAZYM™, POLARZYME®, OVOZYME®, KANNASE®, LIQUANASE®, NEUTRASE®, RELASE® y ESPERASE® (Novozymes); BLAP™ y variantes de BLAP™ (Henkel Kommanditgesellschaft auf Aktien, Düsseldorf, Alemania), y KAP (subtilisina de *B. alcalophilus*; Kao Corp., Tokio, Japón). Se describen diversas proteasas en los documentos WO95/23221, WO 92/21760, en la publicación de patente estadounidense n.º 2008/0090747, y en las patentes estadounidenses n.os 5,801,039, 5,340,735, 5,500,364, 5,855,625, US RE 34,606, 5,955,340, 5,700,676, 6,312,936, y 6,482,628, y varias patentes adicionales. En algunas otras formas de realización, se pueden utilizar metaloproteasas en la presente invención, incluida, aunque sin carácter limitativo, la metaloproteasa neutra descrita en el documento WO 07/044993.

[0191] Asimismo, se puede utilizar cualquier lipasa adecuada en la presente invención. Entre las lipasas adecuadas se incluyen, sin carácter limitativo, las de origen bacteriano o fúngico. La presente invención abarca mutantes modificadas químicamente o genéticamente. Entre los ejemplos de lipasas útiles se incluye la lipasa de *Humicola lanuginosa* (véanse, p. ej., las patentes europeas EP 258 068 y EP 305 216), la lipasa de *Rhizomucor miehei* (véase, por ejemplo, EP 238 023), lipasa de *Candida*, tal como la lipasa de *C. antarctica* (p. ej., la lipasa A o B de *C. antarctica*; véase, p. ej., EP 214 761), lipasas de *Pseudomonas*, tales como lipasa de *P. alcaligenes* y lipasa de *P. pseudoalcaligenes* (véase, por ejemplo, EP 218 272), lipasa de *P. cepacia* (véase, p. ej., EP 331 376), lipasa de *P. stutzeri* (véase, p. ej., GB 1,372,034), lipasa de *P. fluorescens*, lipasa de *Bacillus* (p. ej., lipasa

de *B. subtilis* [Dartois *et al.*, Biochem. Biophys. Acta 1131:253-260 [1993]); lipasa de *B. stearothermophilus* [véase, p. ej., JP 64/744992]; y lipasa de *B. pumilus* [véase, p. ej., WO 91/16422]).

[0192] Asimismo, se puede utilizar una serie de lipasas clonadas en algunas formas de realización de la presente invención, incluyendo, aunque sin carácter limitativo, lipasa de *Penicillium camembertii* (véase, Yamaguchi *et al.*, Gene 103:61-67 [1991]), lipasa de *Geotricum candidum* (véase, Schimada *et al.*, J. Biochem., 106:383-388 [1989]), y diversas lipasas de *Rhizopus*, tales como lipasa de *R. delemar* (véase, Hass *et al.*, Gene 109:117-113 [1991]), una lipasa de *R. niveus* (Kugimiya *et al.*, Biosci. Biotech. Biochem. 56:716-719 [1992]) y lipasa de *R. oryzae.*

[0193] Otros tipos de enzimas lipolíticas, tales como cutinasas, se pueden utilizar también en algunas formas de realización de la presente invención, incluida, aunque sin carácter limitativo, la cutinasa derivada de *Pseudomonas mendocina* (véase, el documento WO 88/09367), y la cutinasa derivada de *Fusarium solani pisi* (véase, WO 90/09446).

[0194] Entre las lipasas adicionales adecuadas se incluyen lipasas comercialmente disponibles, tales como M1 LIPASE™, LUMA FAST™ y LIPOMAX™ (Genencor); LIPEX®, LIPOLASE® y LIPOLASE® ULTRA (Novozymes); y LIPASE P™ “Amano” (Amano Pharmaceutical Co. Ltd., Japón).

[0195] En algunas formas de realización de la presente invención, las composiciones de limpieza de la presente invención comprenden además lipasas a un nivel comprendido entre aproximadamente un 0,00001 % y aproximadamente un 10 % de lipasa adicional en peso de la composición y el resto de materiales adjuntos de limpieza en peso de la composición. En algunas otras formas de realización de la presente invención, las composiciones de limpieza de la presente invención comprenden también lipasas a un nivel comprendido entre aproximadamente un 0,0001 % y aproximadamente un 10 %, aproximadamente entre un 0,001 % y aproximadamente un 5 %, entre aproximadamente un 0,001 % y aproximadamente un 2 %, y aproximadamente entre un 0,005 % y aproximadamente un 0,5 % de lipasa en peso de la composición.

[0196] En algunas formas de realización de la presente invención, cualquier amilasa adecuada se puede utilizar en la presente invención. En algunas formas de realización, también se puede utilizar cualquier amilasa (p. ej., alfa y/o beta) adecuada para su uso en soluciones alcalinas. Entre las amilasas adecuadas se incluyen, aunque sin carácter limitativo, las de origen bacteriano o fúngico. En algunas formas de realización, se incluyen mutantes modificadas químicamente o genéticamente. Entre las amilasas que se pueden utilizar en la presente invención se incluyen, aunque sin carácter limitativo, α-amilasas obtenidas a partir de *B. licheniformis* (véase, p. ej., GB 1,296,839). Entre las amilasas comercializadas que se pueden utilizar en la presente invención se incluyen, aunque sin carácter limitativo, DURAMYL®, TERMAMYL®, FUNGAMYL®, STAINZYME®, STAINZYME PLUS®, STAINZYME ULTRA®, y BAN™ (Novozymes), así como POWERASE™, RAPIDASE® y MAXAMYL® P (Genencor).

[0197] En algunas formas de realización de la presente invención, las composiciones de limpieza de la presente invención comprenden además amilasas a un nivel comprendido entre aproximadamente un 0,00001 % y aproximadamente un 10 % de amilasa adicional en peso de la composición, y el resto de materiales adjuntos de limpieza en peso de la composición. En algunas otras formas de realización de la presente invención, las composiciones de limpieza de la presente invención comprenden también amilasas a un nivel comprendido entre aproximadamente un 0,0001 % y aproximadamente un 10 %, aproximadamente entre un 0,001 % y aproximadamente un 5 %, entre aproximadamente un 0,001 % y aproximadamente un 2 %, y aproximadamente entre un 0,005 % y aproximadamente un 0,5 % de amilasa en peso de la composición.

[0198] En algunas otras formas de realización, se puede utilizar cualquier celulasa adecuada en las composiciones de limpieza de la presente invención. Entre las celulasas adecuadas se incluyen, aunque sin carácter limitativo, las de origen bacteriano o fúngico. En algunas formas de realización, se incluyen mutantes modificadas químicamente o genéticamente. Entre las celulasas adecuadas se incluyen, aunque sin carácter limitativo, celulasas de *Humicola insolens* (véase, p. ej., la patente estadounidense n.º 4,435,307). Las celulasas especialmente adecuadas son las celulasas que presentan ventajas de cuidado del color (véase, p. ej., EP 0 495 257). Entre las celulasas comercializadas que se pueden utilizar en la presente se incluyen, aunque sin carácter limitativo, CELLUZYME®, CAREZYME® (Novozymes), y KAC-500(B)™ (Kao Corporation). En algunas formas de realización, las celulasas se incorporan como porciones o fragmentos de celulasas maduras de tipo natural o variantes, donde se elimina una porción del N-terminal (véase, p. ej., la patente estadounidense n.º 5,874,276). En algunas formas de realización, las composiciones de limpieza de la presente invención comprenden además celulasas a un nivel comprendido entre aproximadamente un 0,00001 % y aproximadamente un 10 % de celulasa adicional en peso de la composición y el resto de materiales adjuntos de limpieza en peso de la composición. En algunas otras formas de realización de la presente invención, las composiciones de limpieza de la presente invención comprenden también celulasas a un nivel comprendido entre aproximadamente un 0,0001 % y aproximadamente un 10 %, aproximadamente entre un 0,001 % y aproximadamente un 5 %, entre aproximadamente un 0,001 % y aproximadamente un 2 %, y aproximadamente entre un 0,005 % y aproximadamente un 0,5 % de celulasa en peso de la composición.

[0199] También se puede utilizar cualquier mananasa adecuada para su uso en composiciones detergentes en la presente invención. Entre las mananasas adecuadas se incluyen, aunque sin carácter limitativo, las de origen bacteriano o fúngico. En algunas formas de realización, se incluyen mutantes modificadas químicamente o genéticamente. Se conocen diversas mananasas que se pueden utilizar en la presente invención (véase, p. ej., la patente estadounidense n.º 6,566,114, la patente estadounidense n.º 6,602,842, y la patente estadounidense n.º 6,440,991). En algunas formas de realización, las composiciones de limpieza de la presente invención comprenden además mananasas a un nivel comprendido entre aproximadamente un 0,00001 % y aproximadamente un 10 % de mananasa adicional en peso de la composición y el resto de materiales adjuntos de limpieza en peso de la composición. En algunas formas de realización de la presente invención, las composiciones de limpieza de la presente invención comprenden también mananasas a un nivel comprendido entre aproximadamente un 0,0001 % y aproximadamente un 10 %, aproximadamente entre un 0,001 % y aproximadamente un 5 %, entre aproximadamente un 0,001 % y aproximadamente un 2 %, y aproximadamente entre un 0,005 % y aproximadamente un 0,5 % de mananasa en peso de la composición.

[0200] En algunas formas de realización, se utilizan peroxidasas en combinación con peróxido de hidrógeno o una fuente del mismo (p. ej., un percarbonato, perborato o persulfato) en las composiciones de la presente invención. En algunas formas de realización alternativas, se utilizan oxidasas en combinación con oxígeno. Ambos tipos de enzimas se utilizan para “blanquear la solución” (esto es, para evitar la transferencia de un tinte textil de un tejido tintado a otro tejido cuando los tejidos se laven juntos en un líquido de lavado), preferiblemente junto con un agente potenciador (véase, p. ej., WO 94/12621 y WO 95/01426). Entre las peroxidasas/oxidasas adecuadas se incluyen, aunque sin carácter limitativo, las de origen vegetal, bacteriano o fúngico. En algunas formas de realización, se incluyen mutantes modificadas químicamente o genéticamente. En algunas formas de realización, las composiciones de limpieza de la presente invención comprenden además enzimas peroxidasa y/u oxidasa a un nivel comprendido entre aproximadamente un 0,00001 % y aproximadamente un 10 % de peroxidasa y/u oxidasa adicional en peso de la composición y el resto de materiales adjuntos de limpieza en peso de composición. En algunas otras formas de realización de la presente invención, las composiciones de limpieza de la presente invención comprenden también enzimas peroxidasa y/u oxidasa a un nivel comprendido entre aproximadamente un 0,0001 % y aproximadamente un 10 %, aproximadamente entre un 0,001 % y aproximadamente un 5 %, entre aproximadamente un 0,001 % y aproximadamente un 2 %, y aproximadamente entre un 0,005 % y aproximadamente un 0,5 % de enzimas peroxidasa y/u oxidasa en peso de la composición.

[0201] En algunas formas de realización, se pueden utilizar enzimas adicionales, incluidas, sin carácter limitativo, perhidrolasas (véase, p. ej., el documento WO 05/056782). Además, en algunas formas de realización, se abarcan mezclas de las enzimas anteriormente mencionadas en el presente documento, en concreto una o más proteasas, amilasas, lipasas, mananasas adicionales, y/o al menos una celulasa. En efecto, se contempla que se podrán utilizar diversas mezclas de estas enzimas en la presente invención. Asimismo, se contempla que los distintos niveles de la(s) variante(s) de proteasa y una o más enzimas adicionales podrían oscilar ambos de forma independiente hasta aproximadamente un 10 %, siendo el resto de la composición de limpieza materiales adjuntos de limpieza. La selección concreta de materiales adjuntos de limpieza se realiza fácilmente teniendo en cuenta la superficie, el artículo, o el tejido que se pretende limpiar, y la forma deseada de la composición para las condiciones de limpieza durante el uso (por ejemplo, mediante el uso del detergente de lavado).

[0202] Entre los ejemplos de materiales adjuntos de limpieza adecuados se incluyen, aunque sin carácter limitativo, tensioactivos, mejoradores, blanqueadores, activadores del blanqueo, catalizadores de blanqueo, otras enzimas, sistemas de estabilización de enzimas, quelantes, abrillantadores ópticos, polímeros de liberación de suciedad, agentes de transferencia de tintes, agentes inhibidores de transferencia de tintes, materiales catalíticos, peróxido de hidrógeno, fuentes de peróxido de hidrógeno, perácidos preformados, agentes dispersantes poliméricos, agentes de eliminación de barro, agentes elastizantes de estructuras, dispersantes, supresores de espuma, tintes, perfumes, colorantes, sales de relleno, hidrótopos, fotoactivadores, agentes fluorescentes, acondicionadores para tejidos, suavizantes para tejidos, portadores, hidrótopos, adyuvantes de procesamiento, disolventes, pigmentos, tensioactivos hidrolizables, conservantes, antioxidantes, agentes antiencogimiento, agentes antiarrugas, germicidas, fungicidas, motas de color, limpiaplata, agentes antideslustre y/o agentes anticorrosión, fuentes de alcalinidad, agentes solubilizantes, portadores, adyuvantes de procesamiento, pigmentos, y agentes de control del pH (véanse, p. ej., las patentes estadounidenses n.os 6,610,642, 6,605,458, 5,705,464, 5,710,115, 5,698,504, 5,695,679, 5,686,014 y 5,646,101). Más adelante, se describen detalladamente ejemplos de formas de realización de materiales concretos para composición de limpieza. En las formas de realización en las cuales los materiales adjuntos de limpieza no sean compatibles con las variantes de proteasa de la presente invención en las composiciones de limpieza, se utilizan métodos adecuados para mantener separados los materiales adjuntos de limpieza y la(s) proteasa(s) (es decir, para que no estén en contacto entre sí) hasta que la combinación de los dos componentes sea apropiada. Tales métodos de separación incluyen cualquier método adecuado conocido en la técnica (p. ej., cápsulas de gel, encapsulamientos, pastillas, separación física, etc.).

[0203] En algunas formas de realización, se incluye una cantidad efectiva de una o más variante(s) de proteasa expuesta(s) en el presente documento en composiciones que resultan útiles para limpiar diversas superficies que precisan la eliminación de manchas proteicas. Dichas composiciones de limpieza incluyen composiciones de

limpieza para aplicaciones tales como en superficies duras, tejidos, y platos. De hecho, en algunas formas de realización, la presente invención da a conocer composiciones de limpieza para tejidos, mientras que, en otras formas de realización, la presente invención da a conocer composiciones de limpieza no destinadas a tejidos. Cabe destacar que la presente invención da a conocer además composiciones de limpieza adecuadas para la higiene personal, incluidas composiciones para el cuidado bucal (entre otros, dentífricos, pastas de dientes, enjuagues bucales, etc., así como composiciones de limpieza para dentaduras postizas), para el cuidado de la piel y para el cabello. Se pretende que la presente invención abarque composiciones detergentes en cualquier formato (esto es, líquido, granulado, en barra, semisólido, en geles, en emulsiones, en pastillas, en cápsulas, etc.).

[0204] A título de ejemplo, varias composiciones de limpieza en las que se pueden utilizar las variantes de proteasa de la presente invención se describen con más detalle más adelante. En algunas formas de realización en las que se formulan las composiciones de limpieza de la presente invención como composiciones adecuadas para su uso en método(s) de lavado de ropa a máquina, las composiciones de la presente invención contienen preferiblemente al menos un tensioactivo y al menos un compuesto mejorador, así como uno o más materiales adjuntos de limpieza seleccionados preferiblemente de entre compuestos orgánicos poliméricos, agentes de blanqueo, enzimas adicionales, supresores de espuma, dispersantes, dispersantes de jabón de cal, agentes de suspensión y antirredeposición de suciedad e inhibidores de la corrosión. En algunas formas de realización, las composiciones para ropa contienen además agentes suavizantes (esto es, materiales adjuntos de limpieza adicionales). En las composiciones de la presente invención se pueden utilizar también productos aditivos para detergentes en forma sólida o líquida. Se pretende que dichos productos aditivos complementen y/o incrementen el rendimiento de composiciones detergentes convencionales, y se pueden añadir en cualquier etapa del proceso de limpieza. En algunas formas de realización, la densidad de las composiciones detergentes para ropa expuestas en el presente documento oscila entre aproximadamente 400 y aproximadamente 1200 g/litro, mientras que, en otras formas de realización, esta oscila entre aproximadamente 500 y aproximadamente 950 g/litro de composición medida a 20 °C.

[0205] En formas de realización formuladas como composiciones para su uso en métodos para lavavajillas manual, las composiciones de la invención contienen preferiblemente al menos un tensioactivo y preferiblemente al menos un material adjunto de limpieza adicional seleccionado de entre compuestos orgánicos poliméricos, agentes potenciadores de espuma, iones metálicos del grupo II, disolventes, hidrótopos y enzimas adicionales.

[0206] En algunas formas de realización, se pueden utilizar diversas composiciones de limpieza, como las dadas a conocer en la patente estadounidense n.º 6,605,458, con las variantes de proteasa de la presente invención. Así, en algunas formas de realización, las composiciones que comprenden al menos una variante de proteasa de la presente invención es una composición de limpieza para tejidos granulada y compacta, mientras que, en otras formas de realización, la composición es una composición de limpieza para tejidos granulada que resulta útil para el lavado de tejidos de colores, y en otras formas de realización, la composición es una composición de limpieza para tejidos granulada que proporciona suavidad mediante su capacidad de lavado, y en formas de realización adicionales, la composición es una composición de limpieza para tejidos líquida de alto rendimiento. En algunas formas de realización, las composiciones que comprenden al menos una variante de proteasa de la presente invención son composiciones de limpieza para tejidos tales como las descritas en las patentes estadounidenses n.ºs 6,610,642 y 6,376,450. Asimismo, las variantes de proteasa de la presente invención se pueden utilizar en composiciones detergentes para ropa granuladas que resultan especialmente útiles en las condiciones de lavado europeas o japonesas (véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 6,610,642).

[0207] En algunas formas de realización alternativas, la presente invención ofrece composiciones de limpieza para superficies duras que comprenden al menos una variante de proteasa expuesta en el presente documento. Así, en algunas formas de realización, las composiciones que comprenden al menos una variante de proteasa de la presente invención son una composición de limpieza para superficies duras como las que se describen en las patentes estadounidenses n.ºs 6,610,642, 6,376,450, y 6,376,450.

[0208] En todavía otras formas de realización, la presente invención da a conocer composiciones lavavajillas que comprenden al menos una variante de proteasa expuesta en el presente documento. Por tanto, en algunas formas de realización, las composiciones que comprenden al menos una variante de proteasa de la presente invención son una composición de limpieza para superficies duras como las que se describen en las patentes estadounidenses n.ºs 6,610,642 y 6,376,450. En todavía algunas otras formas de realización, la presente invención proporciona composiciones lavavajillas que comprenden al menos una variante de proteasa expuesta en el presente documento. En algunas otras formas de realización, las composiciones que comprenden al menos una variante de proteasa de la presente invención comprenden composiciones para el cuidado bucal como las que se describen en las patentes estadounidenses n.ºs 6,376,450 y 6,376,450. Las fórmulas y descripciones de los compuestos y materiales adjuntos de limpieza contenidos en las patentes estadounidenses mencionadas anteriormente n.ºs 6,376,450, 6,605,458, 6,605,458y 6,610,642, se pueden emplear con las variantes de proteasa expuestas en el presente documento.

[0209] Las composiciones de limpieza de la presente invención se formulan en cualquier formato adecuado y se preparan mediante cualquier proceso escogido por el formulador, y se describen algunos ejemplos no limitativos

de estas en las patentes estadounidenses n.os 5,879,584, 5,691,297, 5,574,005, 5,569,645, 5,565,422, 5,516,448, 5,489,392, y 5,486,303. Cuando se desea una composición de limpieza con pH bajo, se ajusta el pH de dicha composición mediante la adición de un material tal como una monoetanolamina o un material ácido, como HCl.

[0210] A pesar de que no resultan fundamentales para los propósitos de la presente invención, la lista no limitativa de adjuntos que se muestra a continuación incluye adjuntos adecuados para su uso en las presentes composiciones de limpieza. En algunas formas de realización, estos adjuntos se incorporan, por ejemplo, para facilitar o potenciar el rendimiento de limpieza, para tratar el sustrato que se pretende limpiar, o para modificar la estética de la composición de limpieza, como en el caso de perfumes, colorantes, tintes o similares. Se comprenderá que dichos adjuntos se incorporan además de las variantes de proteasa de la presente invención. La naturaleza exacta de estos componentes adicionales, así como los niveles de incorporación de los mismos, dependerá de la forma física de la composición y del tipo de operación de limpieza para la cual se vaya a utilizar. Entre los materiales adjuntos adecuados se incluyen, aunque sin carácter limitativo, tensioactivos, mejoradores, agentes quelantes, agentes inhibidores de transferencia de tintes, adyuvantes de deposición, dispersantes, enzimas adicionales y estabilizadores enzimáticos, materiales catalíticos, activadores de blanqueo, potenciadores de blanqueo, peróxido de hidrógeno, fuentes de peróxido de hidrógeno, perácidos preformados, agentes dispersantes poliméricos, agentes de eliminación/antirredeposición de barro, abrillantadores, supresores de espuma, tintes, perfumes, agentes elastizantes de estructuras, suavizantes de tejidos, portadores, hidrótopos, adyuvantes de procesamiento y/o pigmentos. Más allá de la descripción proporcionada a continuación, se encuentran ejemplos adecuados de dichos otros adjuntos y niveles de uso en las patentes estadounidenses n.os 5,576,282, 6,306,812, y 6,326,348. Los ingredientes adjuntos mencionados anteriormente pueden constituir el resto de las composiciones de limpieza de la presente invención.

[0211] En algunas formas de realización, las composiciones de limpieza conforme a la presente invención comprenden al menos un tensioactivo y/o un sistema tensioactivo donde el tensioactivo se selecciona de entre tensioactivos no iónicos, tensioactivos aniónicos, tensioactivos catiónicos, tensioactivos anfolitos, tensioactivos zwitteriónicos, tensioactivos no iónicos semipolares, y mezclas de los mismos. En algunas formas de realización de composición de limpieza con pH bajo (por ejemplo, composiciones que presenten un pH sin diluir de aproximadamente 3 a aproximadamente 5), la composición normalmente no contiene sulfato de alquilo etoxilado, puesto que se cree que dicho tensioactivo puede ser hidrolizado por los contenidos ácidos de tales composiciones. En algunas formas de realización, el tensioactivo está presente a un nivel comprendido entre aproximadamente un 0,1 % y aproximadamente un 60 %, mientras que, en formas de realización alternativas, el nivel oscila entre aproximadamente un 1 % y aproximadamente un 50 %, mientras que, en todavía otras formas de realización, el nivel oscila entre aproximadamente un 5 % y aproximadamente un 40 % en peso de la composición de limpieza.

[0212] En algunas formas de realización, las composiciones de limpieza de la presente invención comprenden uno o más mejoradores o sistemas mejoradores de detergente. En algunas formas de realización que incorporan al menos un mejorador, las composiciones de limpieza comprenden al menos aproximadamente un 1 %, de aproximadamente un 3 % a aproximadamente un 60 %, o incluso de aproximadamente un 5 % a aproximadamente un 40 % de mejorador en peso de la composición de limpieza. Entre los mejoradores se incluyen, aunque sin carácter limitativo, el metal alcalino, sales de polifosfatos de amonio y alcanolamonio, silicatos de metales alcalinos, carbonatos de metales alcalinos y alcalinotérreos, aluminosilicatos, compuestos de policarboxilato, hidroxipolicarboxilatos de éter, copolímeros de anhídrido maleico con etileno o vinilmetiléter, ácido 1, 3, 5-trihidroxibenceno-2, 4, 6-trisulfónico, y ácido carboximetiloxisuccínico, las diversas sales de metales alcalinos, amonio y amonio sustituido de ácidos poliacéticos tales como el ácido etilendiaminotetraacético y el ácido nitrilotriacético, así como policarboxilatos tales como ácido melítico, ácido succínico, ácido cítrico, ácido oxidisuccínico, ácido polimaleico, ácido benceno-1,3,5-tricarboxílico, ácido carboximetiloxisuccínico, y las sales solubles de los mismos. De hecho, se contempla que se podrá utilizar cualquier mejorador adecuado en diversas formas de realización de la invención.

[0213] En algunas formas de realización, los mejoradores forman complejos iónicos de dureza solubles en agua (p. ej., mejoradores secuestrantes), tales como citratos y polifosfatos (p. ej., tripolifosfato de sodio y hexahidrato de tripolifosfato de sodio, tripolifosfato de potasio, y mezcla de tripolifosfato de sodio y de potasio, etc.). Se contempla que se podrá utilizar cualquier mejorador adecuado en la presente invención, incluidos los que se conocen en la técnica (véase, p. ej., la patente europea EP 2 100 949).

[0214] En algunas formas de realización, las composiciones de limpieza de la presente invención contienen al menos un agente quelante. Entre los agentes quelantes adecuados se incluyen, aunque sin carácter limitativo, agentes quelantes de cobre, hierro y/o manganeso y mezclas de los mismos. En formas de realización en las que se utilice al menos un agente quelante, las composiciones de limpieza de la presente invención comprenden de aproximadamente un 0,1 % a aproximadamente un 15 %, o incluso de aproximadamente un 3,0 % a aproximadamente un 10 % de agente quelante en peso de la composición de limpieza objeto.

[0215] En todavía algunas otras formas de realización, las composiciones de limpieza que se dan a conocer en el presente documento contienen al menos un adyuvante de deposición. Entre los adyuvantes de deposición

adecuados se incluyen, aunque sin carácter limitativo, polietilenglicol, polipropilenglicol, policarboxilato, polímeros de liberación de suciedad tales como ácido politeleftálico, arcillas como la caolinita, montmorillonita, atapulgita, ilita, bentonita, halloysita, y mezclas de las mismas.

[0216] Como se ha indicado en el presente documento, en algunas formas de realización, se pueden utilizar agentes antirredeposición en algunas formas de realización de la presente invención. En algunas formas de realización, se pueden utilizar tensioactivos no iónicos. Por ejemplo, en formas de realización de lavavajillas automático, se pueden utilizar tensioactivos no iónicos para fines de modificación de la superficie, especialmente para el laminado, para evitar la formación de películas y manchas, y para aumentar el brillo. Estos tensioactivos no iónicos se pueden utilizar también para prevenir la redeposición de manchas. En algunas formas de realización, el agente antirredeposición es un tensioactivo no iónico como se conoce en la técnica (véase, p. ej., la patente europea EP 2 100 949).

[0217] En algunas formas de realización, las composiciones de limpieza de la presente invención incluyen uno o más agentes inhibidores de transferencia de tintes. Entre los agentes inhibidores de transferencia de tintes poliméricos adecuados se incluyen, aunque sin carácter limitativo, polímeros de polivinilpirrolidona, polímeros de poliamina N-óxido, copolímeros de N-vinilpirrolidona y N-vinilimidazol, poliviniloxazolidonas y polivinilimidazoles o mezclas de los mismos. En formas de realización en las que se utiliza al menos un agente inhibidor de transferencia de tintes, las composiciones de limpieza de la presente invención comprenden de aproximadamente un 0,0001 % a aproximadamente un 10 %, de aproximadamente un 0,01 % a aproximadamente un 5 %, o incluso de aproximadamente un 0,1 % a aproximadamente un 3 % en peso de la composición de limpieza.

[0218] En algunas formas de realización, se incluyen silicatos en las composiciones de la presente invención. En algunas de dichas formas de realización, se pueden utilizar silicatos de sodio (p. ej., disilicato de sodio, metasilicato de sodio, y filosilicatos cristalinos). En algunas formas de realización, los silicatos están presentes a un nivel que oscila entre aproximadamente un 1 % y aproximadamente un 20 %. En algunas formas de realización, los silicatos están presentes a un nivel que oscila entre aproximadamente un 5 % y aproximadamente un 15 % en peso de la composición.

[0219] En todavía algunas formas de realización adicionales, las composiciones de limpieza de la presente invención contienen también dispersantes. Entre los materiales orgánicos y solubles en agua adecuados se incluyen, aunque sin carácter limitativo, los ácidos homopoliméricos o copoliméricos o sus sales, en los cuales el ácido policarboxílico comprende al menos dos radicales carboxilo separados entre sí por no más de dos átomos de carbono.

[0220] En algunas otras formas de realización, las enzimas utilizadas en las composiciones de limpieza se estabilizan por medio de cualquier técnica adecuada. En algunas formas de realización, las enzimas empleadas en el presente documento se estabilizan por la presencia de fuentes de iones de calcio y/o de magnesio solubles en agua en las composiciones finales que proporcionan dichos iones a las enzimas. En algunas formas de realización, los estabilizadores enzimáticos incluyen oligosacáridos, polisacáridos y sales metálicas divalentes inorgánicas, incluidas las de metales alcalinotérreos, como sales de calcio. Se contempla que se pueden utilizar diversas técnicas para la estabilización enzimática en la presente invención. Por ejemplo, en algunas formas de realización, se estabilizan las enzimas empleadas en el presente documento mediante la presencia de fuentes de iones de zinc (II), calcio (II) y/o magnesio (II) solubles en agua en las composiciones finales que proporcionan dichos iones a las enzimas, así como otros iones metálicos (p. ej., bario (II), escandio (II), hierro (II), manganeso (II), aluminio (III), estaño (II), cobalto (II), cobre (II), níquel (II), y oxovanadio (IV). También se pueden utilizar cloruros y sulfatos en algunas formas de realización de la presente invención. En la técnica se conocen ejemplos de oligosacáridos y polisacáridos adecuados (p. ej., dextrinas) (véase, p. ej., el documento WO 07/145964). En algunas formas de realización, también se pueden utilizar inhibidores reversibles de proteasa, tales como compuestos que contienen boro (p. ej., borato, ácido 4-formil-fenil-borónico) y/o se puede utilizar un aldehído tripéptido para mejorar más la estabilidad, según se desee.

[0221] En algunas formas de realización, las composiciones de la presente invención presentan blanqueadores, activadores del blanqueo y/o catalizadores de blanqueo. En algunas formas de realización, las composiciones de limpieza de la presente invención comprenden compuesto(s) blanqueador(es) inorgánico(s) y/u orgánico(s). Entre los blanqueadores inorgánicos se incluyen, aunque sin carácter limitativo, sales de perhidrato (p. ej., sales de perborato, percarbonato, perfosfato, persulfato y persilicato). En algunas formas de realización, las sales de perhidrato inorgánicas son sales de metal alcalino. En algunas formas de realización, se incluyen sales de perhidrato inorgánicas como sólido cristalino, sin protección adicional, aunque, en algunas formas de realización, la sal se encuentra recubierta. En la presente invención, se puede utilizar cualquier sal adecuada que se conozca en la técnica (véase, p. ej., EP 2 100 949).

[0222] En algunas formas de realización, se utilizan activadores de blanqueo en las composiciones de la presente invención. Los activadores de blanqueo son normalmente precursores orgánicos de perácido que potencian la acción blanqueadora durante el transcurso del proceso de limpieza a temperaturas de 60 °C e inferiores. Entre los activadores de blanqueo adecuados para su uso en el presente documento se incluyen compuestos que, en condiciones de perhidrólisis, dan lugar a ácidos peroxicarboxílicos alifáticos que presentan

preferiblemente de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 átomos de carbono, especialmente de aproximadamente 2 a aproximadamente 4 átomos de carbono, y/o de manera opcional ácido perbenzoico sustituido. En la técnica se conocen activadores de blanqueo adicionales y se pueden utilizar en la presente invención (véase, p. ej., el documento EP 2 100 949).

[0223] Asimismo, en algunas formas de realización, y como se describe con más detalle en el presente documento, las composiciones de limpieza de la presente invención comprenden además al menos un catalizador de blanqueo. En algunas formas de realización, se pueden utilizar complejos de triazaciclononano de manganeso y complejos relacionados, así como complejos de cobalto, cobre, manganeso y hierro. Se pueden utilizar catalizadores de blanqueo adicionales en la presente invención (véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.os 4,246,612, 5,227,084, 4,810410, el documento WO 99/06521, y EP 2 100 949).

[0224] En algunas formas de realización, las composiciones de limpieza de la presente invención contienen uno o más complejos metálicos catalizadores. En algunas formas de realización, se puede utilizar un catalizador de blanqueo que contenga metal. En algunas formas de realización, el catalizador de blanqueo metálico comprende un sistema catalizador que comprende un catión de metal de transición con actividad catalítica de blanqueo definida (p. ej., cationes de cobre, hierro, titanio, rutenio, wolframio, molibdeno o manganeso), un catión de metal auxiliar que presente poca o ninguna actividad catalítica de blanqueo (p. ej., cationes de zinc o de aluminio), y se utiliza un secuestrante que presente constantes de estabilidad definidas para los cationes metálicos catalizadores y auxiliares, especialmente el ácido etilendiaminotetracético, ácido etilendiaminotetra (metilenfosfónico) y sus sales hidrosolubles (véase, p. ej., la patente estadounidense n.º 4,430,243). En algunas formas de realización, se catalizan las composiciones de limpieza de la presente invención por medio de un compuesto de manganeso. Dichos compuestos y niveles de uso se conocen en la técnica (véase, p. ej., la patente estadounidense n.º 5,576,282). En formas de realización adicionales, se pueden utilizar catalizadores de blanqueo de cobalto en las composiciones de limpieza de la presente invención. En la técnica, se conocen diversos catalizadores de blanqueo de cobalto (véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.os 5,597,936 y 5,595,967) y se preparan fácilmente mediante procedimientos conocidos.

[0225] En algunas formas de realización adicionales, las composiciones de limpieza de la presente invención incluyen un complejo de metal de transición de un ligando rígido macropolicíclico (MRL, por sus siglas en inglés). En la práctica, y no a modo limitativo, en algunas formas de realización, las composiciones y procesos de limpieza que se dan a conocer en la presente invención se ajustan para proporcionar del orden de al menos una parte por cada cien millones de la especie de MRL activo en el medio de lavado acuoso y, en algunas formas de realización, para proporcionar entre aproximadamente 0,005 ppm y aproximadamente 25 ppm, más preferiblemente de aproximadamente 0,05 ppm a aproximadamente 10 ppm, y siendo lo más preferible de aproximadamente 0,1 ppm a aproximadamente 5 ppm del MRL en el líquido de lavado.

[0226] En algunas formas de realización, entre los metales de transición del presente catalizador de blanqueo de metal de transición se incluyen, aunque sin carácter limitativo, manganeso, hiero y cromo. Los MRL incluyen también, aunque sin carácter limitativo, ligandos especiales ultrarrígidos que están entrecruzados (por ejemplo, 5,12-dietil-1,5,8,12-tetraazabiciclo[6.6.2]hexadecano). Los MRL de metal de transición adecuados se preparan fácilmente mediante procedimientos conocidos (véanse, p. ej., el documento WO 2000/32601, y la patente estadounidense n.º 6,225,464).

[0227] En algunas formas de realización, las composiciones de limpieza de la presente invención comprenden agentes de tratamiento del metal. Los agentes de tratamiento del metal se pueden utilizar para prevenir y/o reducir la pérdida de brillo, la corrosión y/o la oxidación de metales, incluidos el aluminio, el acero inoxidable y metales no ferrosos (por ejemplo, plata y cobre). Entre los agentes de tratamiento de metal adecuados se incluyen los descritos en los documentos EP 2 100 949, WO 9426860 y WO 94/26859. En algunas formas de realización, el agente de tratamiento del metal es una sal de zinc. En algunas otras formas de realización, las composiciones de limpieza de la presente invención comprenden de aproximadamente un 0,1 % a aproximadamente un 5 % en peso de uno o más agentes de tratamiento del metal.

[0228] Según se ha indicado anteriormente, las composiciones de limpieza de la presente invención se formulan en cualquier forma posible y se preparan mediante cualquier proceso elegido por el formulador, ejemplos no limitativos de los cuales se describen en las patentes estadounidenses n.os 5,879,584, 5,691,297, 5,574,005, 5,569,645, 5,516,448, 5,489,392, y 5,486,303. En algunas formas de realización en las que se desea obtener una composición de limpieza con pH bajo, el pH de dicha composición se ajusta mediante la adición de un material ácido, tal como HCl.

[0229] Las composiciones de limpieza descritas en el presente documento se pueden utilizar para limpiar un sitio (p. ej., una superficie, un artículo, una pieza de vajilla, o un tejido). Normalmente, al menos una parte del sitio está en contacto con una forma de realización de la presente composición de limpieza, en forma no diluida o diluida en un líquido de lavado, y a continuación, de manera opcional, el sitio se lava y/o se enjuaga. A efectos de la presente invención, el “lavado” incluye, aunque sin carácter limitativo, frotar y agitar de manera mecánica. En algunas formas de realización, las composiciones de limpieza se emplean normalmente en concentraciones de aproximadamente 500 ppm a aproximadamente 15 000 ppm en solución. Cuando el disolvente de lavado sea agua, la temperatura del agua oscilará normalmente entre aproximadamente 5 °C y aproximadamente 90 °C, y

cuando el sitio comprenda un tejido, el agua para la relación de masas del tejido será normalmente de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 30:1.

Procesos para realizar y utilizar composiciones de limpieza

[0230] Las composiciones de limpieza de la presente invención están formuladas en cualquier forma adecuada y se preparan mediante cualquier proceso apropiado escogido por el formulador (véanse, p. ej., las patentes estadounidenses n.os 5,879,584, 5,691,297, 5,574,005, 5,569,645, 5,565,422, 5,516,448, 5,489,392, 5,486,303, 4,515,705, 4,537,706, 4,515,707, 4,550,862, 4,561,998, 4,597,898, 4,968,451, 5,565,145, 5,929,022, 6,294,514 y 6,376,445).

[0231] En algunas formas de realización, las composiciones de limpieza de la presente invención se proporcionan en formato monodosis, incluyendo pastillas, cápsulas, sobres, bolsitas y bolsitas con múltiples compartimentos. En algunas formas de realización, el formato monodosis está diseñado para suministrar una liberación controlada de los ingredientes de una bolsita con múltiples compartimentos (u otro formato monodosis). En la técnica, se conocen formatos monodosis y formas de liberación controlada adecuados (véanse, p. ej., los documentos EP 2 100 949, WO 02/102955, las patentes estadounidenses n.os 4,765,916 y 4,972,017, y el documento WO 04/111178 para materiales adecuados para su uso en formatos monodosis y en formas de liberación controlada). En algunas formas de realización, se proporciona el formato monodosis en pastillas envueltas con una película soluble en agua o en bolsitas hidrosolubles. En el documento EP 2 100 947 se proporcionan diversos formatos monodosis, que se conocen en la técnica.

Métodos de uso

[0232] En algunas formas de realización, las composiciones de limpieza de la presente invención se pueden utilizar para limpiar superficies (p. ej., vajilla), ropa, superficies duras, lentes de contacto, etc. En algunas formas de realización, al menos una parte de la superficie está en contacto con al menos una forma de realización de las composiciones de limpieza de la presente invención, en forma no diluida o diluida en un líquido de lavado, y a continuación, opcionalmente, la superficie se lava y/o se enjuaga. A efectos de la presente invención, el “lavado” incluye, aunque sin carácter limitativo, frotar, y lavar de forma mecánica. En algunas formas de realización, las composiciones de limpieza de la presente invención se utilizan en concentraciones de aproximadamente 500 ppm a aproximadamente 15 000 ppm en solución. En algunas formas de realización en las que el disolvente de lavado es agua, la temperatura del agua oscila normalmente entre aproximadamente 5 °C y aproximadamente 90 °C.

[0233] La presente invención da a conocer métodos para limpiar o lavar un artículo o superficie (p. ej., una superficie dura) que precise ser limpiado, incluyendo, aunque sin carácter limitativo, métodos para limpiar o lavar una pieza de vajilla, un artículo de mesa, una pieza de tejido, una prenda de ropa, un artículo de higiene personal, etc., o similares, y métodos para limpiar o lavar una superficie dura o blanda (p. ej., una superficie dura de un artículo).

[0234] En algunas formas de realización, la presente invención da a conocer un método para limpiar un artículo, objeto o superficie que precise ser limpiado, comprendiendo el método poner en contacto el artículo o superficie (o una parte del artículo o superficie que se quiere limpiar) con al menos una variante de proteasa subtilisina de la presente invención o una composición de la presente invención durante un período de tiempo suficiente y/o en condiciones adecuadas y/o efectivas para limpiar el artículo, objeto o superficie hasta un nivel deseado. Algunos de dichos métodos comprenden además enjuagar el artículo, objeto o superficie con agua. En el caso de algunos de dichos métodos, la composición de limpieza es una composición detergente para lavavajillas y el artículo u objeto que se pretende limpiar es una pieza de vajilla o un artículo de mesa. En el sentido en que se utiliza en el presente documento, una “pieza de vajilla” es un artículo utilizado generalmente para servir o para comer alimentos. Una pieza de vajilla puede ser, a modo de ejemplo y sin carácter limitativo, un plato, fuente, taza, cuenco, etc., y similares. Tal como se utiliza en el presente documento, “artículos de mesa” es un término más amplio que incluye, a modo de ejemplo y sin carácter limitativo, platos, cubiertos, cuchillos, tenedores, cucharas, palillos, cristalería, jarras, salseras, recipientes para bebidas, artículos para servir, etc. Se pretende que el “artículo de mesa” incluya cualquiera de estos artículos o artículos similares para servir o ingerir alimentos. En el caso de algunos de dichos métodos, la composición de limpieza es una composición detergente para lavavajillas automático o una composición detergente para lavavajillas manual y el artículo u objeto que se quiere limpiar es una pieza de vajilla o un artículo de mesa. En el caso de algunos de dichos métodos, la composición de limpieza es una composición detergente para ropa (p. ej., una composición detergente en polvo para ropa o una composición detergente líquida para ropa), y el artículo que se va a limpiar es una pieza de tejido. En algunas otras formas de realización, la composición de limpieza es una composición de pretratamiento de ropa.

[0235] En algunas formas de realización, la presente invención ofrece métodos para limpiar o lavar una pieza de tejido que, opcionalmente, precisa una limpieza o un lavado, respectivamente. En algunas formas de realización, los métodos comprenden proporcionar una composición que comprende la variante de proteasa, incluyendo, aunque sin carácter limitativo, una composición de limpieza para ropa o tejidos, y una pieza de tejido o una prenda de ropa que precisa ser limpiada, y poner en contacto la pieza de tejido o la prenda de ropa (o una parte

del artículo que se desea limpiar) con la composición en condiciones suficientes o efectivas para limpiar o lavar la pieza de tejido o la prenda de ropa hasta un nivel deseado.

[0236] En algunas formas de realización, la presente invención da a conocer un método para limpiar o lavar un artículo o superficie (p. ej., superficie dura) que opcionalmente precisa una limpieza, comprendiendo el método proporcionar un artículo o superficie que precisa ser limpiado o lavado y poner en contacto el artículo o superficie (o una parte del artículo o superficie que se desea limpiar o lavar) con al menos una variante de subtilisina de la invención o una composición de la invención que comprende al menos una tal variante de subtilisina durante un período de tiempo suficiente y/o en condiciones suficientes o efectivas para limpiar o lavar el artículo o superficie hasta un nivel deseado. Entre dichas composiciones se incluyen, a modo de ejemplo y sin carácter limitativo, una composición de limpieza o composición detergente de la invención (p. ej., una composición detergente para lavavajillas manual, una composición de limpieza para lavavajillas manual, un detergente para ropa o un detergente para tejidos o una composición de limpieza para ropa o para tejidos, un detergente líquido para ropa, una composición de limpieza líquida para ropa, una composición detergente en polvo para ropa, una composición de limpieza en polvo para ropa, una composición detergente para lavavajillas automático, una composición de limpieza o detergente para ropa potenciada, un aditivo de limpieza para ropa, y una composición de pretratamiento quitamanchas para ropa, etc.). En algunas formas de realización, el método se repite una o más veces, sobre todo si se desea una limpieza o un lavado adicional. Por ejemplo, en ciertos casos, el método comprende, además, de manera opcional, permitir que el artículo o la superficie permanezca en contacto con la al menos una variante de proteasa o composición durante un período de tiempo suficiente o efectivo para limpiar o lavar el artículo o la superficie hasta el nivel deseado. En algunas formas de realización, los métodos comprenden además enjuagar el artículo o la superficie con agua y/o con otro líquido. En algunas formas de realización, los métodos comprenden además poner en contacto el artículo o la superficie con al menos una variante de proteasa de la invención o de nuevo con una composición de la invención y permitir que el artículo o la superficie permanezca en contacto con la al menos una variante de proteasa o composición durante un período de tiempo suficiente para limpiar o lavar el artículo o la superficie hasta el nivel deseado. En algunas formas de realización, la composición de limpieza es una composición detergente para lavavajillas y el artículo que se quiere limpiar es una pieza de vajilla o un artículo de mesa. En algunas formas de realización de los presentes métodos, la composición de limpieza es una composición detergente para lavavajillas automático o una composición detergente para lavavajillas manual, y el artículo que se va a limpiar es una pieza de vajilla o un artículo de mesa. En algunas formas de realización de los métodos, la composición de limpieza es una composición detergente para ropa, y el artículo que se pretende limpiar es una pieza de tejido.

[0237] La presente invención da a conocer también métodos para limpiar un artículo de mesa o una pieza de vajilla en un lavavajillas automático, comprendiendo el método disponer de un lavavajillas automático, colocar una cantidad de una composición para lavavajillas automático que comprende al menos una variante de subtilisina de la presente invención o una composición de la invención que sea suficiente para limpiar la pieza de vajilla o el artículo de mesa en el interior de la máquina (p. ej., colocando la composición en un compartimento para detergente apropiado o proporcionado o en un dispensador dentro de la máquina), introducir una pieza de vajilla o un artículo de mesa en la máquina, y activar la máquina para limpiar la pieza de vajilla o el artículo de mesa (por ejemplo, siguiendo las instrucciones del fabricante). En algunas formas de realización, los métodos incluyen cualquier composición para detergente automático descrita en el presente documento, la cual comprende, sin carácter limitativo, al menos una variante de subtilisina expuesta en el presente documento. La cantidad de composición para lavavajillas automático que se debe utilizar se puede determinar fácilmente siguiendo las instrucciones o sugerencias del fabricante, y se puede emplear cualquier forma de composición para lavavajillas automático que comprenda al menos una variante de proteasa de la invención (p. ej., líquida, en polvo, sólida, en gel, en pastilla, etc.), incluida cualquiera de las descritas en el presente documento.

[0238] La presente invención da a conocer además métodos para limpiar una superficie, artículo u objeto que, opcionalmente, precisa ser limpiado, comprendiendo el método poner en contacto el artículo o superficie (o una parte del artículo o superficie que se desee limpiar) con al menos una variante de subtilisina de la presente invención o una composición de limpieza de la invención en forma no diluida o diluida en un líquido de lavado durante un período de tiempo suficiente y/o en condiciones suficientes o efectivas para limpiar o lavar el artículo o la superficie hasta un nivel deseado. A continuación, la superficie, artículo u objeto se puede (de forma opcional) lavar y/o enjuagar si se desea. A efectos de la presente invención, el “lavado” incluye, a modo de ejemplo y sin carácter limitativo, frotar y agitar de forma mecánica. En algunas formas de realización, las composiciones de limpieza se emplean en concentraciones de aproximadamente 500 ppm a aproximadamente 15 000 ppm en solución (p. ej., solución acuosa). Cuando el disolvente de lavado es agua, la temperatura de lavado oscila normalmente entre aproximadamente 5 °C y aproximadamente 90 °C, y cuando la superficie, artículo u objeto comprende un tejido, el agua para la relación de masas del tejido es normalmente de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 30:1.

[0239] La presente invención da a conocer además métodos para limpiar una prenda de ropa o una pieza de tejido en una lavadora, comprendiendo el método disponer de una lavadora, colocar una cantidad de una composición detergente para ropa que comprenda al menos una variante de subtilisina de la invención suficiente para limpiar la prenda de ropa o la pieza de tejido en la máquina (p. ej., colocando la composición en un

compartimento de detergente apropiado o proporcionado o en un dispensador en el interior de la máquina), colocar la prenda de ropa o la pieza de tejido dentro de la máquina, y activar la máquina para limpiar la prenda de ropa o la pieza de tejido (por ejemplo, siguiendo las instrucciones del fabricante). Los métodos de la presente invención incluyen cualquier composición detergente para lavar ropa descrita en el presente documento, comprendiendo, aunque sin carácter limitativo, al menos una de cualquier variante de subtilisina expuesta en el presente documento. La cantidad de composición detergente para ropa que se va a utilizar se puede determinar fácilmente siguiendo las instrucciones o sugerencias del fabricante, y se puede emplear cualquier forma de composición detergente para ropa que comprenda al menos una variante de proteasa de la invención (p. ej., sólida, en polvo, líquida, en pastilla, en gel, etc.), incluida cualquiera de las descritas en el presente documento.

EXPERIMENTACIÓN

[0240] La presente invención se representa mediante los siguientes ejemplos, los cuales no pretenden de ningún modo limitar el alcance de la invención reivindicada. Los ejemplos comprenden variantes de subtilisina que no se encuadran dentro del alcance de las reivindicaciones. Dichas variantes se describen únicamente con fines ilustrativos.

[0241] En la descripción experimental que se incluye a continuación se aplican las siguientes abreviaturas: IR (índice de rendimiento), ppm (partes por millón); M (molar); mM (milimolar); µM (micromolar); nM (nanomolar); mol (moles); mmol (milimoles); µmol (micromoles); nmol (nanomoles); g (gramos); mg (miligramos); µg (microgramos); pg (picogramos); L y l (litros); ml y mL (mililitros); µl y µL (microlitros); cm (centímetros); mm (milímetros); µm (micrómetros); nm (nanómetros); U (unidades); V (voltios); PM (peso molecular); s (segundos); min(s) (minuto/minutos); h(s) y hr(s) (hora/horas); °C (grados Celsius); c.s.p. (cantidad suficiente para); NR (no realizado); rpm (revoluciones por minuto); GH (grados alemanes de dureza del agua); H_2O (agua); dH_2O (agua desionizada); HCl (ácido clorhídrico); aa (aminoácido); pb (par de bases); kb (par de kilobases); kD (kilodaltons); ADNc (ADN copia o complementario); ADN (ácido desoxirribonucleico); ADNss (ADN monocatenario); ADNds (ADN bicatenario); dNTP (desoxirribonucleótido trifosfato); ARN (ácido ribonucleico); $MgCl_2$ (cloruro de magnesio); NaCl (cloruro de sodio); p/v (peso sobre volumen); v/v (volumen sobre volumen); p/p (peso sobre peso); gr (gravedad); DO (densidad óptica); ppm (partes por millón); solución tampón fosfato de Dulbecco (DPBS); SOC (2 % de bactotriptona, 0,5 % de extracto de bactolevadura, 10 mM de NaCl, 2,5 mM de KCl); caldo Terrific Broth (TB; 12 g/l de bactotriptona, 24 g/l de glicerol, 2,31 g/l de KH_2PO_4 y 12,54 g/l de K_2HPO_4); DO_{280} (densidad óptica a 280 nm); DO_{600} (densidad óptica a 600 nm); A_{405} (absorbancia a 405 nm); Vmax (la velocidad inicial máxima de una reacción catalizada por una enzima); PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida); PBS (tampón fosfato salino [150 mM de NaCl, 10 mM de tampón fosfato de sodio, pH 7.2]); PBST (PBS+0,25 % de TWEEN®-20); PEG (polietilenglicol); PCR (reacción en cadena de la polimerasa); RT-PCR (PCR con transcriptasa inversa); SDS (dodecilsulfato de sodio); Tris (tris(hidroximetil)aminometano); HEPES (ácido N-[2-hidroxietil]piperazin-N-[2-etanosulfónico]); HBS (tampón salino de HEPES); Tris-HCl (tris[hidroximetil]aminometano-clorhidrato); Tricina (N-[tris-(hidroximetil)-metil]-glicina); CHES (ácido 2-(N-ciclohexilamino)etanosulfónico); TAPS (ácido 3-{[tris-(hidroximetil)-metil]-amino}-propanosulfónico); CAPS (ácido 3-(ciclohexilamino)-propanosulfónico; DMSO (dimetilsulfóxido); DTT (1,4-ditio-DL-treitol); SA (ácido sinapínico (ácido s,5-dimetoxi-4-hidroxicinámico); TCA (ácido tricloroacético); Glut y GSH (glutatión reducido); GSSG (glutatión oxidado); TCEP (Tris[2-carboxietil] fosfina); Ci (Curios); mCi (miliCurios); µCi (microCurios); HPLC (cromatografía líquida de alta presión); RP-HPLC (cromatografía líquida de alta presión en fase inversa); TLC (cromatografía en capa fina); MALDI-TOF (desorción/ionización láser asistida por matriz--tiempo de vuelo); Ts (tosilo); Bn (bencilo); Ph (fenilo); Ms (mesilo); Et (etilo), Me (metilo); *Taq* (ADN polimerasa de *Thermus aquaticus*); Klenow (fragmento grande (Klenow) de ADN polimerasa I); EGTA (ácido etilenglicol-bis(6-aminoetiléter)-N,N,N',N'-tetraacético); EDTA (ácido etilendiaminotetraacético); bla (gen de resistencia a la β-lactamasa o a la ampicilina); HDL (líquido de alta densidad); HDD (detergente en polvo de alto rendimiento); HSG (detergente granulado de alta espuma); CEE (Europa Central y del Este); WE (Europa Occidental); NA, al utilizarse en referencia a detergentes (Norteamérica); Japón y JPN, al utilizarse en referencia a detergentes (Japón); MJ Research (MJ Research, Reno, Nevada); Baseclear (Baseclear BV, Inc., Leiden, Países Bajos); PerSeptive (PerSeptive Biosystems, Framingham, Massachusetts); ThermoFinnigan (ThermoFinnigan, San José, California); Argo (Argo BioAnalytica, Morris Plains, Nueva Jersey); Seitz EKS (SeitzSchenk Filtersystems GmbH, Bad Kreuznach, Alemania); Pall (Pall Corp., East Hills, Nueva York y Bad Kreuznach, Alemania); Spectrum (Spectrum Laboratories, Rancho Dominguez, California); Molecular Structure (Molecular Structure Corp., Woodlands, Texas); Accelrys (Accelrys, Inc., San Diego, California); Chemical Computing (Chemical Computing Corp., Montreal, Canadá); New Brunswick (New Brunswick Scientific, Co., Edison, Nueva Jersey); CFT (Center for Test Materials, Vlaardingen, Países Bajos); P&G y Procter & Gamble (Procter & Gamble, Inc., Cincinnati, Ohio); GE Healthcare (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Reino Unido); DNA2.0 (DNA2.0, Menlo Park, California); OXOID (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, Reino Unido); Megazyme (Megazyme International Ireland Ltd., Bray Business Park, Bray, Co., Wicklow, Irlanda); Finnzymes (Finnzymes Oy, Espoo, Finlandia); Kelco (CP Kelco, Wilmington, Delaware); Corning (Corning Life Sciences, Corning, Nueva York); (NEN (NEN Life Science Products, Boston, Massachusetts); Pharma AS (Pharma AS, Oslo, Noruega); Dynal (Dynal, Oslo, Noruega); Bio-Synthesis (Bio-Synthesis, Lewisville, Texas); ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, Maryland); Gibco/BRL (Gibco/BRL, Grand Island, Nueva York); Sigma (Sigma Chemical Co., San Luis, Misuri); Pharmacia (Pharmacia Biotech, Piscataway, Nueva Jersey); NCBI (National Center for Biotechnology Information); Applied

Biosystems (Applied Biosystems, Foster City, California); BD Biosciences y/o Clontech (BD Biosciences CLONTECH Laboratories, Palo Alto, California); Operon Technologies (Operon Technologies, Inc., Alameda, California); MWG Biotech (MWG Biotech, High Point, Carolina del Norte); Oligos Etc (Oligos Etc. Inc, Wilsonville, Oregón); Bachem (Bachem Bioscience, Inc., King of Prussia, Pensilvania); Difco (Difco Laboratories, Detroit, Míchigan); Mediatech (Mediatech, Herndon, Virginia); Santa Cruz (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, California); Oxoid (Oxoid Inc., Ogdensburg, Nueva York); Worthington (Worthington Biochemical Corp., Freehold, Nueva Jersey); GIBCO BRL o Gibco BRL (Life Technologies, Inc., Gaithersburg, Maryland); Millipore (Millipore, Billerica, Massachusetts); Bio-Rad (Bio-Rad, Hercules, California); Invitrogen (Invitrogen Corp., San Diego, California); NEB (New England Biolabs, Beverly, Massachusetts); Sigma (Sigma Chemical Co., San Luis, Misuri); Pierce (Pierce Biotechnology, Rockford, Illinois); Takara (Takara Bio Inc. Otsu, Japón); Roche (Hoffmann-La Roche, Basilea, Suiza); EM Science (EM Science, Gibbstown, Nueva Jersey); Qiagen (Qiagen, Inc., Valencia, California); Biodesign (Biodesign Intl., Saco, Maine); Aptagen (Aptagen, Inc., Herndon, Virginia); Sorvall (marca Sorvall, de Kendro Laboratory Products, Asheville, Carolina del Norte); Molecular Devices (Molecular Devices, Corp., Sunnyvale, California); R&D Systems (R&D Systems, Mineápolis, Minesota); Siegfried Handel (Siegfried Handel AG, Zofingen, Suiza); Stratagene (Stratagene Cloning Systems, La Jolla, California); Marsh (Marsh Biosciences, Rochester, Nueva York); Geneart (Geneart GmbH, Ratisbona, Alemania); Bio-Tek (Bio-Tek Instruments, Winooski, Vermont); Biacore (Biacore, Inc., Piscataway, Nueva Jersey); PeproTech (PeproTech, Rocky Hill, Nueva Jersey); SynPep (SynPep, Dublin, California); New Objective (marca New Objective; Scientific Instrument Services, Inc., Ringoes, Nueva Jersey); Waters (Waters, Inc., Milford, Massachusetts); Matrix Science (Matrix Science, Boston, Massachusetts); Dionex (Dionex, Corp., Sunnyvale, California); Monsanto (Monsanto Co., San Luis, Misuri); Wintershall (Wintershall AG, Kassel, Alemania); BASF (BASF Co., Florham Park, Nueva Jersey); Huntsman (Huntsman Petrochemical Corp., Salt Lake City, Utah); Shell Chemicals (Shell Chemicals, Inc., Londres, Reino Unido); Stepan (Stepan, Northfield, Illinois); Clariant (Clariant, Sulzbach, Alemania); Industrial Zeolite (Industrial Zeolite Ltd., Grays, Essex, Reino Unido); Jungbunzlauer (Jungbunzlauer, Basilea, Suiza); Solvay (Solvay, Bruselas, Bélgica); 3V Sigma (3V Sigma, Bérgamo, Italia); Innospec (Innospec, Ellesmere Port, Reino Unido); Thermphos (Thermphos, Vlissiggen-Ost, Países Bajos); Ciba Specialty (Ciba Specialty Chemicals, Basilea, Suiza); Dow Corning (Dow Corning, Barry, Reino Unido); Enichem (Enichem Iberica, Barcelona, España); Fluka Chemie AG (Fluka Chemie AG, Buchs, Suiza); Gist-Brocades (Gist-Brocades, NV, Delft, Países Bajos); Dow Corning (Dow Corning Corp., Midland, Míchigan); Mettler-Toledo (Mettler-Toledo Inc, Columbus, Ohio); RB (Reckitt-Benckiser, Slough, Reino Unido); y Microsoft (Microsoft, Inc., Redmond, Washington).

[0242] Según se utiliza en el presente documento, en algunas listas, se indica un primer “0” con el fin de proporcionar una denominación de tres números para cada sitio (p. ej., “001” es lo mismo que “1”, por lo que “A001C” es lo mismo que “A1C”). En algunas listas, el primer “0” no se incluye. Además, según se utiliza en el presente documento, “X” hace referencia a cualquier aminoácido.

[0243] En los ejemplos de composiciones detergentes expuestos en el presente documento, los niveles enzimáticos se expresan mediante las enzimas puras en peso de la composición total y, a no ser que se especifique otra cosa, los ingredientes del detergente se expresan en peso de las composiciones totales. Las identificaciones abreviadas de componentes del presente documento poseen los siguientes significados:

Abreviatura	**Ingrediente**
LAS	: Sulfonato de C_{11-13} alquilbenceno lineal de sodio.
NaC16-17HSAS	: Alquilsulfato de sodio C_{16-17} altamente soluble
TAS	: Alquilsulfato de sebo de sodio
CxyAS	: Alquilsulfato de sodio C_{1x} - C_{1y}
CxyEz	: Alcohol primario predominantemente lineal C_{1x} - C_{1y} condensado con una media de z moles de óxido de etileno.
CxyAEzS	: Alquilsulfato de sodio C_{1x} - C_{1y} condensado con una media de z moles de óxido de etileno. Nombre de molécula añadido en los ejemplos.
No iónico	: Alcohol graso etoxilado/propoxilado mixto, por ejemplo, Plurafac LF404, siendo un alcohol con un grado medio de etoxilación de 3.8 y un grado medio de propoxilación de 4.5.
QAS	: $R_2.N+(CH_3)_2(C_2H_4OH)$ con $R_2 = C_{12}$-C_{14}.
Silicato	: Silicato de sodio amorfo (proporción SiO_2:Na_2O = 1.6-3.2:1).
Metasilicato	: Metasilicato de sodio (proporción SiO_2:Na_2O = 1.0).
Zeolita A	: Aluminosilicato hidratado de fórmula $Na_{12}(AlO_2SiO_2)_{12}$. $27H_2O$
SKS-6	: Silicato laminar cristalino de fórmula δ-$Na_2Si_2O_5$.
Sulfato	: Sulfato de sodio anhidro.

Abreviatura	**Ingrediente**
STPP	: Tripolifosfato de sodio.
MA/AA	: Copolímero aleatorio de acrilato/maleato 4:1, peso molecular medio de aproximadamente 70 000-80 000.
AA	: Polímero de poliacrilato de sodio de peso molecular medio de 4500.
Policarboxilato	: Copolímero que comprende una mezcla de monómeros carboxilados tales como acrilato, maleato y metacrilato con un PM que oscila entre 2000-80 000 como Sokolan, disponible comercialmente a través de BASF, siendo un copolímero de ácido acrílico, PM 4500.
BB1	: Propano sulfonato de 3-(3,4-dihidroisoquinolinio)
BB2	Decano-2-sulfato de 1-(3,4-dihidroisoquinolinio)
PB1	: Perborato de sodio monohidrato.
PB4	: Perborato de sodio tetrahidratado de fórmula nominal $NaBO_3.4H_2O$.
Percarbonato	: Percarbonato de sodio de fórmula nominal $2Na_2CO_3.3H_2O_2$.
TAED	: Tetraacetiletilendiamina
NOBS	: Sulfonato de nonanoiloxibenceno en forma de sal sódica.
DTPA	: Ácido dietilentriaminopentaacético.
HEDP	: Ácido 1,1-hidroxietanodifosfónico.
DETPMP	: Penta(metilen)fosfonato de dietiltriamina (metileno), comercializado por Monsanto con el nombre comercial Dequest 2060.
EDDS	: Ácido etilendiamino-N,N'-disuccínico, isómero (S,S) en forma de su sal sódica
Diamina	: Dimetilaminopropilamina; 1,6-hexanodiamina; 1,3-propanodiamina; 2-metil-1,5-pentanodiamina; 1,3-pentanodiamina; 1-metildiaminopropano.
DETBCHD	Dicloruro de 5,12-dietil-1,5,8,12-tetraazabiciclo [6,6,2] hexadecano, sal de Mn(II)
PAAC	: Acetato de pentaamina sal de cobalto(III).
Parafina	: Aceite de parafina vendido con el nombre comercial Winog 70 por Wintershall.
Sulfonato de parafina	: Aceite o cera de parafina donde algunos de los átomos de hidrógeno se han reemplazado por grupos sulfonato.
Aldosa oxidasa	: Enzima oxidasa vendida con el nombre comercial Aldose Oxidase por Novozymes A/S
Galactosa oxidasa	: Galactosa oxidasa de Sigma
nprE	: La forma recombinante de metaloproteasa neutra expresada en *Bacillus subtilis* (véase, p. ej., el documento WO 07/044993)
PMN	: Metaloproteasa neutra purificada de *Bacillus amyloliquefaciens*.
Amilasa	: Una enzima amilolítica adecuada, como las que se venden con los nombres comerciales PURAFECT ® Ox descritos en WO 94/18314, WO96/05295 comercializados por Genencor; NATALASE®, TERMAMYL®, FUNGAMY1® y DURAMYL™, disponibles todos a través de Novozymes A/S.
Lipasa	: Una enzima lipolítica adecuada tal como las vendidas con los nombres comerciales LIPEX®, LIPOLASE®, LIPOLASE® Ultra de Novozymes A/S y Lipomax™ de Gist-Brocades.
Celulasa	: Una enzima celulítica adecuada tal como las vendidas con los nombres comerciales CAREZYME®, CELLUZYME®, y/o ENDOLASE® de Novozymes A/S.
Pectina liasa	: Una pectina liasa adecuada, tales como las vendidas con los nombres comerciales PECTAWAY® y PECTAWASH® disponibles a través de Novozymes A/S.
PVP	: Polivinilpirrolidona con un peso molecular medio de 60 000.
PVNO	N-óxido de polivinilpiridina, con un peso molecular medio de 50 000.
PVPVI	: Copolímero de vinilimidazol y vinilpirrolidona, con un peso molecular medio de

Abreviatura	Ingrediente
	20 000.
Abrillantador	: 4,4'-bis(2-sulfoestiril)bifenilo de disodio.
Antiespumante de silicona	: Regulador de espuma de polidimetilsiloxano con un copolímero de siloxano-oxialquileno como agente dispersante, con una relación de dicho regulador de espuma con respecto a dicho agente dispersante de 10:1 a 100:1.
Supresor de espuma	: 12 % de silicona/sílice, 18 % de alcohol estearílico, 70 % de almidón en forma granulada.
SRP 1	: Poliésteres de extremo terminado aniónicamente.
PEG X	: Polietilenglicol, con un peso molecular de x.
PVP K60 ®	: Homopolímero de vinilpirrolidona (PM medio 160 000)
Jeffamine ® ED-2001	: Polietilenglicol con terminación de Huntsman
Isachem ® AS	: Sulfato de alquilo de alcohol ramificado de Enichem
MME PEG (2000)	: Monometileterpolietilenglicol (PM 2000) de Fluka Chemie AG
DC3225C	: Supresor de espuma de silicona, mezcla de aceite de silicona y sílice de Dow Corning.
TEPAE	: Etoxilato de tetraetilenpentaamina.
BTA	: Benzotriazol.
Betaína	: $(CH_3)_3N^+CH_2COO^-$
Azúcar	: D-glucosa de calidad industrial o azúcar de calidad alimentaria
CFAA	: alquilo C_{12}-C_{14}-N-metilglucamida
TPKFA	: Ácidos grasos de fracción completa descabezada C_{12}-C_{14}
Arcilla	: Silicato de aluminio hidratado en una fórmula general $Al_2O_3SiO_2 \cdot xH_2O$. Tipos: Caolinita, montmorillonita, atapulgita, ilita, bentonita, halloysita.
pH	: Medido en una solución al 1 % en agua destilada a 20 °C.

[0244] Para los detergentes para ropa líquidos de alto rendimiento (HDL) de Norteamérica (NA) y Europa Occidental (WE), la inactivación por calor de las enzimas presentes en detergentes comercializados se lleva a cabo colocando detergente líquido previamente pesado (en una botella de vidrio) en un baño de agua a 95 °C durante 2 horas. El tiempo de incubación para la inactivación por calor de detergentes lavavajillas automáticos (ADW) de NA y WE es de 8 horas. Tanto los detergentes calentados como los no calentados se analizan durante 5 minutos disolviendo el detergente con el objetivo de determinar de forma precisa el porcentaje inactivado. La actividad analítica se analiza mediante el ensayo AAPF.

[0245] Para analizar la actividad enzimática en detergentes inactivados por calor, se realizan soluciones funcionales de detergentes a partir de los materiales inactivados por calor. Se añaden cantidades apropiadas de dureza del agua (por ejemplo, 6 gpg o 12 gpg) y tampón a las soluciones detergentes para coincidir con las condiciones deseadas. Las soluciones se mezclan agitando con un agitador vorticial o invirtiendo las botellas. La siguiente Tabla ofrece información acerca de algunos de los detergentes comercializados y condiciones de ensayo utilizadas en el presente documento. En algunos experimentos, se pueden utilizar otros detergentes disponibles comercialmente y/o adicionales en los Ejemplos expuestos más adelante.

Tabla A. Condiciones de lavado para ropa y vajilla

Región	Forma	Dosis	Detergente*	Tampón	Gpg	pH	T (°C)
Ropa (líquido y granulado de alto rendimiento)							
NA	HDL	0,78 g/l	P&G TIDE® 2X	5 mM de HEPES	6	8.0	20
WE	HDL	5,0 g/L	Henkel PERSIL™	5 mM de HEPES	12	8.2	40
WE	HDG	8,0 g/l	P&G ARIEL®	2 mM de Na_2CO_3	12	10.5	40
JPN	HDG	0,7 g/l	P&G TIDE®	2 mM de Na_2CO_3	6	10.0	20
NA	HDG	1,0 g/l	P&G TIDE®	2 mM de Na_2CO_3	6	10.0	20
Lavavajillas automático							
WE	ADW	3,0 g/l	RB CALGONIT™	2 mM de Na_2CO_3	21	10.0	40

Tabla A. Condiciones de lavado para ropa y vajilla							
Región	**Forma**	**Dosis**	**Detergente***	**Tampón**	**Gpg**	**pH**	**T (°C)**
NA	ADW	3,0 g/l	P&G CASCADE®	2 mM de Na_2 CO_3	9	10.0	40

[0246] En algunos Ejemplos adicionales, se pueden utilizar las siguientes soluciones:

Tabla B Soluciones detergentes funcionales					
Detergente	**Temp. (°C)**	**Detergente g/l**	**pH**	**Tampón**	**Gpg**
TIDE® 2X Cold	16	0,98	8	5mM de HEPES	6
TIDE® 2X Cold	32	0,98	8	5mM de HEPES	6
TIDE® 2X Cold	16	0,98	7	5mM de MOPS	6

[0247] La Tabla C expone composiciones detergentes para ropa granuladas producidas de acuerdo con la invención y adecuadas para lavar tejidos.

Tabla C. Composiciones detergentes granuladas para ropa y sus componentes						
Componente	**Composiciones detergentes**					
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**
Sulfonato de alquilbenceno lineal con longitud de cadena de carbono alifática C_{11}-C_{12}	15	12	20	10	12	13
Otros tensioactivos	1,6	1,2	1,9	3,2	0,5	1,2
Mejorador(es) de fosfato	2	3	4			
Zeolita				1	4	1
Silicato	4	5	2	3	3	5
Carbonato de sodio	2	5	5	4	0	3
Poliacrilato (PM 4500)	1	0,6	1	1	1,5	1
Carboximetilcelulosa (Finnfix BDA de CPKelco)	1	-	0,3	-	1,1	-
Celluclean® (15,6 mg/g)	0,23	0,17	0,5	0,2	0,2	0,6
Proteasa de agua fría*	0,23	0,17	0,05	0,2	0,03	0,1
Stainzyme Plus® (14 mg/g)	0,23	0,17	0,5	0,2	0,2	0,6
Mannaway 4.0T (4 mg/g)	0,1			0,1		0,1
Lipex 100T (18,6 mg/g)	0,2		0,1		0,3	
Abrillantador(es) fluorescente(s)	0,16	0,06	0,16	0,18	0,16	0,16
Ácido dietilentriaminopentaacético o ácido etilendiaminotetraacético	0,6		0,6	0,25	0,6	0,6
$MgSO_4$	1	1	1	0,5	1	1
Blanqueador(es) y Activador(es) de blanqueo	6,88		6,12	2,09	1,17	4,66
Agente colorante[5] de tiofeno etoxilado	0,002	0,001	0,003	0,003	-	-
Direct Violet 9 de Ciba Specialty Chemicals				0,0006	0,0004	0,0006
Sulfato/Ácido cítrico/Bicarbonato de sodio/Humedad/Perfume	Resto hasta el 100 %					
[1] El copolímero de injerto aleatorio es un copolímero de óxido de polietileno injertado con acetato de polivinilo que presenta un esqueleto de óxido de polietileno y múltiples cadenas laterales de acetato de						

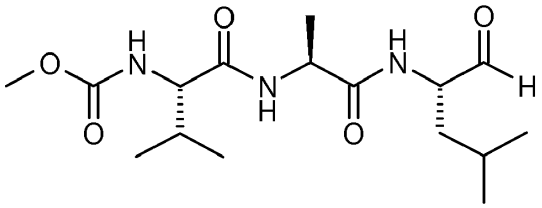
Tabla C. Composiciones detergentes granuladas para ropa y sus componentes						
Componente	**Composiciones detergentes**					
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**

polivinilo. El peso molecular del esqueleto de óxido de polietileno es de aproximadamente 6000 y la proporción de peso del óxido de polietileno con respecto al acetato de polivinilo es de aproximadamente 40 a 60 y no más de 1 punto de injerto por 50 unidades de óxido de etileno.

[2] Polietilenimina (PM = 600) con 20 grupos de etoxilato por -NH.

[3] El polímero anfifílico desengrasante alcoxilado es una polietilenimina (PM = 600) con 24 grupos de etoxilato por -NH y 16 grupos de propoxilato por -NH.

[4] Inhibidor de proteasa reversible con estructura:



[5] El agente colorante de tiofeno etoxilado es conforme se describe en el documento US 7,208,459 B2.

[0248] En la Tabla C, se expresan todos los niveles de enzimas como % de material enzimático crudo, excepto la proteasa de agua fría (de esta invención), que se expresa como % de proteína activa añadida al producto.

La Tabla D expone composiciones detergentes granuladas para ropa adecuadas para lavadoras automáticas de carga superior (composiciones detergentes 7-9) y lavadoras de carga frontal (composiciones detergentes 10-11). La variante de proteasa GG36 analizada y/o la proteasa de agua fría de la presente invención se añade(n) por separado a estas fórmulas.

Tabla D. Composiciones detergentes granuladas para ropa y sus componentes					
Componente	**Composición detergente**				
	7	**8**	**9**	**10**	**11**
Tensioactivos					
Alquilsulfato ramificado C_{16-17}	3,55	15,8			
Alquilsulfato C_{12-14}			1,5		
Sulfonato de alquilbenceno lineal de sodio con longitud de cadena alifática C_{11}-C_{12}	9,6		10,6	7,5	9
Alcohol etoxi-3-sulfato de sodio $C_{14/15}$	1,15			2,88	
Alquilsulfato de sodio $C_{14/15}$	2,37				
Etoxilato de alcohol $C_{14/15}$ con una media de 7 moles de etoxilación				1,17	1
Cloruro de mono-C_{8-10} alquilo mono-hidroxietil dimetil amonio cuaternario					0,45
Cloruro de dimetil-hidroxil-etil-lauril-amonio			0,18		
Zeolita A	13,9	4,7	0,01	2,9	1,8
Proporción de silicato de sodio 1.6.	4	0,2		4	4
Proporción de silicato de sodio 2.35.			8		
Ácido cítrico				2,5	1,4
Tripolifosfato de sodio			5		
Carbonato de sodio	24,1	30	16,9	24,4	21

Tabla D. Composiciones detergentes granuladas para ropa y sus componentes					
Componente	**Composición detergente**				
	7	**8**	**9**	**10**	**11**
Tensioactivos					
Nonanoiloxibenceno sulfonato	5,78	2,81	0,96		
Potenciador de blanqueo a base de oxaziridinio				0,03	0,017
Tetrasodio S,S,-etilendiaminodisuccinato				0,2	
Dietilentriamina penta (ácido metilenfosfónico), sal heptasódica	0,61				0,33
Ácido hidroxietano dimetileno fosfónico				0,29	0,45
Etilendiaminotetraacetato			0,27		
$MgSO_4$			0,47	0,5994	0,782
Percarbonato de sodio	7	4,4		15,9	19,1
Tetraacetiletilendiamina				3,3	4,6
Perborato de sodio monohidrato			1,2		
Carboximetilcelulosa (p. ej., Finnfix BDA de CPKelco)	0,1		0,17	1,69	0,23
Copolímero sódico de ácido acrílico/ácido maleico (70/30)	0,0236	3,8		2	2,5
Poliacrilato de sodio (Sokalan PA30 CL)	4		0,84		
Polímero de tereftalato				0,23	
Copolímero de injerto aleatorio de polietilenglicol/acetato de vinilo			0,89	0,89	0,91
Fotoblanqueador- tetrasulfonato de ftalocianina de zinc			0,005	0,001	0,002
C.I. Abrillantador fluorescente 260	0,11	0,15	0,04	0,23	0,15
C.I. Abrillantador fluorescente 351 (Tinopal ® CBS)			0,1		
Gránulo supresor de espuma		0,25		0,07	0,04
Carboximetilcelulosa hidrofóbicamente modificada			0,019	0,028	
Bentonita			8,35		
Otros (tintes, perfumes, adyuvantes de procesamiento, humedad y sulfato de sodio)	Resto	Resto	Resto	Resto	Resto

[0249] En la Tabla D, se pueden obtener ingredientes de tensioactivo a través de cualquier proveedor adecuado, incluidos, aunque sin carácter limitativo, BASF (p. ej., LUTENSOL®), Shell Chemicals, Stepan, Huntsman, y Clariant (p. ej., PRAEPAGEN®). Se puede obtener zeolita a través de fuentes tales como Industrial Zeolite. Se puede obtener ácido cítrico y citrato de sodio a través de fuentes tales como Jungbunzlauer. Se puede obtener percarbonato de sodio, carbonato de sodio, bicarbonato de sodio y sesquicarbonato de sodio a través de fuentes tales como Solvay. Se pueden obtener copolímeros de acrilato/maleato a través de fuentes tales como BASF. Se puede obtener carboximetilcelulosa y carboximetilcelulosa modificada hidrofóbicamente a través de fuentes tales como CPKelco. Se puede obtener C.I. abrillantador fluorescente 260 a través de 3V Sigma (p. ej., OPTIBLANC®, OPTIBLANC® 2M/G, OPTIBLANC® 2MG/LT Extra, u OPTIBLANC® Ecobright). Se puede obtener tetrasodio S,S,-etilendiaminodisuccinato a través de fuentes tales como Innospec. Se puede obtener copolímero de tereftalato a través de Clariant (p. ej., REPELOTEX SF 2). Además, se puede obtener ácido 1-hidroxietano-1,1-

difosfónico a través de Thermphos. El potenciador de blanqueo a base de oxaziridinio presenta la siguiente estructura, donde R1 = 2-butiloctilo, y se produjo de acuerdo con el documento US 2006/0089284A1.

[0250] Las enzimas NATALASE®, TERMAMYL®, STAINZYME PLUS®, CELLUCLEAN® y MANNAWAY® se pueden obtener de Novozymes. Se puede obtener tetrasulfonato de ftalocianina de zinc a través de Ciba Specialty Chemicals (p. ej., TINOLUX® BMC). El gránulo supresor de espuma se puede obtener a través de Dow Corning. En estas composiciones detergentes, el copolímero de injerto aleatorio es un copolímero de óxido de polietileno injertado con acetato de polivinilo que presenta un esqueleto de óxido de polietileno y múltiples cadenas laterales de acetato de polivinilo. El peso molecular del esqueleto de óxido de polietileno es de aproximadamente 6000 y la proporción de peso del óxido de polietileno con respecto al acetato de polivinilo es de aproximadamente 40 a 60 y no más de 1 punto de injerto por 50 unidades de óxido de etileno.

Las Tablas E-G exponen composiciones detergentes granuladas adicionales que son adecuadas para lavadoras (detergentes 36a-n). La variante de proteasa GG36 analizada o la proteasa de agua fría de la presente invención se añade(n) por separado a estas fórmulas.

Tabla E. Composiciones detergentes granuladas para ropa adicionales y sus componentes					
	Composición detergente				
Componente	**36a**	**36b**	**36c**	**36d**	**36e**
Tensioactivos					
C_{10} No iónico				0,1843	
Alquilsulfato C_{16-17} ramificado	3,53	3,53	3,53		
Alquilsulfato C_{12-14}					
Alquilbencenosulfonato de sodio lineal con longitud de cadena alifática C_{11}-C_{12}	8,98	8,98	8,98	13,58	14,75
Alcohol etoxi-3-sulfato de sodio $C_{14/15}$	1,28	1,28	1,28		
Alquilsulfato de sodio $C_{14/15}$	2,36	2,36	2,36		
Etoxilato de alcohol $C_{14/15}$ con una media de 7 moles de etoxilación					
Cloruro de mono-C_{8-10} alquilo mono-hidroxietil dimetil amonio cuaternario					
Cloruro de dimetil-hidroxil-etil-lauril-amonio				0,1803	
Zeolita A	15,31	15,31	15,31		4,47
Bentonita				8,35	
Proporción de silicato de sodio 1.6					0,16
Proporción de silicato de sodio 2.0	3,72	3,72	3,72	8,41	
Proporción de silicato de sodio 2.35					
Ácido cítrico				0,0066	
Tripolifosfato de sodio				5,06	
Carbonato de sodio	26,1	26,18	26,1	15,9	29,0
Nonanoiloxibenceno sulfonato	5,78	5,78	5,78	1,17	1,86
Potenciador de blanqueo a base de	0,037	0,037	0,037		

Tabla E. Composiciones detergentes granuladas para ropa adicionales y sus componentes					
	Composición detergente				
Componente	**36a**	**36b**	**36c**	**36d**	**36e**
Tensioactivos					
oxaziridinio					
Tetrasodio S,S-etilendiaminodisuccinato					
Dietilentriamina penta (ácido metilenfosfónico), sal heptasódica	0,62	0,62	0,62		
Ácido hidroxietano dimetileno fosfónico					
Etilendiaminotetraacetato				0,2701	
MgSO4	0,056	0,056	0,056	0,47	
Percarbonato de sodio		7,06	7,06		3,64
Tetraacetiletilendiamina					
Perborato de sodio monohidrato				1,47	
Carboximetilcelulosa (p. ej., Finnfix BDA de CPKelco)	0,38	0,38	0,38	0,173	
Copolímero sódico de ácido acrílico/ácido maleico (70/30)	3,79	3,78	3,79		3,64
Poliacrilato de sodio (Sokalan PA30 CL)	3,78	3,78	3,78	0,842	
Polímero de tereftalato					
Copolímero de injerto aleatorio de polietilenglicol/acetato de vinilo				0,89	
Fotoblanqueador- tetrasulfonato de ftalocianina de zinc					
C.I. Abrillantador fluorescente 260	0,1125	0,1125	0,1125	0,043	0,15
C.I. Abrillantador fluorescente 351 (Tinopal ® CBS)				0,0952	
Gránulo supresor de espuma	0,015	0,015	0,015		0,031
Carboximetilcelulosa hidrofóbicamente modificada (Finnifix ® SH-1)					
Bentonita					
Otros (tintes, perfumes, adyuvantes de procesamiento, humedad y sulfato de sodio)	Resto	Resto	Resto	Resto	Resto

Tabla F. Composiciones detergentes granuladas para ropa adicionales y sus componentes					
	Composición detergente				
Componente	**36f**	**36g**	**36h**	**36i**	**36j**
Tensioactivos					
C_{10} No iónico	0,1142	0,2894	0,1885	0,1846	0,1885
Alquilsulfato C_{16-17} ramificado					
Alquilsulfato C_{12-14}					
Alquilbencenosulfonato de sodio lineal con longitud de cadena	12,94	15,69	9,01	8,42	9,51

Tabla F. Composiciones detergentes granuladas para ropa adicionales y sus componentes					
	Composición detergente				
Componente	**36f**	**36g**	**36h**	**36i**	**36j**
Tensioactivos					
alifática C_{11}-C_{12}					
Alcohol etoxi-3-sulfato de sodio $C_{14/15}$					
Alquilsulfato de sodio $C_{14/15}$					
Etoxilato de alcohol $C_{12/14}$ con una media de 7 moles de etoxilación	2,9				
Etoxilato de alcohol $C_{12/14}$ con una media de 3 moles de etoxilación				2,44	
Etoxilato de alcohol $C_{14/15}$ con una media de 7 moles de etoxilación			0,97	1,17	0,97
Cloruro de mono-C_{8-10} alquilo mono-hidroxietil dimetil amonio cuaternario			0,45		
Cloruro de dimetil hidroxil etil lauril amonio		0,195			0,45
Zeolita A	2,01	0,39	1,83	2,58	0,59
Proporción de silicato de sodio 1.6			4,53	5,62	4,53
Proporción de silicato de sodio 2.0		10,1			
Proporción de silicato de sodio 2.35	7,05				
Ácido cítrico			1,4	1,84	1,0
Tripolifosfato de sodio		5,73			
Carbonato de sodio	12,65	15,93	21,0	27,31	20,2
Nonanoiloxibenceno sulfonato		1,73			
Potenciador de blanqueo a base de oxaziridinio			0,0168	0,0333	0,024
Tetrasodio S,S-etilendiaminodisuccinato					
Dietilentriamina penta (ácido metilenfosfónico), sal heptasódica			0,327		0,3272
Ácido hidroxietano dimetileno fosfónico			0,45	0,2911	0,45
Etilendiaminotetraacetato		0,28		0,1957	
$MgSO_4$		0,54	0,79	0,6494	0,793
Percarbonato de sodio			19,1	15,85	22,5
Tetraacetiletilendiamina			4,554	3,71	5,24
Perborato de sodio monohidrato		5,55			
Carboximetilcelulosa (p. ej., Finnfix BDA de CPKelco)	0,62	0,21	0,23	1,07	0,2622
Copolímero sódico de ácido acrílico/ácido maleico (70/30)	0,40	2,61	2,5	2,00	1,75
Poliacrilato de sodio (Sokalan PA30 CL)			0,0055	0,011	0,008
Polímero de tereftalato				0,231	
Copolímero de injerto aleatorio de	0,55	1,40	0,911	0,8924	0,911

Tabla F. Composiciones detergentes granuladas para ropa adicionales y sus componentes					
	Composición detergente				
Componente	**36f**	**36g**	**36h**	**36i**	**36j**
Tensioactivos					
polietilenglicol/acetato de vinilo					
Fotoblanqueador- tetrasulfonato de ftalocianina de zinc					
C.I. Abrillantador fluorescente 260	0,1174	0,048	0,1455	0,2252	0,1455
C.I. Abrillantador fluorescente 351 (Tinopal ® CBS)		0,1049			
Gránulo supresor de espuma			0,04	0,0658	0,04
Carboximetilcelulosa hidrofóbicamente modificada (Finnifix ® SH-1)					
Bentonita					
Otros (tintes, perfumes, adyuvantes de procesamiento, humedad y sulfato de sodio)	Resto	Resto	Resto	Resto	Resto

Tabla G. Composiciones detergentes granuladas para ropa adicionales y sus componentes					
	Composición detergente				
Componente	**36k**	**36l**	**36m**	**36n**	
Tensioactivos					
C_{10} No iónico	0,1979	0,1979	0,1979	0,1979	
Alquilsulfato C_{16-17} ramificado					
Alquilsulfato C_{12-14}					
Alquilbencenosulfonato de sodio lineal con longitud de cadena alifática C_{11}-C_{12}	8,92	8,92	11,5	11,5	
Alcohol etoxi-3-sulfato de sodio $C_{14/15}$	1,62	1,62	1,125	1,125	
Alquilsulfato de sodio $C_{14/15}$					
Etoxilato de alcohol $C_{14/15}$ con una media de 7 moles de etoxilación	1,0	1,0	1,5	1,5	
Cloruro de mono-C_{8-10} alquilo mono-hidroxietil dimetil amonio cuaternario					
Cloruro de dimetil hidroxil etil lauril amonio					
Zeolita A	1,63	1,63	2,0	2,0	
Proporción de silicato de sodio 1.6	4,75	4,75	4,75	4,75	
Proporción de silicato de sodio 2.0			0,06	0,06	
Proporción de silicato de sodio 2.35					
Ácido cítrico	1,10	1,10	1,1	1,1	
Tripolifosfato de sodio					

Tabla G. Composiciones detergentes granuladas para ropa adicionales y sus componentes					
	Composición detergente				
Componente	**36k**	**36l**	**36m**	**36n**	
Tensioactivos					
Carbonato de sodio	23,3	23,3	23,3	23,3	
Nonanoiloxibenceno sulfonato					
Potenciador de blanqueo a base de oxaziridinio	0,021	0,021	0,015	0,015	
Tetrasodio S,S-etilendiaminodisuccinato	0,26	0,26	0,26	0,26	
Dietilentriamina penta (ácido metilenfosfónico), sal heptasódica					
Ácido hidroxietano dimetileno fosfónico	0,47	0,47	0,47	0,47	
Etilendiaminotetraacetato					
MgSO4	0,83	0,83	0,82	0,82	
Percarbonato de sodio	19,35	19,35	19,35	19,35	
Tetraacetiletilendiamina	4,51	4,51	4,51	4,51	
Perborato de sodio monohidrato					
Carboximetilcelulosa (p. ej., Finnfix BDA de CPKelco)	1,01	1,01	1,01	1,01	
Copolímero sódico de ácido acrílico/ácido maleico (70/30)	1,84	1,84	1,84	1,84	
Poliacrilato de sodio (Sokalan PA30 CL	0,007	0,007	0,005	0,005	
Polímero de tereftalato	0,179	0,179	0,179	0,179	
Copolímero de injerto aleatorio de polietilenglicol/acetato de vinilo	0,96	0,96	0,96	0,96	
Fotoblanqueador- tetrasulfonato de ftalocianina de zinc					
C.I. Abrillantador fluorescente 260	0,153	0,153	0,171	0,171	
C.I. Abrillantador fluorescente 351 (Tinopal ® CBS)					
Gránulo supresor de espuma	0,042	0,042	0,042	0,042	
Carboximetilcelulosa hidrofóbicamente modificada (Finnifix ® SH-1					
Bentonita					
Otros (tintes, perfumes, adyuvantes de procesamiento, humedad y sulfato de sodio)	Resto	Resto	Resto	Resto	Resto
Observaciones sobre las composiciones detergentes 36 a-n de las Tablas E, F, G: Se pueden obtener ingredientes tensioactivos a través de BASF, Ludwigshafen, Alemania (Lutensol®); Shell Chemicals, Londres, Reino Unido; Stepan, Northfield, Illinois, EE. UU.; Huntsman, Huntsman, Salt Lake City, Utah, EE. UU.; Clariant, Sulzbach, Alemania (Praepagen®). La zeolita se puede obtener a través de Industrial Zeolite (UK) Ltd, Grays, Essex, Reino Unido.					

Tabla G. Composiciones detergentes granuladas para ropa adicionales y sus componentes					
	Composición detergente				
Componente	**36k**	**36l**	**36m**	**36n**	
Tensioactivos					
Se puede obtener ácido cítrico y citrato de sodio a través de Jungbunzlauer, Basilea, Suiza. Se puede obtener percarbonato de sodio, carbonato de sodio, bicarbonato de sodio y sesquicarbonato de sodio a través de Solvay, Bruselas, Bélgica. Se pueden obtener copolímeros de acrilato/maleato a través de BASF, Ludwigshafen, Alemania. Se puede obtener carboximetilcelulosa y carboximetilcelulosa hidrofóbicamente modificada a través de CPKelco, Arnhem, Países Bajos. Se puede obtener C.I. Abrillantador Fluorescente 260 a través de 3V Sigma, Bérgamo, Italia como Optiblanc® 2M/G, Optiblanc® 2MG/LT Extra, u Optiblanc® Ecobright. Se puede obtener tetrasodio S,S-etilendiaminodisuccinato a través de Innospec, Ellesmere Port, Reino Unido. El copolímero de tereftalato se puede obtener a través de Clariant con el nombre comercial Repelotex SF 2. Se puede obtener ácido 1-hidroxietano-1,1-difosfónico a través de Thermphos, Vlissingen-Oost, Países Bajos. El potenciador de blanqueo a base de oxaziridinio presenta la siguiente estructura, donde R1 = 2-butiloctilo, y ha sido producido de acuerdo con el documento US 2006/0089284A1. Las enzimas Natalase®, Termamyl®, Stainzyme Plus®, Celluclean® y Mannaway® se pueden obtener a través de Novozymes, Bagsværd, Dinamarca. Se puede obtener tetrasulfonato de ftalocianina de zinc a través de Ciba Specialty Chemicals, Basilea, Suiza, como Tinolux® BMC. Se pueden obtener gránulos supresores de espuma a través de Dow Corning, Barry, Reino Unido. El copolímero de injerto aleatorio es un copolímero de óxido de polietileno injertado con acetato de polivinilo que presenta un esqueleto de óxido de polietileno y múltiples cadenas laterales de acetato de polivinilo. El peso molecular del esqueleto de óxido de polietileno es de aproximadamente 6000, y la relación de peso del óxido de polietileno con respecto al acetato de polivinilo es de aproximadamente 40 a 60 y no más de 1 punto de injerto por 50 unidades de óxido de etileno.					

EJEMPLO 1

Ensayos y métodos de prueba

[0251] Este Ejemplo describe los diversos métodos de prueba y ensayos utilizados para el desarrollo de la presente invención. Cualquier desviación respecto a los protocolos expuestos se indica en los Ejemplos pertinentes.

[0252] Los ensayos se llevaron a cabo utilizando un robot Biomek FX (Beckman Coulter) o una pipeta multicanal (p. ej., Rainin PipetLite, Mettler-Toledo) y un lector de MTP SpectraMAX (tipo 340; dispositivos moleculares).

A. MÉTODOS DE PRUEBA

Método de prueba 1

[0253] A continuación, se expone un protocolo para definir si un material de tinte o pigmento es un agente colorante para tejidos a efectos de la invención:

1) Llenar dos recipientes medidores del grado de limpieza con 800 ml de agua de la ciudad de Newcastle upon Tyne, Reino Unido (con una dureza total de ~12 granos por galón estadounidense, ~205 ppm, suministrada por Northumbrian Water, Pity Me, Durham, Co. Durham, Reino Unido).

2) Introducir los recipientes en un medidor del grado de limpieza, con una temperatura controlada del agua a 30 °C y una agitación configurada a 40 rpm durante el transcurso del experimento.

3) Añadir 4,8 g de detergente IEC-B (detergente tipo B básico de referencia para lavadoras IEC 60456), suministrado por wfk, Bruggen-Bracht, Alemania, en cada recipiente.

4) Tras dos minutos, añadir 2,0 mg de colorante activo en el primer recipiente.

5) Tras un minuto, añadir 50 g de chaleco de algodón plano (suministrado por Warwick Equest, Consett, Condado de Durham, Reino Unido), cortado en muestras de 5 cm x 5 cm, en cada recipiente.

6) Tras 10 minutos, vaciar los recipientes y rellenar con agua fría (16 °C) que presente una dureza del agua de 14,4 grados ingleses de dureza Clark con una proporción molar de 3:1 entre calcio y magnesio.

7) Tras 2 minutos enjuagando, extraer los tejidos.

8) Repetir los pasos 3-7 durante otros tres ciclos utilizando los mismos tratamientos.

9) Recoger y tender en el interior los tejidos durante 12 horas.

10) Analizar las muestras utilizando un espectrómetro Hunter Miniscan ajustado con iluminante D65 y filtro de corte UVA, para obtener valores Hunter a (eje rojo-verde) y Hunter b (eje amarillo-azul).

11) Promediar los valores Hunter a y Hunter b para cada conjunto de tejidos. Si los tejidos tratados con el colorante analizado muestran una diferencia media de colorante superior a 0,2 unidades, ya sea en el eje a o en el eje b, se considera que es un agente colorante para tejidos a efectos de la invención.

Método de prueba 2

[0254] Para el método de prueba 2, se ejecuta el ensayo de micromuestras BMI expuesto a continuación utilizando la composición detergente granulada 10 (véase la Tabla D representada anteriormente). Se disuelve el detergente para ropa en agua que presenta una dureza de 12 gpg (205 ppm) y se ajusta a una temperatura de 16 °C, y se añade la enzima variante de proteasa de interés. El rendimiento de las enzimas variantes de proteasa se determina entonces según el ensayo de micromuestras BMI descrito. El índice de rendimiento se determina comparando el rendimiento de la enzima variante de proteasa con el de la enzima subtilisina GG36 de *B. lentus* que presenta la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 2, estando comprendida la dosis de enzimas en todos los casos entre 0,1 - 5 ppm. Las enzimas variantes de proteasa que presenten un índice de rendimiento de 1,1 o superior se consideran proteasas de agua fría.

Método de prueba 3

[0255] En el caso del método de prueba 3, se ejecuta el ensayo de micromuestras BMI expuesto a continuación utilizando la composición detergente granulada para ropa 7 (véase la Tabla D representada anteriormente). El detergente para ropa se disuelve en agua que presenta una dureza de 6 gpg (103 ppm) y se ajusta a una temperatura de 16 °C, y se añade la enzima variante de proteasa GG36 de interés. El rendimiento de las enzimas variantes de proteasa GG36 se determina entonces según el ensayo de micromuestras BMI descrito. El índice de rendimiento se determina comparando el rendimiento de la enzima variante de proteasa GG36 con el de la enzima subtilisina GG36 de *B. lentus* que presenta la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 2, estando comprendida la dosis de enzimas en todos los casos entre 0,1 - 5 ppm. Las enzimas variantes de proteasa GG36 que presenten un índice de rendimiento de 1,1 o superior se consideran proteasas de agua fría.

Método de prueba 4

[0256] En el caso del método de prueba 4, se ejecuta el ensayo de micromuestras BMI utilizando la composición detergente granulada para ropa 7 (véase la Tabla D representada anteriormente). El detergente para ropa se disuelve en agua que presenta una dureza de 6 gpg (103 ppm) y se ajusta a una temperatura de 16 °C, y se añade la enzima variante de proteasa GG36 de interés. El rendimiento de las enzimas variantes de proteasa GG36 se determina entonces según el ensayo de micromuestras BMI descrito. El índice de rendimiento se determina comparando el rendimiento de la enzima variante de proteasa GG36 con el de una enzima de referencia GG36-A158E, compuesta dicha enzima de referencia GG36-A158E por la secuencia de aminoácidos de proteasa subtilisina GG36 de *B. lentus* de la SEQ ID N.º 2 con una única sustitución de ácido glutámico por alanina en la posición 158 (esto es, la mutación A158E), estando comprendida la dosis de enzimas en todos los casos entre 0,1 - 5 ppm. Las enzimas variantes de proteasa GG36 que presenten un índice de rendimiento de 1,0 o superior se consideran proteasas de agua fría.

Método de prueba 6

[0257] En el caso del método de prueba 6, se ejecuta el ensayo de micromuestras BMI utilizando uno de los detergentes 36a - 36n en la Tabla 1-2. El detergente se disuelve en agua que presenta una dureza especificada en la Tabla 1-2 y se ajusta a una temperatura de 16 °C. El rendimiento de las enzimas variantes se determina entonces según el ensayo de micromuestras BMI descrito. El índice de rendimiento se determina comparando el rendimiento de la variante con el de la enzima de la SEQ ID N.º 2, siendo el intervalo de dosis de enzima de 0,1-5 ppm en todos los casos. Las enzimas que presenten un índice de rendimiento de 1,1 o superior se consideran proteasas de agua fría.

B. ENSAYOS

Ensayo TCA para determinar el contenido proteico en placas de microtitulación de 96 pocillos

[0258] Los cultivos de *B. subtilis* se cultivaron durante 2-3 días a 37 °C, agitando a 250-300 rpm con aireación húmeda. Se extrajeron las células del sobrenadante de cultivo con contenido enzimático mediante centrifugación y/o filtración. La concentración de proteasa/proteína/enzima se determinó utilizando un ensayo de precipitación TCA. Se transfirió una alícuota (20-25 ul) de sobrenadante de cultivo a una placa de microtitulación de fondo plano con 96 pocillos (MTP: placa transparente de poliestireno de unión al medio Costar 9017) que contenía 100 µl/pocillo de 0,25 N HCl. Se determinó la lectura "de referencia" mediante la lectura de dispersión de luz/absorbancia a 405 nm tras mezclar durante 5 segundos. Se añadieron 100 µl/pocillo de ácido tricloroacético al 30 % (p/v) (TCA) en la placa que contenía HCl y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente para facilitar la precipitación de proteínas. La dispersión de luz/absorbancia a 405 nm de esta placa "de prueba" se determinó tras mezclar durante 5 segundos. El aumento de turbidez/dispersión de luz en las muestras está correlacionado con la cantidad total de proteína precipitable en el sobrenadante de cultivo. Los cálculos se efectuaron restando la lectura "de referencia" (obtenida tras la adición de HCl) a la lectura "de prueba" (obtenida tras la adición de TCA) para proporcionar una medida relativa del total de proteína presente. Si se desea, se puede trazar una curva estándar calibrando las lecturas de TCA con ensayos de proteasa AAPF (ver más adelante) de clones con actividad específica conocida. No obstante, los resultados de TCA son lineales con respecto a la concentración de proteínas de 50 a 500 partes por millón (ppm) de proteína (donde 1 ppm corresponde a 1 mg/l) y, por lo tanto, se pueden trazar directamente en relación con el rendimiento de enzima a efectos de elegir variantes con el rendimiento deseado.

Ensayo de proteasa AAPF en placas de microtitulación con 96 pocillos

[0259] Para determinar la actividad de proteasa de las variantes de serina proteasa, se midió la hidrólisis de N-succinil-L-alanil-L-alanil-L-prolil-L-fenil-p-nitroanilida (suc-AAPF-pNA). Las soluciones de reactivo utilizadas fueron: 100 mM de Tris/HCl, pH 8.6, conteniendo 0,005 % de TWEEN®-80 (tampón de dilución Tris); 100 mM de tampón Tris, pH 8.6, conteniendo 1 mM de $CaCl_2$ y 0,005 % de TWEEN®-80 (tampón Tris/Ca); y 160 mM de suc-AAPF-pNA en DMSO (solución madre suc-AAPF-pNA) (Sigma: S-7388). Para preparar una solución funcional suc-AAPF-pNA, se añadió 1 ml de solución madre suc-AAPF-pNA a 100 ml de tampón Tris/Ca y se mezcló bien durante al menos 10 segundos. El ensayo se llevó a cabo añadiendo 10 µl de solución de proteasa diluida en cada pocillo de una MTP con 96 pocillos, e inmediatamente después se añadieron 190 µl de 1 mg/ml de solución funcional suc-AAPF-pNA. Las soluciones se mezclaron durante 5 segundos, y se leyó el cambio de absorbancia en modo cinético (25 lecturas en 5 minutos) a 405 nm en un lector de MTP a 25 °C. La actividad de proteasa se expresó como AU (actividad = $\Delta OD \cdot min^{-1}\ ml^{-1}$).

Ensayo de inhibición de eglina C

[0260] Según se ha descrito en el presente documento, se determinó la concentración de serina proteasa y la actividad específica mediante la titulación con un inhibidor denominado eglina c. La eglina c de la sanguijuela *Hirudo medicinalis* es un inhibidor de proteínas de ligado firme de subtilisinas y proteasa ASP (Heinz *et al.*, Biochemistry, 31: 8755-66 [1992]) y, por consiguiente, se puede utilizar para medir la concentración de enzima proteasa, lo cual permite, a su vez, calcular la actividad específica. El gen para eglina c se sintetizó y se expresó en *E. coli* mediante métodos habituales. Sus propiedades y potencia inhibitoria eran iguales a los de la eglina c adquirida a través de Sigma.

(i) Determinación de la concentración de una solución madre de eglina C

[0261] Una muestra de subtilisina de *Bacillus lentus* de actividad específica conocida se diluyó en 100 mM de tampón Tris, pH 8.6, conteniendo 1 mM de $CaCl_2$ y 0,005 % de TWEEN®-80 (tampón Tris/Ca), hasta una concentración apropiada para el ensayo de proteasa AAPF descrito anteriormente. También se realizaron varias diluciones de la solución madre de eglina c en el tampón Tris/Ca. Se mezcló una alícuota de cada solución diluida de eglina c con un volumen equivalente de la solución diluida de subtilisina de *Bacillus lentus*. También se mezcló una alícuota del tampón Tris/Ca solo, sin eglina c, con un volumen equivalente de la solución diluida de subtilisina de *Bacillus lentus*, con el fin de medir la actividad de subtilisina no inhibida en ausencia de eglina c. Las soluciones mezcladas se incubaron a temperatura ambiente durante 15-30 minutos y la actividad de proteasa de cada muestra se midió a continuación mediante el ensayo AAPF descrito anteriormente. Mediante el uso de la actividad específica conocida de subtilisina de *Bacillus lentus*, se determinó la concentración de proteasa activa en cada muestra. La concentración de eglina c en cada muestra se calculó a continuación en función de la disminución de la actividad de proteasa observada en comparación con la muestra de subtilisina no inhibida que se mezcló con tampón Tris/Ca solo (sin eglina c). Por consiguiente, al utilizar las diluciones y volúmenes conocidos de las soluciones de eglina c, se determinó la concentración de eglina c en la solución madre.

(ii) Determinación de la concentración y la actividad específica de variantes de subtilisina

[0262] Se diluyeron muestras de variantes de subtilisina en 100 mM de tampón Tris, pH 8.6, conteniendo 1 mM de $CaCl_2$ y 0,005 % de TWEEN®-80 (tampón Tris/Ca). Se realizaron también varias diluciones de la solución madre de eglina c de concentración conocida en el tampón Tris/Ca. Se mezcló una alícuota de cada solución diluida de eglina c con un volumen equivalente de una solución de variante de subtilisina. Las soluciones mezcladas se incubaron a temperatura ambiente durante 15-30 minutos, y a continuación se midió la actividad

de proteasa de cada muestra mediante el ensayo AAPF. Al utilizar la disminución observada de la actividad de proteasa tras la adición de cada muestra de eglina c y la concentración conocida de la eglina c, se calculó la concentración de la eglina c necesaria para la inhibición completa de cada variante de enzima subtilisina. Esta concentración es equivalente a la concentración de enzima en la muestra. También se mezcló una alícuota del tampón Tris/Ca solo, sin eglina c, con cada muestra de variante de subtilisina, y se midió la actividad de proteasa en ausencia de eglina c mediante el ensayo AAPF. La actividad específica de las variantes de subtilisina se calculó a continuación utilizando las concentraciones de enzimas según lo determinado anteriormente.

Ensayo de micromuestras BMI (ensayo BMI)

[0263] Las micromuestras manchadas de sangre, leche y tinta (BMI, por sus siglas en inglés) prelavadas y perforadas (EMPA116) con un diámetro circular de 5,5 milímetros en placas de microtitulación con 96 pocillos (MTP: Corning 3641) se obtuvieron a través del Center for Testmaterials BV (Vlaardingen, Países Bajos).

[0264] Los detergentes 7-11 y 36a-n (Tablas D-G) se prepararon mezclándolos durante al menos 30 minutos en 2 mM de carbonato de sodio, tamponado a un pH de 10.3 con el nivel apropiado de dureza del agua (3:1 Ca:Mg. - $CaCl_2$: $MgCl_2 \cdot 6H_2O$) en agua Milli-Q, como se describe en la Tabla 1-1 y en la Tabla 1-2. Los detergentes se alicuotaron en tubos cónicos de 50 ml (Falcon), se centrifugaron para extraer el precipitado, y se enfriaron sobre hielo durante 30 minutos antes de su uso.

[0265] Las concentraciones de enzimas se igualaron hasta una concentración fija deseada en el intervalo de 20-50 ppm en relación con un estándar de GG36 purificada. Se utilizó la actividad específica de GG36 utilizando AAPF como sustrato para convertir los valores de referencia de TCA restados en la concentración de enzimas en ppm. Una vez determinada la concentración de enzimas en ppm, se utilizó una simple fórmula para calcular el volumen de cada variante necesario para añadirse a un volumen fijo de tampón (300-600 µl) con el fin de lograr la concentración de enzimas deseada de la solución madre:

$$x = (\text{ppm objetivo})(v_b)/(y\text{-ppm objetivo})$$

Donde x = volumen de enzimas, y = concentración de enzimas, v_b = volumen de tampón

[0266] Se utilizó un robot Perkin-Elmer Janus con un brazo de 8 canales Versispan para dispensar volúmenes variables de enzima desde la placa original (placa de pocillos Axygen de media profundidad con variantes combinadas recolectadas utilizadas en el ensayo de concentración de enzimas TCA) a la placa de destino llena de tampón utilizando extremos conductores. Se mezclaron las muestras tres veces pipeteando hacia arriba y hacia abajo. La precisión de las diluciones de enzimas se validó midiendo la actividad de AAPF de la placa igualada y comparándola con la de la placa original, con el fin de verificar que se habían realizado las diluciones correctas.

[0267] Tras la equiparación, se añadieron 5-15 µl de solución enzimática a una placa de micromuestras BMI llena de detergente hasta alcanzar un volumen final de -200 µl. En algunos casos, las muestras de enzimas no se igualaron, sino que, por el contrario, se diluyeron todas por igual desde la placa de la solución madre para dar lugar a un intervalo funcional de 0,1-5 ppm. Las concentraciones objetivo óptimas para cada ensayo se determinaron a partir de una curva de respuesta a la dosis que medía la actividad de limpieza en este intervalo para un detergente determinado.

[0268] La MTP se selló con una lámina (Bio-Rad) y se incubó en una incubadora/agitador iEMS (Thermo/Labsystems) preconfigurada a 16 °C en una cámara frigorífica establecida a 4 °C o a 32 °C en la parte superior de la mesa durante 30 minutos a 1400 rpm. Tras la incubación, se transfirieron 120 µl de sobrenadante a una nueva MTP (Corning 9017) y se leyeron a 600 nm utilizando el lector SpectraMax. Las lecturas de observancia real se obtuvieron restando un control en blanco (sin enzimas) a cada valor.

[0269] Se calculó un índice de rendimiento (IR) para cada muestra. El índice de rendimiento es la proporción de la absorbancia del sobrenadante producida por la limpieza con la variante de enzima con respecto a la absorbancia producida por la limpieza con GG36 con una concentración de enzimas fija. Para las placas igualadas, se calcularon los valores de IR dividiendo la absorbancia de una variante entre la del control sobre una placa determinada. Para placas no igualadas, se generó una curva estándar (p. ej., ajuste de modelo de regresión logística no lineal de cuatro parámetros o de Langmuir) a partir de la actividad y la concentración enzimática de los controles. Al utilizar esta curva estándar, el rendimiento de las variantes se puede comparar directamente con el control en cualquier concentración enzimática. El IR se determina dividiendo la absorbancia de las variantes entre la absorbancia calculada para el control en la misma concentración enzimática.

[0270] Un índice de rendimiento (IR) que sea superior a 1 (IR>1) indica una mejor limpieza mediante una variante en comparación con la estándar (p. ej., GG36), mientras que un IR de 1 (IR=1) identifica una variante que presenta el mismo rendimiento que la estándar, y un IR que sea inferior a 1 (IR<1) identifica una variante que tenga un peor rendimiento que la estándar.

TABLA 1-1: Detergente, dureza del agua y concentraciones de tampón finales empleados para ensayos de micromuestras BMI			
Composición detergente	**Concentración final de detergente (g/l)**	**Dureza final del agua* (gpg)**	**Concentración final de tampón de carbonato de sodio (mM)**
7	0,808	6	2
8	1	3	2
9	2,3	12	2
10	5,9	12	2
11	8,3	12	2
* (3:1 Ca:Mg) Concentración indicada en el texto.			

TABLA 1-2: Detergente, dureza del agua y concentraciones de tampón finales empleados para ensayos de micromuestras BMI			
Composición detergente	**Concentración final de detergente (g/l)**	**Dureza final del agua* (gpg)**	**Concentración final de tampón de carbonato de sodio (mM)**
36a	0,75	6	2
36b	0,808	6	2
36c	0,808	6	2
36d	2,25	12	2
36e	1	3	2
36f	1,2	12	2
36g	3,96	12	2
36h	7,69	20	2
36i	5	10	2
36j	7,69	20	2
36k	7,69	20	2
36l	6,15	10	2
36m	7,69	20	2
36n	6,15	20	2
* (3:1 Ca:Mg) Concentración indicada en el texto			

Ensayo de estabilidad LAS/EDTA

[0271] La estabilidad de variantes de proteasa en presencia de un tensioactivo aniónico representativo (LAS = sulfonato de alquilbenceno lineal, dodecilbencenosulfonato de sodio-DOBS) y EDTA disódico se mide tras la incubación en condiciones definidas, y la actividad residual se determina utilizando el ensayo AAPF anteriormente descrito. Los reactivos empleados fueron dodecilbencenosulfonato, sal sódica (DOBS; Sigma n.º D-2525), TWEEN®-80 (Sigma n.º P-8074), EDTA disódico (Siegfried Handel n.º 164599-02), HEPES (Sigma n.º H-7523), tampón sin estrés: 50 mM de HEPES (11,9 g/l) + 0,005 % de TWEEN®-80, pH 8.0, tampón con estrés: 50 mM de HEPES (11,9 g/l), 0,1 % (p/v) DOBS (1 g/l), 10 mM de EDTA (3,36 g/l), pH 8.0, sobrenadantes de cultivo de la proteasa de referencia y la variante de proteasa, conteniendo 200 - 400 µg/ml de proteína. El equipo utilizado son MTP con fondo en forma de V o U como placas de dilución (Greiner 651101 y 650161 respectivamente), MTP con fondo en forma de F (Corning 9017) para tampón sin estrés y LAS/EDTA, así como para placas de suc-AAPF-pNA, Biomek FX (Beckman Coulter), lector de MTP Spectramax Plus 384 (Molecular Devices), e incubadora/agitador iEMS (Thermo/Labsystems).

[0272] La incubadora/agitador iEMS (Thermo/Labsystems) se configura a 29 °C. Los sobrenadantes de cultivo se diluyeron en placas que contenían tampón sin estrés hasta una concentración de ~ 25 ppm (placa de dilución maestra). Para el ensayo, se añadieron 20 µl de muestra de la placa de dilución maestra a placas que contenían 180 µl de tampón sin estrés para proporcionar una concentración de incubación final de 2,5 ppm. Los contenidos se mezclaron y se mantuvieron a temperatura ambiente, y el ensayo AAPF se llevó a cabo sobre esta placa. Además, se añadieron también 20 µl de muestra de la placa de dilución maestra a placas que contenían 180 µl de tampón con estrés (50 mM de HEPES (11,9 g/l), 0,1 % (p/v) de DOBS (1 g/l), 10 mM de EDTA (3,36 g/l), pH

8.0). Las soluciones se mezclaron e inmediatamente se colocaron en un agitador iEMS a 29 °C durante 30 min a 400 rpm. Tras 30 minutos de incubación, se lleva a cabo el ensayo AAPF sobre la placa con estrés. La estabilidad de las muestras se determina calculando la proporción de la actividad de AAPF residual e inicial de la siguiente manera: Actividad residual (%) = [mDO.min-1 con estrés]*100/ [mDO.min-1 sin estrés].

[0273] Las concentraciones finales de detergente, dureza del agua y tampón se determinaron en función del sistema de ensayo que se va a utilizar (p. ej., condiciones de Norteamérica, Japón, Europa Occidental o Europa Central). En algunas formas de realización, el rendimiento de eliminación de manchas de las variantes de proteasa se determina en detergentes disponibles comercialmente. La inactivación por calor de fórmulas de detergente comerciales sirve para destruir la actividad enzimática de cualquier componente proteico al mismo tiempo que se preservan las propiedades de componentes no enzimáticos. Por consiguiente, este método resulta adecuado para preparar detergentes adquiridos comercialmente para su uso en pruebas de las variantes de enzimas de la presente invención.

Ensayo de microtitulación con huevo cocido

[0274] Para este ensayo, se prepararon placas de 96 pocillos con sustrato de yema de huevo cocido de yemas de huevo de gallina. Las yemas de huevo de gallina se separan de las claras, se liberan del saco de membrana, y se diluyen un 20 % (vol./peso) con agua Milli-Q. La yema diluida se remueve durante 15 min a temperatura ambiente utilizando un agitador magnético. Se pipetean con cuidado cinco µl en el centro de cada pocillo de una placa de 96 pocillos con fondo en forma de V (Costar #3894) utilizando una pipeta de 8 canales. Las placas se hornean a 90 °C durante 1 hora y se enfrían a temperatura ambiente. Las placas con sustrato de yema de huevo horneada se almacenan a temperatura ambiente y se utilizan en el plazo de una semana desde la preparación. Los detergentes para lavavajillas automático se preparan conforme a lo descrito en el presente documento y se precalientan hasta 50 °C. Se añade una alícuota de detergente de 190 µl a cada pocillo de la placa de 96 pocillos utilizando una pipeta de 8 canales. Se añaden diez µl de enzima diluida en cada pocillo utilizando un dispositivo de pipeteo de 96 canales. La placa se sella con cuidado con una lámina selladora adhesiva y se incuba a 50 °C agitando durante 30 min. Se transfieren 120 µl de la mezcla de reacción a una nueva placa de 96 pocillos con fondo plano, y se determina la absorbancia/dispersión de luz a 405 nm. La absorbancia/dispersión de luz a 405 nm es proporcional a la eliminación de yema de huevo.

Ensayo de micromuestras de yema de huevo ("Ensayo de microplacas CS-38"; o "EGG" o "Dish")

[0275] Se preparan detergentes para lavavajillas automático conforme a lo descrito en el presente documento. El equipo utilizado incluía un agitador/incubadora New Brunswick Innova 4230 y un lector de MTP SpectraMAX (tipo 340). Las MTP se obtienen a través de Costar (tipo 9017). Se obtiene yema de huevo envejecido con muestras de pigmento (CS-38) del Center for Test Materials (Vlaardingen, Países Bajos). Antes de cortar micromuestras circulares de 0,25 pulgadas, el tejido se lava con agua. Se coloca una micromuestra en cada pocillo de una placa de microtitulación con 96 pocillos. El detergente de ensayo se equilibra a 50 °C. Se añaden 190 µl de solución detergente en cada pocillo de la MTP, conteniendo micromuestras. A esta mezcla, se le añaden 10 µl de la solución enzimática diluida. La MTP se sella con una lámina adhesiva y se coloca en la incubadora durante 30 minutos, con agitación. Tras la incubación, se transfieren 100 µl de la solución desde cada pocillo a una nueva MTP. Esta MTP se lee a 405 nm utilizando un lector de MTP SpectraMax. También se incluyen controles en blanco, así como controles que contenían micromuestras y detergente, pero no enzima.

[0276] En algunas formas de realización, se pueden utilizar micromuestras prelavadas. Este tipo de micromuestra se prelava en agua desionizada durante 20 minutos a temperatura ambiente. Tras la etapa de prelavado, las muestras se colocan sobre papel absorbente para secarlas. Las muestras secadas al aire se perforan a continuación utilizando un troquel circular de ¼" en una prensa de expulsión. Por último, se colocan verticalmente dos micromuestras en cada pocillo de una MTP con 96 pocillos para exponer la superficie completa (esto es, no plana en la parte inferior del pocillo).

[0277] Las muestras de variantes de proteasa que se van a analizar se obtienen a partir de caldo de cultivo filtrado de cultivos cultivados en placas MTP. El equipo utilizado es un robot Biomek FX (Beckman Coulter), un lector de MTP SpectraMAX (tipo 340; dispositivos moleculares), una incubadora/agitador iEMS (Thermo/Labsystems); MTP con fondo en forma de F (de tipo Costar 9017 para leer placas de reacción tras la incubación); y MTP con fondo en forma de V (Greiner 651101 utilizadas para la predilución de sobrenadante). En este ensayo, las proteasas hidrolizan el sustrato y liberan partículas insolubles y de pigmento del sustrato. Por consiguiente, la proporción de turbidez es una medida de actividad enzimática.

[0278] El rendimiento de eliminación de manchas de serina proteasas de referencia y variantes de estas en micromuestras se determina en una escala MTP en detergente comercializado (Calgonit 5 en 1). Las micromuestras CS-38 (yema de huevo con pigmento, envejecido por calor) obtenidas a través de CFT Vlaardingen se utilizan como sustrato. Se utilizan dos muestras por pocillo. Las pastillas de ADW de Calgonit 5 en 1 se utilizan para preparar la solución detergente. Para inactivar la actividad de proteasa presente en las pastillas, se disuelve una pastilla de 21 g en agua Milli-Q calentada en un baño de agua hasta una temperatura de 60 °C. La solución se enfría hasta la temperatura ambiente y se ajusta el volumen de agua a 700 ml. La solución se diluye además con agua para lograr una concentración final de 3 g/l. La dureza del agua se ajusta a

21 °GH añadiendo 1,46 ml de la mezcla de Ca/Mg (mezcla de Ca/Mg [(3:1), 1,92 M de $CaCl_2$ = 282,3 g/l $CaCl_2.2H_20$; 0,64 M de $MgCl_2$ = 130,1 g/l $MgCl_2.6H_2O$), 15 000 gpg]. Las muestras de enzimas se diluyen previamente en una solución de 10 mM de NaCl, 0,1 mM de $CaCl_2$, 0,005 % de TWEEN®-80 y se analizan en concentraciones apropiadas.

[0279] La incubadora se configura a la temperatura deseada de 50 °C. Se añaden 72 µl de tampón de dilución a la placa vacía con fondo en forma de V (esto es, una "placa de dilución") y a continuación 8 µl de sobrenadante. Se añaden 9 µl de la placa de dilución a placas que contenían las micromuestras incubadas en 171 µl de solución detergente. Se añaden 9 µl de la placa de dilución a placas que contenían las micromuestras para proporcionar una dilución total de sobrenadante de 200X. La placa de micromuestras (con detergente y enzima) se cubre con cinta y se coloca en la incubadora/agitador durante 30 minutos a 1400 rpm. Tras la incubación, se transfieren 75 µl de la mezcla de reacción a una placa vacía con fondo en forma de F, y se lee la absorbancia en un lector de MTP a 405 nm tras eliminar las burbujas con un secador de pelo. En el ensayo se incluyen también controles en blanco que contenían una o dos micromuestras y detergente sin la adición de la proteasa de referencia que contenía muestras.

[0280] Se corrige el valor de absorbancia obtenido para el valor en blanco (sustrato sin enzima), ofreciendo una medida de actividad hidrolítica. Se calcula el índice de rendimiento para cada muestra (variante). El índice de rendimiento compara el rendimiento de la variante de enzima (valor real) y la enzima estándar (valor teórico) en la misma concentración de proteínas. Además, se pueden calcular los valores teóricos utilizando los parámetros de la ecuación de Langmuir de la enzima estándar.

Manchas de yema de huevo sobre acero inoxidable

[0281] Las láminas de acero inoxidable (10 x 15 cm; cepilladas en una cara) utilizadas en estos experimentos se lavan minuciosamente a 95 °C en un lavavajillas de laboratorio con un detergente comercial de alta alcalinidad (p. ej., detergente ECOLAB®; Henkel) para proporcionar láminas limpias y libres de grasa. Estas láminas se desbarban antes de su primer uso. Las láminas se secan durante 30 minutos a 80 °C en un armario térmico antes de mancharlas con yema de huevo. Las superficies que se deben cepillar no se tocan antes de ensuciarlas. Del mismo modo, no se permiten manchas de agua ni pelusas en las superficies. Las láminas enfriadas se pesan antes de mancharlas.

[0282] Las yemas de huevo se preparan separando las yemas de aproximadamente 10-11 huevos (200 g de yema de huevo) de las claras. Las yemas se remueven con un tenedor en un vaso de precipitado de cristal para homogeneizar la suspensión de yema. A continuación, las yemas se cuelan (con una malla de aproximadamente 0,5 mm) para eliminar las partículas gruesas y cualquier fragmento de cáscara de huevo.

[0283] Se utiliza un pincel plano (2,5") para aplicar 1,0 ± 0,1 g de suspensión de yema de huevo tan uniformemente como sea posible sobre un área de 140 cm^2 sobre las caras cepilladas de cada una de las láminas de acero inoxidable, dejando un borde sin manchar de aproximadamente 1 cm de ancho (se utiliza cinta adhesiva en caso de que sea necesario). Las láminas manchadas se secan horizontalmente (para impedir la formación de gotitas en los bordes de las láminas), a temperatura ambiente durante 4 horas (máx. 24 h).

[0284] Para la desnaturalización, se sumergen las láminas durante 30 segundos en agua desmineralizada hirviendo (utilizando, en caso de que sea necesario, un dispositivo de sujeción). A continuación, se secan de nuevo las láminas durante 30 min a 80 °C. Tras secarlas y enfriarlas, las láminas se pesan. Tras pesarlas, las láminas se reservan durante al menos 24 horas (20 °C, 40-60 % de humedad relativa) antes de someterlas a la prueba de lavado. Para cumplir con los requisitos de ensayo, se utilizan en el ensayo únicamente láminas con 500 ± 100 mg/140 cm^2 (yema de huevo tras la desnaturalización). Tras haber llevado a cabo las pruebas de lavado, se secan las láminas durante 30 min a 80 °C, en el armario térmico, y se pesan de nuevo tras enfriarlas. El porcentaje de rendimiento de limpieza se determina dividiendo los (mg de yema de huevo liberados durante el lavado x 100) entre los (mg de yema de huevo desnaturalizada aplicada).

Carne picada sobre platos de porcelana

[0285] Para estos experimentos, se utilizan platos de postre (de porcelana blanca y vitrificada de Arzberg) ajustados al diámetro de 19 cm de EN 50242, formulario 1495, n.º 0219. Un total de 225 g de carne magra de cerdo y ternera (a partes iguales) se trocea finamente y se enfría, tras eliminar la grasa visible. La mezcla se procesa dos veces en una picadora. Se evitan temperaturas por encima de 35 °C. A continuación, se mezclan 225 g de la carne picada con 75 g de huevo (clara y yema mezcladas). Posteriormente, se congela la preparación como máximo tres meses a -18 °C, antes de su uso. Si no hay cerdo disponible, se utiliza ternera.

[0286] La mezcla de carne picada y huevo (300 g) se lleva a temperatura ambiente y se mezcla con 80 ml de agua sintética. A continuación, se homogeneiza la mezcla utilizando una batidora manual de cocina durante 2 min. Posteriormente, se emplea un tenedor para extender 3 g de la mezcla de carne picada/huevo/agua sobre cada plato de porcelana blanca, dejando un margen sin ensuciar de aproximadamente 2 cm de ancho en torno al borde. La cantidad aplicada es de 11,8 ± 0,5 mg/cm^2. Los platos se secan durante 2 horas a 120°C en un armario térmico precalentado. Una vez enfriados los platos, estos están listos para su uso. Los platos se apilan con papel absorbente entre cada uno de los platos.

[0287] Tras lavarlos, se rocían los platos con solución de ninhidrina (1 % de etanol) para identificar mejor los residuos de carne picada. Para favorecer la reacción de color, los platos se calientan durante 10 min a 80 °C en el armario térmico. La evaluación del rendimiento de lavado se lleva a cabo visualmente observando las reacciones de color de los residuos de carne picada con referencia al catálogo fotográfico de IKW (IKW).

Manchas de huevo/leche sobre acero inoxidable

[0288] Las láminas de acero inoxidable (10 x 15 cm; cepilladas en una cara) utilizadas en estos experimentos se lavan minuciosamente a 95 °C en un lavavajillas de laboratorio con un detergente comercial de alta alcalinidad para eliminar la grasa y limpiar las láminas. Las láminas se secan y se abrillantan con un paño de celulosa. Las superficies que se deben cepillar no se tocan antes de ensuciarlas. Del mismo modo, no se permiten manchas de agua ni pelusas en las superficies. Antes de mancharlas, las láminas se colocan en un armario térmico a 80 °C durante 30 min. Las láminas enfriadas se pesan antes de ensuciarlas.

[0289] Las yemas y claras de huevo de huevos crudos enteros (3-4 huevos; 160 g/huevo) se colocan en un cuenco y se baten con unas varillas. A continuación, se añaden 50 ml de leche semidesnatada UHT (1,5 % de grasa, temperatura ultra alta, homogeneizada) a la mezcla. La leche y el huevo se mezclan sin generar espuma. Se utiliza un pincel plano para distribuir uniformemente 1,0 ± 0,1 g de la mezcla de huevo/leche sobre la cara cepillada de las láminas de acero inoxidable, empleando una balanza para comprobar la distribución. Se deja un margen de aproximadamente 1,0 cm en torno a los lados cortos de las láminas. Las láminas manchadas se secan horizontalmente (para impedir la formación de gotitas en los bordes de las láminas), a temperatura ambiente durante 4 horas (máx. 24 h).

[0290] A continuación, se sumergen las láminas durante 30 segundos en agua desmineralizada hirviendo (utilizando, en caso de que sea necesario, un dispositivo de sujeción). A continuación, se secan de nuevo las láminas durante 30 min a 80 °C. Tras secarlas y enfriarlas, las láminas se pesan. Tras pesarlas, las láminas se reservan durante al menos 24 horas (20 °C, 40-60 % de humedad relativa) antes de someterlas a la prueba de lavado. Para cumplir con los requisitos de ensayo, se utilizan únicamente láminas con 190 ± 10 mg de yema de huevo.

[0291] Tras haber llevado a cabo las pruebas de lavado, se secan las láminas durante 30 min a 80 °C, en el armario térmico, y se pesan de nuevo tras enfriarlas. El porcentaje de rendimiento de limpieza se determina dividiendo los (mg de huevo/leche liberados durante el lavado x 100) entre los (mg de huevo/leche aplicados).

Preparación de la mancha de mezcla de espaguetis sobre platos de porcelana

[0292] Se mezcla salsa para pasta (390 g) con 150 g de pasta de espaguetis hervidos, 25 g de carne picada (composición IKW mejorada: una combinación de 225 gramos de carne picada sin grasa y 75 gramos de yema de huevo) y 50 g de queso Grozette Formaggio. Se utiliza una cuchara para extender 3 g de esta mezcla sobre cada plato de porcelana blanca (porcelana blanca y vitrificada de Arzberg de 19 cm de diámetro, conforme a EN 50242, formulario 1495, n.º 0219) dejando un margen sin manchar de aproximadamente 2 cm de ancho en torno al borde. Los platos se secan horneándolos durante 2 horas a 120 °C en un horno. Una vez enfriados los platos, estos quedan listos para su uso. Los platos se apilan con papel absorbente entre cada uno de los platos para su almacenamiento. Tras lavarlos, los platos se rocían con solución de yodo (0,05 N) para identificar mejor los residuos de carbohidratos. La evaluación del rendimiento de lavado se lleva a cabo visualmente observando las reacciones de color de los residuos de carbohidratos con referencia al catálogo fotográfico de IKW (IKW) y se valora en una escala de 0-10 (siendo 10 limpio).

Índice de rendimiento

[0293] El índice de rendimiento compara el rendimiento de la variante de enzima (valor medido) y la enzima estándar (valor teórico) en la misma concentración de proteínas. Además, se pueden calcular los valores teóricos de la proteasa estándar utilizando los parámetros de una curva de rendimiento de respuesta a la dosis.

EJEMPLO 2

Generación de mutantes únicas de GG36 utilizando bibliotecas de evaluación de sitio (SEL)

[0294] La construcción de SEL de GG36 descritas en este ejemplo se llevó a cabo a través de GENEART utilizando sus propios métodos y plataforma tecnológica para la optimización genética, la síntesis genética, y la generación y análisis de bibliotecas (WO 2004/059556A3, las patentes europeas con n.º 0 200 362 y 0 201 184; y las patentes estadounidenses n.ºs 4,683,195, 4,683,202 y 6,472,184). Las SEL de GG36 se produjeron en posiciones preseleccionadas por los inventores utilizando el plásmido de expresión de *B. subtilis* pHPLT-GG36 (véase la figura 2). Este plásmido de expresión de *B. subtilis* contiene el casete de expresión de GG36 que se muestra más adelante, el promotor LAT de *B. licheniformis* (Plat), y elementos adicionales de pUB110 (McKenzie *et al.*, Plasmid, 15:93-103, 1986), incluidos un gen de replicasa (reppUB), un gen de resistencia a la neomicina/kanamicina (neo) y un marcador de resistencia a la bleomicina (bleo) (figura 4 de la patente estadounidense n.º 6,566,112). El mapa del plásmido pHPLT-GG36 se proporciona en la figura 2. La secuencia del casete de expresión de GG36 se expone más adelante.

[0295] La secuencia de ADN de GG36 (la secuencia señal se muestra en letras minúsculas, la secuencia propeptídica en texto subrayado y en minúsculas, y la secuencia madura de GG36 en letras mayúsculas) se expone a continuación:

Gtgagaagcaaaaaattgtggatcgtcgcgtcgaccgcactactcatttctgttgctttcagttcatcgatcgcatcggctgctgaagaagcaaaagaaaa
atatttaattggctttaatgagcaggaagctgtcagtgagtttgtagaacaagtagaggcaaatgacgaggtcgccattctctctgaggaagaggaagtcg
aaattgaattgcttcatgaatttgaaacgattcctgttttatccgttgagttaagcccagaagatgtggacgcgcttgagctcgatccagcgatttcttatattg
aagaggatgcagaagtaacgacaatgGCGCAATCAGTGCCATGGGGAATTAGCCGTGTGCAAGCCCCAGC
TGCCCATAACCGTGGATTGACAGGTTCTGGTGTAAAAGTTGCTGTCCTCGATACAGGTATTT
CCACTCATCCAGACTTAAATATTCGTGGTGGCGCTAGCTTTGTACCAGGGGAACCATCCACT
CAAGATGGGAATGGGCATGGCACGCATGTGGCCGGGACGATTGCTGCTTTAAACAATTCGA
TTGGCGTTCTTGGCGTAGCGCCGAGCGCGGAACTATACGCTGTTAAAGTATTAGGGGCGAG
CGGTTCAGGTTCGGTCAGCTCGATTGCCCAAGGATTGGAATGGGCAGGGAACAATGGCATG
CACGTTGCTAATTTGAGTTTAGGAAGCCCTTCGCCAAGTGCCACACTTGAGCAAGCTGTTAA
TAGCGCGACTTCTAGAGGCGTTCTTGTTGTAGCGGCATCTGGAAATTCAGGTGCAGGCTCAA
TCAGCTATCCGGCCCGTTATGCGAACGCAATGGCAGTCGGAGCTACTGACCAAAACAACAA
CCGCGCCAGCTTTTCACAGTATGGCGCAGGGCTTGACATTGTCGCACCAGGTGTAAACGTGC
AGAGCACATACCCAGGTTCAACGTATGCCAGCTTAAACGGTACATCGATGGCTACTCCTCAT
GTTGCAGGTGCAGCAGCCCTTGTTAAACAAAAGAACCCATCTTGGTCCAATGTACAAATCCG
CAATCATCTAAAGAATACGGCAACGAGCTTAGGAAGCACGAACTTGTATGGAAGCGGACTT
GTCAATGCAGAAGCTGCAACTCGTTAA (SEQ ID NO:3)

[0296] La secuencia proteica de GG36 (la secuencia señal se muestra en letras minúsculas, la secuencia propeptídica en texto subrayado y en minúsculas, y la secuencia de proteasa madura de GG36 en letras mayúsculas) se expone a continuación:

vrskklwivastallisvafsssiasaaeeakekyligfneqeavsefveqveandevailseeeeveiellhefetipvlsvelspedvdaleldpaisy
ieedaevttmAQSVPWGISRVQAPAAHNRGLTGSGVKVAVLDTGISTHPDLNIRGGASFVPGEPSTQD
GNGHGTHVAGTIAALNNSIGVLGVAPSAELYAVKVLGASGSGSVSSIAQGLEWAGNNGMHVA
NLSLGSPSPSATLEQAVNSATSRGVLVVAASGNSGAGSISYPARYANAMAVGATDQNNNRASFS
QYGAGLDIVAPGVNVQSTYPGSTYASLNGTSMATPHVAGAAALVKQKNPSWSNVQIRNHLKN
TATSLGSTNLYGSGLVNAEAATR (SEQ ID NO:4).

[0297] El método de mutagénesis se basó en el enfoque de mutación específica del codón, en el cual todas las posibles sustituciones de aminoácidos se crean de manera simultánea en un codón específico de interés utilizando cebadores de mutagénesis directos e inversos que contienen un codón degenerado, NNS ((A,C,T o G), (A,C,T o G), (C o G)) en el sitio de interés. Para construir cada una de las SEL de GG36, se llevaron a cabo tres reacciones de PCR: dos reacciones de mutagénesis (PCR1 y PCR2 primarias) para introducir el codón mutado de interés en la secuencia de ADN madura de GG36 utilizando los cebadores de mutagénesis directos e inversos NNS (25-45 nucleótidos de longitud), y una tercera reacción para fusionar los dos productos de PCR de mutagénesis con el fin de construir el vector de expresión pHPLT-GG36 que presenta los codones mutados deseados en la secuencia de GG36 madura.

[0298] Las secuencias de cebadores utilizadas en este Ejemplo se indican a continuación:

Tabla 2-1. Cebadores	
Secuencia	**Nombre del cebador**
CGCGCTT**GAGCTC**GATCCAGCGATTTC (SEQ ID N.º 9)	SacI-Fw
GTCTCC**AAGCTT**TAACGAGTTGCAG (SEQ ID N.º 10)	HindIII-Rv
GCAATTC**AGATCT**TCCTTCAGGTTATGACC (SEQ ID N.º 11)	pHPLT-BglII-Fw
GCATCGA**AGATCT**GATTGCTTAACTGCTTC (SEQ ID N.º 12)	pHPLT-BglII-Rv

[0299] Se utilizó el ADN polimerasa de alta definición Phusion (n.º de catálogo F-530L de Finnzymes) para todas las PCR, y las reacciones se ejecutaron de acuerdo con los protocolos del fabricante que se suministraron junto

con la polimerasa. En concreto, para la PCR primaria 1, se utilizó 1 µl (10 µM) de cada uno del cebador pHPLT-BglII-Fw y un cebador de mutagénesis inverso NNS, y para la PCR primaria 2, se utilizó 1 µl (10 µM) de cada uno del cebador pHPLT-BglII-Rv y un cebador de mutagénesis directo NNS. Cada reacción incluía también 1 µl del molde de ADN del plásmido pHPLT-GG36 (0,1 - 1 ng/µl). Se utilizó un termociclador MJ Research PTC-200 Peltier para las PCR. Las reacciones produjeron dos fragmentos de aproximadamente 2 a 3 kb que presentaban aproximadamente 30 superposiciones de nucleótidos que rodeaban al codón GG36 de interés. Los fragmentos obtenidos se fusionaron en una tercera PCR similar a las que se han descrito anteriormente utilizando 1 µl de mezcla de reacción de PCR primaria 1, 1 µl de mezcla de reacción de PCR primaria 2 y 1 µl (10 µM) de cada uno de los cebadores directo e inverso SacI-Fw e HindIII-Rv. El fragmento lineal amplificado de 859 pb que codifica el gen variante GG36 se purificó (utilizando el kit de purificación de PCR Qiaquick de QIAGEN®) y se digirió con las enzimas de restricción *Sac*I e *Hind*IIII para crear extremos cohesivos en ambos lados del fragmento de fusión. Se purificaron también aproximadamente 50 ng del plásmido pHPLT-GG36 tras la digestión con *Sac*I e *Hind*IIII, dando como resultado un fragmento del esqueleto del vector de 3,9 kb. El fragmento de vector digerido se ligó con 50 ng del fragmento de 859 pb digerido que codificaba la variante de enzima utilizando el ADN ligasa T4 (Invitrogen) siguiendo el protocolo del fabricante para clonar extremos cohesivos. Posteriormente, la mezcla de ligación se utilizó para transformar células de *B. subtilis* (Δ*aprE, ΔnprE, oppA, Δspo*I*IE, degUHy32, ΔamyE*::[*xylR,pxylA-comK]*) según lo descrito (WO 2002/014490).

[0300] Con el fin de expresar las variantes de proteínas para análisis bioquímicos adicionales, se inocularon las cepas de *B. subtilis* que portaban los plásmidos variantes GG36 en placas de microtitulación que contenían 150 µl de medio de caldo Luria complementado con 10 µg/ml de neomicina. Se cultivaron placas durante la noche a 37 °C con agitación a 300 rpm y un 80 % de humedad utilizando tapas Enzyscreen para placas de microtitulación (Enzyscreen). Se utilizaron diez microlitros de la placa de cultivo durante la noche para inocular una nueva placa de microtitulacion que contenía 190 µl de medio MBD (un medio definido basado en MOPS) con 10 µg/ml de neomicina. El medio MBD se preparó esencialmente como se conoce en la técnica (véase, Neidhardt *et al*., J. Bacteriol., 119: 736-747 [1974]), excepto porque se omitieron NH_4Cl_2, $FeSO_4$ y $CaCl_2$ del medio base, se usaron 3 mM de K_2HPO_4 y el medio base se complementó con 60 Mm de urea, y 100 ml de una solución compuesta por 210 g/l de glucosa y 350 g/l de maltodextrina Los micronutrientes se formaron como una solución madre 100X que contenía, en un litro, 400 mg de $FeSO_4$ $7H_2O$, 100 mg de $MnSO_4$ $.H_2O$, 100 mg de $ZnSO_4$ $7H_2O$, 50 mg de $CuCl_2$ $2H_2O$, 100 mg de $CoCl_2$ $6H_2O$, 100 mg de $NaMoO_4$ $2H_2O$, 100 mg de $Na_2B_4O_7$ $10H_2O$, 10 ml de 1M de $CaCl_2$, y 10 ml de 0,5 M de citrato de sodio. Las placas de microtitulación que contenían medio MBD se cultivaron durante 68 horas a 37 °C, 300 rpm, y 80 % de humedad utilizando tapas Enzyscreen (Enzyscreen) para determinar la expresión proteica. El día siguiente, los cultivos se filtraron a través de una placa de microfiltración (0,22 µm; Millipore) y el líquido filtrado resultante se utilizó para el análisis bioquímico. Los ensayos de micromuestras TCA y BMI para las composiciones detergentes 7-11 se llevaron a cabo según lo descrito en el Ejemplo 1. Los índices de rendimiento se calcularon también según lo descrito en la descripción del ensayo BMI del Ejemplo 1, y se indican en la Tabla 2-2 en relación con GG36. En las siguientes Tablas, las composiciones detergentes ("Det.") corresponden a las que se muestran en la Tabla D expuesta anteriormente. Asimismo, según se ha indicado, la posición de aminoácido se lista de acuerdo con la numeración BPN'.

Tabla 2-2. Variantes únicas de GG36 con índices de rendimiento de al menos 0,2 en relación con GG36, ya sea en limpieza de micromuestras BMI o TCA, a 16 °C en los detergentes 7-11.

Posición de aminoácido GG36 (numeración BPN')	Residuo de tipo natural	Residuo mutante
1	A	R
2	Q	A
2	Q	R
2	Q	S
2	Q	M
2	Q	W
3	S	R
4	V	R
4	V	S
4	V	C
8	I	A
9	S	W
9	S	F
9	S	A
10	R	A
10	R	M
10	R	S
10	R	H
12	Q	F
12	Q	R
14	P	F
14	P	K
14	P	Q
15	A	R
15	A	F
16	A	S
17	H	R
17	H	F
17	H	M
18	N	R
18	N	K
20	G	R
20	G	K
20	G	F
22	T	R
22	T	Q
22	T	L
22	T	V
22	T	W
22	T	Y
22	T	A

Tabla 2-2. Variantes únicas de GG36 con índices de rendimiento de al menos 0,2 en relación con GG36, ya sea en limpieza de micromuestras BMI o TCA, a 16 °C en los detergentes 7-11.

23	G	A
23	G	S
23	G	F
24	S	R
24	S	W
24	S	H
24	S	L
24	S	Q
24	S	F
25	G	R
25	G	F
25	G	V
26	V	F
27	K	R
27	K	L
27	K	V
27	K	F
28	V	A
28	V	E
28	V	N
29	A	T
30	V	E
31	L	F
33	T	S
33	T	G
33	T	D
34	G	P
35	I	M
36	S	T
36	S	F
36	S	R
38	T	R
38	T	F
38	T	L
40	P	H
40	P	W
40	P	R
40	P	N
40	P	T
40	P	L
42	L	I
43	N	R
43	N	A
43	N	S
43	N	W

Tabla 2-2. Variantes únicas de GG36 con índices de rendimiento de al menos 0,2 en relación con GG36, ya sea en limpieza de micromuestras BMI o TCA, a 16 °C en los detergentes 7-11.

43	N	F
43	N	I
43	N	D
43	N	M
45	R	T
46	G	R
48	A	R
50	F	C
51	V	W
51	V	F
51	V	H
52	P	F
52	P	N
52	P	E
55	P	Y
57	T	R
59	Q	A
59	Q	F
59	Q	R
60	D	P
60	D	A
60	D	Q
62	N	Q
62	N	E
63	G	S
63	G	A
63	G	M
63	G	V
63	G	T
63	G	H
63	G	Q
63	G	I
63	G	D
63	G	E
63	G	P
64	H	F
64	H	T
68	V	A
68	V	C
69	A	N
69	A	T
69	A	W
69	A	P
71	T	G
72	I	C
74	A	C
75	L	R
75	L	A

Tabla 2-2. Variantes únicas de GG36 con índices de rendimiento de al menos 0,2 en relación con GG36, ya sea en limpieza de micromuestras BMI o TCA, a 16 °C en los detergentes 7-11.

75	L	E
75	L	F
78	S	R
78	S	I
78	S	N
79	I	Q
79	I	W
81	V	R
82	L	R
82	L	T
82	L	M
82	L	F
82	L	V
85	A	M
86	P	W
86	P	I
86	P	L
89	E	P
89	E	W
89	E	T
89	E	I
89	E	H
89	E	V
89	E	F
89	E	L
89	E	W
89	E	G
91	Y	F
91	Y	N
92	A	F
94	K	N
99	S	F
99	S	T
99	S	M
99	S	G
99	S	P
100	G	I
100	G	S
100	G	N
100	G	Q
101	S	N
101	S	G
101	S	T
101	S	A
101	S	D
101	S	F
101	S	D
101	S	E

Tabla 2-2. Variantes únicas de GG36 con índices de rendimiento de al menos 0,2 en relación con GG36, ya sea en limpieza de micromuestras BMI o TCA, a 16 °C en los detergentes 7-11.

101	S	P
102	G	A
102	G	N
102	G	T
102	G	E
102	G	H
103	S	N
103	S	G
103	S	D
104	V	L
104	V	I
104	V	E
104	V	D
105	S	T
105	S	Q
105	S	E
106	S	V
106	S	G
106	S	T
106	S	A
106	S	E
106	S	D
106	S	F
107	I	F
107	I	M
108	A	I
108	A	G
109	Q	M
111	L	V
111	L	I
112	E	V
112	E	L
112	E	Q
114	A	G
115	G	R
115	G	K
116	N	L
116	N	A
116	N	K
117	N	F
118	G	I
118	G	R
119	M	C
120	H	A
120	H	F
120	H	R
121	V	E
121	V	F

Tabla 2-2. Variantes únicas de GG36 con índices de rendimiento de al menos 0,2 en relación con GG36, ya sea en limpieza de micromuestras BMI o TCA, a 16 °C en los detergentes 7-11.

123	N	G
123	N	E
124	L	S
128	S	N
128	S	M
128	S	H
128	S	Q
128	S	I
128	S	F
128	S	L
128	S	D
129	P	E
132	S	A
132	S	E
138	A	G
144	S	R
147	V	L
148	L	I
158	A	E
159	G	C
159	G	E
160	S	D
166	S	E
166	S	D
167	Y	W
175	M	V
177	V	C
181	D	A
182	Q	R
183	N	D
183	N	R
183	N	I
183	N	F
183	N	M
185	N	I
185	N	E
185	N	V
186	R	H
186	R	K
188	S	R
188	S	E
188	S	D
192	Y	W
192	Y	H
194	A	V
194	A	F
194	A	E
197	D	F

Tabla 2-2. Variantes únicas de GG36 con índices de rendimiento de al menos 0,2 en relación con GG36, ya sea en limpieza de micromuestras BMI o TCA, a 16 °C en los detergentes 7-11.

198	I	L
198	I	F
203	V	E
203	V	C
208	T	S
209	Y	N
209	Y	S
209	Y	F
209	Y	T
209	Y	H
209	Y	L
209	Y	G
209	Y	E
210	P	V
210	P	R
210	P	L
211	G	R
211	G	Q
212	S	I
212	S	F
212	S	M
213	T	A
214	Y	F
215	A	F
215	A	N
215	A	H
215	A	E
215	A	D
216	S	F
216	S	A
217	L	E
217	L	N
217	L	D
218	N	P
218	N	E
218	N	D
224	T	A
224	T	G
227	V	I
230	A	E
231	A	I
231	A	C
233	L	C
234	V	F
235	K	F
236	Q	N
236	Q	F
238	N	R

Tabla 2-2. Variantes únicas de GG36 con índices de rendimiento de al menos 0,2 en relación con GG36, ya sea en limpieza de micromuestras BMI o TCA, a 16 °C en los detergentes 7-11.

238	N	K
238	N	L
239	P	R
239	P	S
239	P	R
239	P	H
239	P	N
239	P	K
239	P	T
239	P	F
239	P	G
240	S	R
241	W	R
242	S	R
242	S	L
243	N	R
243	N	F
244	V	R
246	I	S
248	N	I
248	N	V
248	N	R
249	H	R
249	H	T
250	L	I
251	K	R
251	K	S
252	N	R
252	N	F
252	N	H
252	N	I
253	T	R
253	T	F
253	T	I
254	A	C
256	S	N
258	G	R
260	T	V
260	T	I
262	L	H
262	L	D
263	Y	F
265	S	F
267	L	N
267	L	M
267	L	V
269	N	R
269	N	I

Tabla 2-2. Variantes únicas de GG36 con índices de rendimiento de al menos 0,2 en relación con GG36, ya sea en limpieza de micromuestras BMI o TCA, a 16 °C en los detergentes 7-11.		
270	A	C
271	E	T
271	E	V
271	E	L
271	E	H
271	E	F
271	E	P
271	E	A

Tabla 2-2. Variantes únicas de GG36 con índices de rendimiento de al menos 0,2 en relación con GG36, ya sea en limpieza de micromuestras BMI o TCA, a 16 °C en los detergentes 7-11.		
271	E	M
271	E	I
272	A	F
272	A	R
273	A	I
273	A	F
274	T	G

Tabla 2-3. Variantes únicas de GG36 con índices de rendimiento de al menos 1,5 en relación con la limpieza de micromuestras BMI de GG36 a 32 °C en el detergente 7.
Variante de GG36
N62E
A158E
G159E

Tabla 2-4. Variantes únicas de GG36 con índices de rendimiento de al menos 1,2 en relación con la limpieza de micromuestras BMI de GG36 a 32 °C en el detergente 10.
Variante de GG36
A1R
S78R
V244R
N269R
E271L

EJEMPLO 3

Construcción y rendimiento de limpieza de los conjuntos NHJ1 y WCE1 de variantes de GG36

[0301] El conjunto NHJ1 y WCE1 de variantes de GG36 descrito en el presente documento se construyeron en DNA 2.0, Inc., utilizando el plásmido de expresión de *B. subtilis* pHPLT-GG36 descrito anteriormente (figura 2). Las variantes se expresaron en células de *B. subtilis* (genotipo: ΔaprE, ΔnprE, amyE::xylRPxylAcomK-phleo) según lo descrito en el Ejemplo 2, y además se caracterizaron utilizando el ensayo TCA para determinar el contenido de proteínas, el ensayo de estabilidad LAS/EDTA, y el ensayo de limpieza de micromuestras BMI descrito en el Ejemplo 1. Estos resultados se muestran en las Tablas 3-1 y 3-2. En las siguientes Tablas, las composiciones detergentes ("Det.") corresponden a las que se muestran en la Tabla D expuesta anteriormente. Asimismo, según lo indicado, la posición de aminoácido se lista de acuerdo con la numeración BPN'.

TABLA 3-1. Variantes NHJ1 con índices de rendimiento de al menos 0,25 en relación con GG36 en cualquiera de entre TCA, estabilidad LAS/EDTA, o limpieza de micromuestras BMI, a 16 °C en los detergentes 7, 8 o 9.
Variante de GG36 (numeración BPN')
N062E-A158E
S103G-A158E
S128N-A158E
A016S-A158E
V104L-A158E
E089P-A158E
L111V-A158E
T022A-A158E
S101A-A158E
L148I-A158E
P129E-A158E
T022A-E089P
A016S-E089P
N062E-E089P
N062E-E271F
A158E-E271F
R186H-E271F
P129E-E271F
L111V-E271F
Y209E-E271F
A016S-E271F
S188D-E271F
T022A-E271F

TABLA 3-1. Variantes NHJ1 con índices de rendimiento de al menos 0,25 en relación con GG36 en cualquiera de entre TCA, estabilidad LAS/EDTA, o limpieza de micromuestras BMI, a 16 °C en los detergentes 7, 8 o 9.
Variante de GG36 (numeración BPN')
G159E-E271F
V104L-E271F
S101A-E271F
E089P-E271F
S128N-E271F
S103G-E271F
L148I-E271F
H249R-E271F
N062E-G159E
A016S-G159E
S128N-G159E
L148I-G159E
L111V-G159E
E089P-G159E
T022A-G159E
P129E-G159E
S103G-G159E
V104L-G159E
A158E-G159E
S101A-G159E
A158E-H249R
L111V-H249R
P129E-H249R

TABLA 3-1. Variantes NHJ1 con índices de rendimiento de al menos 0,25 en relación con GG36 en cualquiera de entre TCA, estabilidad LAS/EDTA, o limpieza de micromuestras BMI, a 16 °C en los detergentes 7, 8 o 9.
Variante de GG36 (numeración BPN')
N062E-H249R
A016S-H249R
R186H-H249R
L148I-H249R
G159E-H249R
S101A-H249R
S188D-H249R
V104L-H249R
Y209E-H249R
T022A-H249R
S128N-H249R
S103G-H249R
E089P-H249R
T022A-L111V
S101A-L111V
A016S-L111V
V104L-L111V
N062E-L111V
S103G-L111V
E089P-L111V
A016S-L148I
N062E-L148I
T022A-L148I
P129E-L148I
V104L-L148I
S103G-L148I
S128N-L148I
S101A-L148I
E089P-L148I
L111V-L148I
A016S-N062E
T022A-N062E
N062E-P129E
T022A-P129E
S128N-P129E
A016S-P129E
S101A-P129E
V104L-P129E
E089P-P129E
S103G-P129E
L111V-P129E
N062E-R186H
S128N-R186H
S101A-R186H
T022A-R186H

TABLA 3-1. Variantes NHJ1 con índices de rendimiento de al menos 0,25 en relación con GG36 en cualquiera de entre TCA, estabilidad LAS/EDTA, o limpieza de micromuestras BMI, a 16 °C en los detergentes 7, 8 o 9.
Variante de GG36 (numeración BPN')
A016S-R186H
A158E-R186H
E089P-R186H
P129E-R186H
G159E-R186H
S103G-R186H
V104L-R186H
L111V-R186H
L148I-R186H
N062E-S101A
T022A-S101A
A016S-S101A
E089P-S101A
N062E-S103G
T022A-S103G
A016S-S103G
S101A-S103G
E089P-S103G
N062E-S128N
A016S-S128N
T022A-S128N
S101A-S128N
V104L-S128N
E089P-S128N
S103G-S128N
L111V-S128N
L111V-S188D
N062E-S188D
A016S-S188D
L148I-S188D
T022A-S188D
S128N-S188D
S101A-S188D
V104L-S188D
E089P-S188D
P129E-S188D
G159E-S188D
R186H-S188D
S103G-S188D
A158E-S188D
A016S-T022A
A016S-V104L
T022A-V104L
S101A-V104L
N062E-V104L

TABLA 3-1. Variantes NHJ1 con índices de rendimiento de al menos 0,25 en relación con GG36 en cualquiera de entre TCA, estabilidad LAS/EDTA, o limpieza de micromuestras BMI, a 16 °C en los detergentes 7, 8 o 9.
Variante de GG36 (numeración BPN')
S103G-V104L
E089P-V104L
G159E-Y209E
L111V-Y209E
S101A-Y209E
A016S-Y209E
S128N-Y209E
L148I-Y209E
P129E-Y209E
N062E-Y209E

TABLA 3-1. Variantes NHJ1 con índices de rendimiento de al menos 0,25 en relación con GG36 en cualquiera de entre TCA, estabilidad LAS/EDTA, o limpieza de micromuestras BMI, a 16 °C en los detergentes 7, 8 o 9.
Variante de GG36 (numeración BPN')
T022A-Y209E
S103G-Y209E
A158E-Y209E
S188D-Y209E
V104L-Y209E
E089P-Y209E
R186H-Y209E
GG36

TABLA 3-2. Variantes WCE1 con índices de rendimiento de al menos 0,2 en relación con GG36 en cualquiera de entre TCA, estabilidad LAS/EDTA o limpieza de micromuestras BMI, a 16 °C en los detergentes 10 u 11.
Variante de GG36 (numeración BPN')
N018R-W241R
G020R-W241R
S024R-W241R
S009A-W241R
G020R-W241R
V004R-W241R
N043R-W241R
S078R-W241R
T022R-W241R
G115R-W241R
A001R-W241R
S212F-W241R
L082R-W241R
N018R-V244R
S024R-V244R
S078R-V244R
G020R-V244R
S212F-V244R
S009A-V244R
L082R-V244R
A001R-V244R
N043R-V244R
T022R-V244R
V004R-V244R
G115R-V244R
W241R-V244R

TABLA 3-2. Variantes WCE1 con índices de rendimiento de al menos 0,2 en relación con GG36 en cualquiera de entre TCA, estabilidad LAS/EDTA o limpieza de micromuestras BMI, a 16 °C en los detergentes 10 u 11.
Variante de GG36 (numeración BPN')
S242R-V244R
A001R-V004R
S009A-T022R
N018R-T022R
G020R-T022R
V004R-T022R
A001R-T022R
S024R-S242R
N018R-S242R
V004R-S242R
G020R-S242R
S212F-S242R
L082R-S242R
S078R-S242R
A001R-S242R
S009A-S242R
T022R-S242R
G115R-S242R
N043R-S242R
W241R-S242R
N018R-S212F
T022R-S212F
V004R-S212F
S024R-S212F
A001R-S212F
G115R-S212F
G020R-S212F
S009A-S212F
N043R-S212F
S078R-S212F
L082R-S212F
S009A-S078R
G020R-S078R
S024R-S078R
T022R-S078R
N018R-S078R
V004R-S078R
A001R-S078R
N043R-S078R

TABLA 3-2. Variantes WCE1 con índices de rendimiento de al menos 0,2 en relación con GG36 en cualquiera de entre TCA, estabilidad LAS/EDTA o limpieza de micromuestras BMI, a 16 °C en los detergentes 10 u 11.
Variante de GG36 (numeración BPN')
T022R-S024R
G020R-S024R
N018R-S024R
A001R-S024R
V004R-S024R
S009A-S024R
V004R-S009A
A001R-S009A
S242R-N269R
S024R-N269R
G020R-N269R
T022R-N269R
H249R-N269R
S212F-N269R
N043R-N269R
V244R-N269R
A001R-N269R
N018R-N269R
S078R-N269R
S009A-N269R
G115R-N269R
W241R-N269R
V004R-N269R
L082R-N269R
N018R-N043R
G020R-N043R
V004R-N043R
T022R-N043R
S009A-N043R
A001R-N043R
S024R-N043R
S009A-N018R
V004R-N018R
A001R-N018R
S024R-L082R
S009A-L082R
N018R-L082R
A001R-L082R
S078R-L082R

TABLA 3-2. Variantes WCE1 con índices de rendimiento de al menos 0,2 en relación con GG36 en cualquiera de entre TCA, estabilidad LAS/EDTA o limpieza de micromuestras BMI, a 16 °C en los detergentes 10 u 11.
Variante de GG36 (numeración BPN')
G020R-L082R
T022R-L082R
V004R-L082R
N043R-L082R
N043R-H249R
G020R-H249R
V004R-H249R
N018R-H249R
S009A-H249R
S212F-H249R
T022R-H249R
S024R-H249R
G115R-H249R
A001R-H249R
L082R-H249R
S242R-H249R
W241R-H249R
V244R-H249R
S078R-H249R
N018R-G115R
G020R-G115R
T022R-G115R
S078R-G115R
S009A-G115R
V004R-G115R
A001R-G115R
L082R-G115R
N043R-G115R
S024R-G115R
S009A-G020R
N018R-G020R
V004R-G020R
A001R-G020R
S009A-E271L
G020R-E271L
S024R-E271L
V244R-E271L
W241R-E271L
N043R-E271L

TABLA 3-2. Variantes WCE1 con índices de rendimiento de al menos 0,2 en relación con GG36 en cualquiera de entre TCA, estabilidad LAS/EDTA o limpieza de micromuestras BMI, a 16 °C en los detergentes 10 u 11.
Variante de GG36 (numeración BPN')
T022R-E271L
H249R-E271L
S212F-E271L
G115R-E271L
S242R-E271L
S078R-E271L
V004R-E271L
N269R-E271L
A001R-E271L
N018R-E271L
L082R-E271L
GG36

EJEMPLO 4

Construcción y rendimiento de limpieza del conjunto NHJ4 de variantes de GG36

[0302] El conjunto NHJ4 de variantes de GG36 descrito en la Tabla 4-4 que se muestra más adelante se construyó utilizando el plásmido de expresión de *B. subtilis* pHPLT-GG36 (figura 2) utilizando fusión de PCR o el kit de mutagénesis dirigida multisitio QUIKCHANGE® (“kit QCMS”; Stratagene) descrito más adelante.

a) Construcción de variantes NHJ4 mediante mutagénesis dirigida multisitio QUIKCHANGE®

[0303] Las variantes creadas utilizando la mutagénesis dirigida multisitio QUIKCHANGE® se incluyen en la Tabla 4-4. El plásmido parental pHPLT-GG36 (molde de ADN) se metiló utilizando dos microgramos de ADN y Dam metilasa (NEB), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las mutantes sitio-dirigidas se realizaron mediante un kit de mutagénesis dirigida multisitio QuikChange® (“kit QCMS”; Stratagene) siguiendo el protocolo del fabricante (véase la Tabla 4-1 para las secuencias de cebadores). Para la transformación eficaz de *B. subtilis,* se amplificó el ADN de las mezclas de reacción QCMS mediante amplificación de círculo rodante (RCA) utilizando el kit Illustra Templiphi (GE Healthcare) y la reacción se llevó a cabo siguiendo el protocolo del fabricante. Un microlitro de ADN amplificado diluido diez veces se utilizó para transformar 50 µl de células competentes de *B. subtilis* (genotipo: ΔaprE, ΔnprE, amyE::xylRPxylAcomK-phleo). La mezcla de transformación se agitó a 37 °C durante 1 hora. Se sembraron diez microlitros de alícuotas de la mezcla de transformación sobre placas de agar Luria con leche desnatada (1,6 %) complementadas con 10 µg/ml de neomicina (Teknova). Posteriormente, las colonias que producían una zona de clareado (halo) en las placas con leche desnatada se inocularon en 120 µl de medios LB que contenían 10 µg/ml de neomicina para la extracción de ADN plasmídico (kit QIAprep Spin Miniprep, Qiagen). Los plásmidos extraídos se secuenciaron para confirmar la presencia de las mutaciones deseadas.

Tabla 4-1. Secuencias de cebadores utilizadas para la construcción de variantes NHJ4		
Mutaciones introducidas (numeración BPN')	**Nombre de cebador**	**Secuencia de cebador (5'-fosforilada)**
S101A S103G V104L	P5939	AAAGTATTAGGGGCGAGCGGTGCAGGTGGACTTAGCTCGATTGCCCAAGGATTG (SEQ ID NO:13)
G159E	P5940	CATCTGGAAATTCAGGTGCAGAATCAATCAGCTATCCGGCCCGTTA (SEQ ID NO: 14)
T22A	P5941	CTGCCCATAACCGTGGATTGGCAGGTTCTGGTGTAAAAGTTGCTG (SEQ ID NO: 15)
Y209E	P5942	AGGTGTAAACGTGCAGAGCACAGAACCAGGTTCAACGTATGCCAG (SEQ ID NO: 16)
E271F	P5943	GAAGCGGACTTGTCAATGCATTCGCTGCAACTCGTTAAAGCTTG (SEQ ID NO:17)
S101A	P5944	AAAGTATTAGGGGCGAGCGGTGCAGGTTCGGTCAGCTCGATTGCCCAA (SEQ ID NO:18)
S103G	P5945	TATTAGGGGCGAGCGGTTCAGGTGGAGTCAGCTCGATTGCCCAAGGA (SEQ ID NO:19)
L111V	P5946	GTCAGCTCGATTGCCCAAGGAGTAGAATGGGCAGGGAACAATGGCA (SEQ ID NO: 20)
S128N	P5947	CGTTGCTAATTTGAGTTTAGGAAACCCTTCGCCAAGTGCCACACTTGA (SEQ ID NO:21)
N62E	P5948	GAACCATCCACTCAAGATGGGGAAGGGCATGGCACGCATGTG (SEQ ID NO:22)
S188D	P5949	ACCAAAACAACAACCGCGCCGACTTTTCACAGTATGGCGCAGGGCTT (SEQ ID NO:23)

b) Construcción de variantes NHJ4 mediante PCR de extensión

[0304] Se crearon diez mutantes combinatorias de GG36 mediante PCR de extensión. La lista de mutaciones introducidas en el plásmido pHPLT-GG36 y de cebadores utilizados a estos efectos se muestra en la Tabla 4-2. Para crear cada mutante, se amplificaron varios fragmentos (Tabla 4-3) mediante cebadores incluidos en la Tabla 4-2. Cada reacción de amplificación por PCR contenía 30 pmol de cada cebador y 100 ng del molde de ADN, plásmido pHPLT-GG36. Las amplificaciones se llevaron a cabo utilizando ADN polimerasa Vent (NEB). La reacción de PCR (20 µl) se calentó inicialmente a 95 °C durante 2,5 min, y a continuación se realizaron 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 15 segundos, hibridación a 55 °C durante 15 segundos, y extensión a 72 °C durante 1 min. Tras la amplificación, se purificaron en gel de 2 a 4 fragmentos de PCR (Tabla 4-3) para cada variante utilizando un kit de purificación de banda de gel QIAGEN®, y se mezclaron (50 ng de cada fragmento). Estas mezclas sirvieron como moldes de ADN para que la PCR de extensión de los cebadores P5954 y P5955 genere el fragmento de gen de longitud completa. Las condiciones de PCR eran iguales a las descritas anteriormente, salvo por la fase de extensión, que se llevó a cabo a 72 °C durante 2 min. El fragmento de ADN de longitud completa se purificó en gel utilizando un kit de purificación de banda de gel QIAGEN®, se digirió con las enzimas de restricción *Bam*HI e *Hind*III y se ligó con el pHPLT-GG36, que se digirió con las mismas enzimas de restricción. Se amplificó un microlitro de las mezclas de ligación empleando amplificación de círculo rodante del kit Illustra Templiphi siguiendo las instrucciones del fabricante (GE Healthcare) para generar ADN multimérico para su transformación en *Bacillus subtilis.* Los productos de la amplificación de círculo rodante se diluyeron 100 veces y se utilizaron para transformar células de *B. subtilis* (genotipo: ΔaprE, ΔnprE, amyE::xylRPxylAcomK-phleo). Se sembró una alícuota de la mezcla de transformación sobre placas LB que contenían un 1,6 % de leche desnatada y 10 µg/ml de neomicina y se incubó durante la noche a 37 °C. Posteriormente, las colonias con halos se inocularon en 120 µl de medio de caldo Luria que contenía 10 µg/ml de neomicina para la extracción de ADN plasmídico (kit QIAprep Spin Miniprep, Qiagen). Los plásmidos extraídos se secuenciaron para confirmar la presencia de las mutaciones deseadas. Las variantes creadas por la PCR de extensión se incluyen en la Tabla 4-4.

TABLA 4-2. Lista de cebadores utilizados para la construcción de variantes NHJ4 con PCR de extensión			
Mutación (numeración BPN')	**Nombre de cebador**	**Directo o inverso**	**Secuencia del cebador**
	P5950 flanqueante	Directo	CATATGAGTTATGCAGTTTGTAG (SEQ ID N.º 24)
	P5951 flanqueante	Inverso	TGTTTTTCTTGGAATTGTGCTGT (SEQ ID N.º 25)
	P5954 flanqueante	Directo	CAGTTTGTAGAATGCAAAAAGTG (SEQ ID N.º 26)
	P5955 flanqueante	Inverso	GACAAGGTAAAGGATAAAACAGC (SEQ ID N.º 27)
T22A	P5956	Directo	CATAACCGTGGATTGGCAGGTTCT GGTGTAAAAGTTGCTG (SEQ ID NO:28)
T22A	P5957	Inverso	ACTTTTACACCAGAACCTGCCAAT CCACGGTTATGGGCAG (SEQ ID NO:29)
N62E	P5958	Directo	CACTCAAGATGGGGAAGGGCATG GCACGCATGTGG (SEQ ID NO:30)
N62E	P5959	Inverso	ATGCGTGCCATGCCCTTCCCCATC TTGAGTGGATGGTTC (SEQ ID NO:31)
S103G	P5960	Directo	GCGAGCGGTTCAGGTGGAGTCAG CTCGATTGCCCAAGGA (SEQ ID NO:32)
S103G	P5961	Inverso	TGGGCAATCGAGCTGACTCCACCT GAACCGCTCGCCCCTA (SEQ ID NO:33)
S103G L111V	P5962	Directo	GTGGAGTCAGCTCGATTGCCCAAG GAGTAGAATGGGCAGGGAACAATGGCAT (SEQ ID NO:34)
S103G L111V	P5963	Inverso	CATTCTACTCCTTGGGCAATCGAG CTGACTCCACCTGAACCGCTCGCCCCTA (SEQ ID NO:35)
S101G S103A V104I	P5964	Directo	GCGAGCGGTGGAGGTGCGATCAGCTC GATTGCCCAAGGATTG (SEQ ID NO:36)
S101G S103A V104I	P5965	Inverso	CTTGGGCAATCGAGCTGATCGCACCT CCACCGCTCGCCCCTAATACTTTA (SEQ ID NO:37)
S101A S103G V104L	P5966	Directo	GCGAGCGGTGCAGGTGGACTTAGCTC GATTGCCCAAGGATTG (SEQ ID NO:38)
S101A S103G V104L	P5967	Inverso	CTTGGGCAATCGAGCTAAGTCCACCT GCACCGCTCGCCCCTAATACTTTA (SEQ ID NO:39)
S101A	P5968	Directo	TATTAGGGGCGAGCGGTGCAGGTTCGG TCAGCTCGATTGC (SEQ ID NO:40)
S101A	P5969	Inverso	ATCGAGCTGACCGAACCTGCACCGCTC GCCCCTAATACTTTA (SEQ ID NO:41)
S128N	P5970	Directo	CTAATTTGAGTTTAGGAAACCCTTCGC CAAGTGCCACACTT (SEQ ID NO:42)
S128N	P5971	Inverso	GCACTTGGCGAAGGGTTTCCTAAACTC AAATTAGCAACGTG (SEQ ID NO:43)
G159D	P5972	Directo	GAAATTCAGGTGCAGACTCAATCAGCT ATCCGGCCCGTT (SEQ ID NO:44)
G159D	P5973	Inverso	GGATAGCTGATTGAGTCTGCACCTGAA TTTCCAGATGC (SEQ ID NO:45)

TABLA 4-2. Lista de cebadores utilizados para la construcción de variantes NHJ4 con PCR de extensión			
Mutación (numeración BPN')	**Nombre de cebador**	**Directo o inverso**	**Secuencia del cebador**
G159E	P5974	Directo	GAAATTCAGGTGCAGAATCAATCAGCT ATCCGGCCCGTT (SEQ ID NO:46)
G159E	P5975	Inverso	GGATAGCTGATTGATTCTGCACCTGAAT TTCCAGATGC (SEQ ID NO:47)
Y209E	P5976	Directo	AACGTGCAGAGCACAGAACCAGGTTCA ACGTATGCCAGCTT (SEQ ID NO:48)
Y209E	P5977	Inverso	CATACGTTGAACCTGGTTCTGTGCTCTG CACGTTTACACC (SEQ ID NO:49)
L111V	P5978	Directo	TCGATTGCCCAAGGAGTAGAATGGGCA GGGAACAATGGCAT (SEQ ID NO:50)
L111V	P5979	Inverso	CATTGTTCCCTGCCCATTCTACTCCTTGG GCAATCGAGCTGAC (SEQ ID NO:51)

TABLA 4-3. Variantes combinatorias creadas mediante PCR de extensión			
N.º de variante	**Variantes (numeración BPN)**	**Fragmento**	**Fragmentos de PCR**
NHJ4-1	S101G S103A V104I	1 2	P5950+P5965 P5964+P5951
NHJ4-2	S101G S103A V104I G159D	3 4 5	P5950+P5965 P5964+P5973 P5972+P5951
NHJ4-3	S101A S103G V104L	6 7	P5950+P5967 P5966+P5951
NHJ4-4	S101A S103G V104L G159E	8 9 10	P5950+P5967 P5966+P5975 P5974+P5951
NHJ4-5	S101A S103G V104L T22A	11 12 13	P5950+P5957 P5956+P5967 P5966+P5951
NHJ4-10	T22A S101A Y209E	14 15 16 17	P5950+P5957 P5956+P5969 P5968+P5977 P5976+P5951
NHJ4-11	S103G L111V G159E	18 19 20	P5950+P5963 P5962+P5975 P5974+P5951
NHJ4-12	T22A S103G G159E	21 22 23 24	P5950+P5957 P5956+P5961 P5960+P5975 P5974+P5951
NHJ4-18	T22A N62E L111V	25 26 27 28	P5950+P5957 P5956+P5959 P5958+P5979 P5978+P5951

TABLA 4-3. Variantes combinatorias creadas mediante PCR de extensión			
N.º de variante	**Variantes (numeración BPN)**	**Fragmento**	**Fragmentos de PCR**
NHJ4-20	S101A S103G V104L S128N	29 30 31	P5950+P5967 P5966+P5971 P5970+P5951

[0305] Con el fin de expresar el conjunto NHJ4 de variantes de proteínas para posteriores análisis bioquímicos, las cepas de *B. subtilis* portadoras de las variantes de plásmidos se inocularon en placas de microtitulación que contenían 150 µl de caldo Luria como medio complementado con 10 µg/ml de neomicina. Los cultivos se cultivaron para la expresión de proteínas según lo descrito en el Ejemplo 2, y se filtraron a través de una placa de microfiltración (0,22 µm; Millipore), según se describe también en el Ejemplo 2. El líquido filtrado resultante se utilizó para el análisis bioquímico. El ensayo de inhibición de eglina c para determinar el contenido de proteínas y los ensayos de micromuestras BMI realizados en diversos detergentes se llevaron a cabo según lo descrito en el Ejemplo 1. Los índices de rendimiento se calculan también conforme a lo expuesto en la descripción del ensayo BMI en el Ejemplo 1. La Tabla 4-4 ofrece información acerca de estas múltiples variantes de mutaciones y de los resultados obtenidos para ellas. Los valores de IR son relativos a GG36. En las siguientes Tablas, las composiciones detergentes ("Det.") corresponden a las que se muestran en la Tabla D expuesta anteriormente. Asimismo, según lo indicado, la posición de aminoácido se lista de acuerdo con la numeración BPN'.

TABLA 4-4. Variantes NHJ4 con múltiples mutaciones y con índices de rendimiento de limpieza BMI de al menos 0,2 en relación con GG36 en los detergentes 7, 8 o 9, a 16 °C.		
Nombre de variante	**Creada mediante**	**Mutaciones (numeración BPN')**
		GG36
NHJ4-1	PCR de extensión	S101G S103A V104I
NHJ4-10	PCR de extensión	T22A S101A Y209E
NHJ4-11	PCR de extensión	S103G L111V G159E
NHJ4-12	PCR de extensión	T22A S103G G159E
NHJ4-13	QCMS	T22A L111V G159E
NHJ4-14	QCMS	T22A S128N E271F Y209E
NHJ4-15	QCMS	T22A S103G L111V
NHJ4-16	QCMS	N62E L111V S128N
NHJ4-17	QCMS	T22A L111V S128N
NHJ4-18	PCR de extensión	T22A N62E L111V
NHJ4-19	QCMS	S101A S103G V104L S188D
NHJ4-2	PCR de extensión	S101G S103A V104I G159D
NHJ4-20	PCR de extensión	S101A S103G V104L S128N
NHJ4-24	QCMS	T22A S101A G159E
NHJ4-3	PCR de extensión	S101A S103G V104L
NHJ4-4	PCR de extensión	S101A S103G V104L G159E
NHJ4-5	PCR de extensión	T22A S101A S103G V104L
NHJ4-6	QCMS	S101A S103G V104L Y209E
NHJ4-7	QCMS	T22A Y209E E271F
NHJ4-8	QCMS	T22A S101A E271F
NHJ4-9	QCMS	S101A Y209E E271F

EJEMPLO 5

Construcción y rendimiento de limpieza del conjunto NHJ3 de variantes de GG36

[0306] El conjunto NHJ3 de variantes descrito en el presente documento se basa en una variante de GG36 (denominada GG36-9) que contiene las siguientes mutaciones: S101G, S103A, V104I, G159D, A232V, Q236H, Q245R, N248D y N252K (numeración BPN'). Estas variantes se crearon utilizando el kit de mutagénesis sitio-

dirigida QUIKCHANGE® Lightning (kit QCLDS; Stratagene), con el plásmido pRA68 (véase figura 3) como molde de ADN. El plásmido pRA68 derivó del vector pBN3 (véase Babé *et al.*, Biotech. Appl. Biochem. 27:117-124 [1998]).

[0307] A continuación, se expone la secuencia de ADN de la variante GG36-9 (la secuencia señal se muestra en letras minúsculas, la propeptídica en texto subrayado y en minúsculas, y la secuencia madura de GG36-9 en mayúsculas):

Gtgagaagcaaaaaattgtggatcgtcgcgtcgaccgcactactcatttctgttgcttttagttcatcgatcgcatcggctgctgaagaagcaaaagaaaa
atatttaattggctttaatgagcaggaagctgtcagtgagtttgtagaacaagtagaggcaaatgacgaggtcgccattctctctgaggaagaggaagtcg
aaattgaattgcttcatgaatttgaaacgattcctgttttatccgttgagttaagcccagaagatgtggacgcgcttgaactcgatccagcgatttcttatattga
agaggatgcagaagtaacgacaatgGCGCAATCAGTGCCATGGGGAATTAGCCGTGTGCAAGCCCCGGCT
GCCCATAACCGTGGATTGACAGGTTCTGGTGTAAAAGTTGCTGTCCTCGATACAGGTATTTC
CACTCATCCAGACTTAAATATTCGTGGTGGCGCTAGCTTTGTACCAGGGGAACCATCCACTC
AAGATGGGAATGGGCATGGCACGCATGTGGCCGGGACGATTGCTGCTCTAAACAATTCGAT
TGGCGTACTTGGCGTAGCGCCGAGCGCGGAACTATACGCTGTTAAAGTATTAGGGGCGAGC
GGTGGGGGCGCCATCAGCTCGATTGCCCAAGGATTGGAATGGGCAGGGAACAATGGCATGC
ACGTTGCTAATTTGAGTTTAGGAAGCCCTTCGCCAAGTGCCACACTTGAGCAAGCTGTTAAT
AGCGCGACTTCTAGGGGCGTTCTTGTTGTAGCGGCATCTGGAAATTCGGGTGCAGACTCAAT
CAGCTATCCGGCCCGTTATGCGAACGCAATGGCAGTCGGAGCTACTGACCAAAACAACAAC
CGCGCCAGCTTTTCACAGTATGGCGCAGGGCTTGACATCGTCGCACCAGGTGTAAACGTGCA
GAGCACATACCCAGGTTCAACGTATGCCAGCTTAAACGGTACATCGATGGCTACTCCTCATG
TTGCAGGTGCAGCAGTCCTTGTTAAACATAAGAACCCATCTTGGTCCAATGTACGAATCCGC
GATCATCTAAAGAAAACGGCAACGAGCTTAGGAAGCACGAACTTGTATGGAAGCGGACTTG
TCAATGCCGAAGCTGCAACTCGTTAA (SEQ ID NO:5)

[0308] A continuación, se expone la secuencia proteica de la variante GG36-9 (la secuencia señal se muestra en letras minúsculas, la propeptídica en texto subrayado y en minúsculas, y la secuencia de proteasa madura GG36-9 en letras mayúsculas):

vrskklwivastallisvafsssiasaaeeakekyligfneqeavsefveqveandevailseeeeveiellhefetipvlsvelspedvdaleldpaisy
ieedaevttmAQSVPWGISRVQAPAAHNRGLTGSGVKVAVLDTGISTHPDLNIRGGASFVPGEPSTQD
GNGHGTHVAGTIAALNNSIGVLGVAPSAELYAVKVLGASGGGAISSIAQGLEWAGNNGMHVAN
LSLGSPSPSATLEQAVNSATSRGVLVVAASGNSGADSISYPARYANAMAVGATDQNNNRASFSQ
YGAGLDIVAPGVNVQSTYPGSTYASLNGTSMATPHVAGAAVLVKHKNPSWSNVRIRDHLKKTA
TSLGSTNLYGSGLVNAEAATR (SEQ ID NO:6)

[0309] Para crear las variantes NHJ3 utilizando el kit QCLSD, se diseñaron cebadores mutagénicos según se muestra en la Tabla 5-1 para cada una de las variantes. La reacción de mutagénesis para cada variante consistía en 0,5 ul de tampón 10X, 0,5 ul de ADN plasmídico pRA68 (168 ng/µl), 0,5 µl de cebador mutagénico directo "f" (25 uM), 0,5 ul de cebador mutagénico inverso "r" (25 uM), 1 ul de dNTP (suministrado en el kit QCLSD), 1,5 ul de solución Quik (suministrada en el kit QCLMS), 1µl de mezcla de enzimas (suministrada en el kit QCLSD), y 40 ul de agua destilada desionizada para conformar un volumen de reacción de 50 µl según las instrucciones del fabricante. El programa de ciclos fue de 1 ciclo a 95 °C durante 2 minutos, 18 ciclos de 95 °C durante 20 segundos, 60 °C durante 10 segundos y 68 °C durante 3 minutos, 22 segundos, y un ciclo final de 68 °C durante 5 minutos. A continuación, se utilizó 1µl de la enzima de restricción *Dpn*I incluida en el kit para digerir el ADN plasmídico en la reacción, y posteriormente se utilizaron 2 µl de la reacción para transformar las células competentes de *E. coli* TOP10 (Invitrogen). Los transformantes de *E.coli* se seleccionaron en placas con caldo Luria como medio conteniendo 50 ug/ml (ppm) de carbenicilina tras su cultivo durante la noche a 37 °C. El ADN plasmídico se extrajo de 4-8 colonias de *E. coli* cultivadas en medio LA conteniendo 50 ug/ml (ppm) de carbenicilina utilizando el kit "QIAprep spin miniprep" (Qiagen). Los plásmidos se secuenciaron para confirmar la presencia de las mutaciones deseadas. Las variantes de plásmidos se transformaron a continuación en células de *B. subtilis* según lo descrito en el Ejemplo 2. Las cepas variantes de *B. subtilis* se cultivaron según se describe en el Ejemplo 2 para su posterior análisis bioquímico, como la determinación del contenido proteico, utilizando el ensayo de inhibición de eglina c (Ejemplo 1) y el ensayo de limpieza de micromuestras BMI (Ejemplo 1). Los resultados se indican a continuación en las Tablas 5-2 y 5-3. Los IR son relativos a GG36. En las siguientes

Tablas, las composiciones detergentes ("Det.") corresponden a las que se representan en la Tabla D expuesta anteriormente. Asimismo, según lo indicado, la posición de aminoácido se lista de acuerdo con la numeración BPN'.

TABLA 5-1. Lista de cebadores mutagénicos utilizados para crear el conjunto de variantes NHJ3 ("f" indica cebadores directos y "r" indica cebadores inversos)

Variante	Mutación incorporada (numeración BPN')	Nombre de cebador mutagénico	Secuencia de cebador mutagénico 5' a 3'
NHJ3-1	G101S	p158_G101S f	GTTAAAGTATTAGGGGCGAGCGGTAGCGGCGCCATCAGCTCGATTGCC (SEQ ID NO:53)
		p159_G101S r	GGCAATCGAGCTGATGGCGCCGCTACCGCTCGCCCCTAATACTTTAAC (SEQ ID NO:54)
NHJ3-2	A103S	p160_A1013 f	GTATTAGGGGCGAGCGGTGGGGGCAGCATCAGCTCGATTGCCCAAGGATTG (SEQ ID NO:55)
		p161_A1013 r	CAATCCTTGGGCAATCGAGCTGATGCTGCCCCCACCGCTCGCCCCTAATAC (SEQ ID NO:56)
NHJ3-3	I104V	p142_I104V f	GGGCGAGCGGTGGGGGCGCCGTTAGCTCGATTGC CCAAGGATTG (SEQ ID NO:57)
		p143_I104V r	CAATCCTTGGGCAATCGAGCTAACGGCGCCCCCA CCGCTCGCCC (SEQ ID NO:58)
NHJ3-4	D159G	p144_D159G f	GCATCTGGAAATTCGGGTGCAGGCTCAATCAGCT ATCCGGCCCGT (SEQ ID NO:59)
		p145_D159G r	ACGGGCCGGATAGCTGATTGAGCCTGCACCCGAA TTTCCAGATGC (SEQ ID NO:60)
NHJ3-5	V232A	p146_V232A f	CTCATGTTGCAGGTGCAGCAGCACTTGTTAAACAT AAGAACCC (SEQ ID NO:61)
		p147_V232A r	GGGTTCTTATGTTTAACAAGTGCTGCTGCACCTGC AACATGAG (SEQ ID NO:62)
NHJ3-6	H236Q	p148_H236Q f	GTGCAGCAGTCCTTGTTAAACAAAAGAACCCATC TTGGTCCAAT (SEQ ID NO:63)
		p149_H236Q r	ATTGGACCAAGATGGGTTCTTTTGTTTAACAAGG ACTGCTGCAC (SEQ ID NO:64)

(continuación)

TABLA 5-1. Lista de cebadores mutagénicos utilizados para crear el c onjunto de variantes NHJ3 ("f" indica cebadores directos y "r" indica cebadores			
Variante	**Mutación incorporada (numeración BPN')**	**Nombre de cebador mutagénico**	**Secuencia de cebador mutagénico 5' a 3'**
NHJ3-7	R245Q	p150_R245Q f	CCATCTTGGTCCAATGTACAAATCCGCGATCATC TAAAGAAAAC (SEQ ID NO:65)
		p151_R245Q r	GTTTTCTTTAGATGATCGCGGATTTGTACATTGG ACCAAGATGG (SEQ ID NO:66)
NHJ3-8	D248N	P152_D248N f	GGTCCAATGTACGAATCCGCAATCATCTAAAGA AAACGGCAAC (SEQ ID NO:67)
		P153_D248N r	GTTGCCGTTTTCTTTAGATGATTGCGGATTCGTA CATTGGACC (SEQ ID NO:68)
NHJ3-9	K252N	P154_K252N f	GAATCCGCGATCATCTAAAGAATACGGCAACGA GCTTAGGAAG (SEQ ID NO:69)
		P155_K252N r	CTTCCTAAGCTCGTTGCCGTATTCTTTAGATGATC GCGGATTC (SEQ ID NO:70)

TABLA 5-2. Múltiples variantes de mutaciones NHJ3 con índices de rendimiento de limpieza BMI de al menos 1,1 en relación con GG36 en los detergentes 7, 8 o 9, a 16 °C.	
Variante	**Secuencia de variante en relación con GG36 (numeración BPN')**
	GG36
NHJ3-1	S103A-V104I-G159D-A232V-Q236H-Q245R-N248D-N252K
NHJ3-2	S101G-V104I-G159D-A232V-Q236H-Q245R-N248D-N252K
NHJ3-3	S101G-S103A-G159D-A232V-Q236H-Q245R-N248D-N252K
NHJ3-4	S101G-S103A-V104L-A232V-Q236H-Q245R-N248D-N252K
NHJ3-5	S 101G-S 103A-V104L-G159D-Q236H-Q245R-N248D-N252K
NHJ3-6	S101G-S103A-V104L-G159D-A232V-Q245R-N248D-N252K
NHJ3-7	S101G-S 103A-V104L-G159D-A232V-Q236H-N248D-N252K
NHJ3-8	S101G-S103A-V104L-G159D-A232V-Q236H-Q245R-N252K
NHJ3-9	S 101G-S 103A-V104L-G159D-A232V-Q236H-Q245R-N248D

TABLA 5-3. Variantes NHJ3 con múltiples mutaciones y con índices de rendimiento de limpieza BMI de al menos 0,3 en relación con GG36 en los detergentes 10 u 11, a 16 °C.	
Variante	**Secuencia de variante en relación con GG36 (numeración BPN')**
	GG36
NHJ3-1	S103A-V104I-G159D-A232V-Q236H-Q245R-N248D-N252K
NHJ3-2	S101G-V104I-G159D-A232V-Q236H-Q245R-N248D-N252K
NHJ3-3	S101G-S103A-G159D-A232V-Q236H-Q245R-N248D-N252K
NHJ3-4	S101G-S103A-V104L-A232V-Q236H-Q245R-N248D-N252K
NHJ3-5	S101G-S103A-V104L-G159D-Q236H-Q245R-N248D-N252K
NHJ3-6	S101G-S103A-V104L-G159D-A232V-Q245R-N248D-N252K
NHJ3-7	S101G-S103A-V104L-G159D-A232V-Q236H-N248D-N252K
NHJ3-8	S101G-S103A-V104L-G159D-A232V-Q236H-Q245R-N252K
NHJ3-9	S101G-S103A-V104L-G159D-A232V-Q236H-Q245R-N248D

EJEMPLO 6

Construcción y rendimiento de limpieza del conjunto NHJ5 de variantes de GG36

[0310] El conjunto NHJ5 de variantes descrito en el presente documento se basa en una variante de GG36 (a la que se hace referencia como GG36-7) que contiene las siguientes mutaciones: S101G, S103A, V104I, G159D, A232V, Q245R, N248D y (numeración BPN'). Estas variantes se crearon utilizando el kit de mutagénesis dirigida multisitio QUIKCHANGE® Lightning ("kit QCLMS"), con el plásmido pRA96 como molde de ADN (véase la figura 4). Las mutaciones incorporadas y las secuencias de los cebadores utilizadas para introducir las mutaciones en GG36-7 se muestran en la Tabla 6-1. Las variantes se generaron utilizando los métodos descritos en el Ejemplo 4. Las cepas variantes de *B. subtilis* se cultivaron según lo descrito en el Ejemplo 2 para su posterior análisis bioquímico, como la determinación del contenido proteico, utilizando el ensayo de inhibición de eglina c (Ejemplo 1) y el ensayo de limpieza de micromuestras BMI (Ejemplo 1). Los resultados se incluyen más adelante, en la Tabla 6-2. Los valores de IR son relativos a GG36. En las siguientes Tablas, las composiciones detergentes ("Det.") corresponden a las que se muestran en la Tabla D expuesta anteriormente. Asimismo, según lo indicado, la posición de aminoácido se lista de acuerdo con la numeración BPN'.

[0311] A continuación, se expone la secuencia de ADN de la variante GG36-7 (la secuencia señal se muestra en letras minúsculas, la secuencia propeptídica en texto subrayado y en minúsculas, y la secuencia de proteasa madura de GG36-7 en mayúsculas):

Gtgagaagcaaaaaattgtggatcgtcgcgtcgaccgcactactcatttctgttgcttttagttcatcgatcgcatcggctgctgaagaagcaaaagaaaa
atatttaattggctttaatgagcaggaagctgtcagtgagtttgtagaacaagtagaggcaaatgacgaggtcgccattctctctgaggaagaggaagtcg
aaattgaattgcttcatgaatttgaaacgattcctgttttatccgttgagttaagcccagaagatgtggacgcgcttgaactcgatccagcgatttcttatattga
agaggatgcagaagtaacgacaatgGCGCAATCAGTGCCATGGGGAATTAGCCGTGTGCAAGCCCCGGCT
GCCCATAACCGTGGATTGACAGGTTCTGGTGTAAAAGTTGCTGTCCTCGATACAGGTATTTC
CACTCATCCAGACTTAAATATTCGTGGTGGCGCTAGCTTTGTACCAGGGGAACCATCCACTC
AAGATGGGAATGGGCATGGCACGCATGTGGCCGGGACGATTGCTGCTCTAAACAATTCGAT
TGGCGTACTTGGCGTAGCGCCGAGCGCGGAACTATACGCTGTTAAAGTATTAGGGGCGAGC
GGTGGGGGCGCCATCAGCTCGATTGCCCAAGGATTGGAATGGGCAGGGAACAATGGCATGC
ACGTTGCTAATTTGAGTTTAGGAAGCCCTTCGCCAAGTGCCACACTTGAGCAAGCTGTTAAT
AGCGCGACTTCTAGGGGCGTTCTTGTTGTAGCGGCATCTGGAAATTCGGGTGCAGACTCAAT
CAGCTATCCGGCCCGTTATGCGAACGCAATGGCAGTCGGAGCTACTGACCAAAACAACAAC
CGCGCCAGCTTTTCACAGTATGGCGCAGGGCTTGACATCGTCGCACCAGGTGTAAACGTGCA
GAGCACATACCCAGGTTCAACGTATGCCAGCTTAAACGGTACATCGATGGCTACTCCTCATG
TTGCAGGTGCAGCAGTCCTTGTTAAACAAAAGAACCCATCTTGGTCCAATGTACGAATCCGC
GATCATCTAAAGAATACGGCAACGAGCTTAGGAAGCACGAACTTGTATGGAAGCGGACTTG
TCAATGCCGAAGCTGCAACTCGT (SEQ ID NO:7)

[0312] A continuación, se expone la secuencia proteica de la variante GG36-7 (la secuencia señal se muestra en letras minúsculas, la secuencia propeptídica en texto subrayado y en minúsculas, y la secuencia de proteasa madura de GG36-7 en mayúsculas):

vrskklwivastallisvafsssiasaaeeakekyligfneqeavsefveqveandevailseeeeveiellhefetipvlsvelspedvdaleldpaisy
ieedaevttmAQSVPWGISRVQAPAAHNRGLTGSGVKVAVLDTGISTHPDLNIRGGASFVPGEPSTQD
GNGHGTHVAGTIAALNNSIGVLGVAPSAELYAVKVLGASGGGAISSIAQGLEWAGNNGMHVAN
LSLGSPSPSATLEQAVNSATSRGVLVVAASGNSGADSISYPARYANAMAVGATDQNNNRASFSQ
YGAGLDIVAPGVNVQSTYPGSTYASLNGTSMATPHVAGAAVLVKQKNPSWSNVRIRDHLKNTA
TSLGSTNLYGSGLVNAEAATR (SEQ ID NO:8)

TABLA 6-1. Lista de cebadores utilizados para crear el conjunto de variantes NHJ5		
N.º de cebador	**Mutaciones utilizadas con numeración GG36 (numeración BPN' incluida entre paréntesis)**	**Secuencia de cebador**
168	H243R (H249R)	GTACGAATCCGCGATAGACTAAAGAATACGGCAACGAG (SEQ ID N.º 71)
170	E265F (E271F)	GCGGACTTGTCAATGCCTTTGCTGCAACTCGTTAAAGCTTACAT (SEQ ID N.º 72)
172	D157E (D159E)	GGAAATTCGGGTGCAGAATCAATCAGCTATCCGGCCCGTTA (SEQ ID N.º 73)
174	A156E (A158E)	CTGGAAATTCGGGTGAAGACTCAATCAGCTATCCGGCC (SEQ ID N.º 74)
176	A156E-D157G (A158E-D159E)	CGGCATCTGGAAATTCGGGTGAAGGCTCAATCAGCTATCCGGCCCGTTATG (SEQ ID N.º 75)
178	T22A	CATAACCGTGGATTGGCAGGTTCTGGTGTAAAAGTTGCTGTC (SEQ ID N.º 76)
180	N60E (N62E)	TCCACTCAAGATGGGGAAGGGCATGGCACGCATGTGGC (SEQ ID N.º 77)
182	N232R (N238R)	CTTGTTAAACAAAAGAGACCATCTTGGTCCAATGTACGAATC (SEQ ID N.º 78)
184	D242R (D248R)	AATGTACGAATCCGCAGACATCTAAAGAATACGGCAACGAGC (SEQ ID N.º 79)
186	T247R (T253R)	CGATCATCTAAAGAATAGAGCAACGAGCTTAGGAAGCACGAAC (SEQ ID N.º 80)
188	S24R	GTGGATTGACAGGTAGAGGTGTAAAAGTTGCTGTCCTCGATA (SEQ ID N.º 81)
190	N74D (N76D)	ACGATTGCTGCTCTAGATAATTCGATTGGCGTACTTGGCGTAG (SEQ ID N.º 82)

TABLA 6-2: Variantes NHJ5 con múltiples mutaciones y con índices de rendimiento de limpieza BMI de al menos 0,6 en relación con GG36 en los detergentes 7-11, a 16 °C.	
Variante	**Secuencia de variante en relación con GG36 (numeración BPN')**
	GG36
GG36-7	S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D
NHJ5-1	S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-E271F
NHJ5-2	S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-N238R
NHJ5-3	S 101G-S 103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-N248R
NHJ5-4	S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-T253R
NHJ5-5	S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-S24R
NHJ5-6	S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-N76D
NHJ5-7	S101G-S103A-V104I-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R
NHJ5-8	S101G-S103A-V104I-G159E-A232V-Q245R-N248D-E271F
NHJ5-9	S101G-S103A-V104I-A158E-A232V-Q245R-N248D-H249R
NHJ5-10	S101G-S103A-V104I-A158E-A232V-Q245R-N248D-E271F
NHJ5-11	T22A-S101G-S 103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-H249R
NHJ5-12	T22A-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-E271F
NHJ5-13	N62E-S101G-S 103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-H249R
NHJ5-14	N62E-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-E271F

EJEMPLO 7

Construcción de la biblioteca combinatoria NHJ2

[0313] Este Ejemplo describe la construcción de una biblioteca combinatoria de GG36 que implica una o más de las siguientes mutaciones: A16S, T22A, S101A, S103G, V104L, L111V, S128N y L148I (numeración BPN'). El plásmido de expresión de *B. subtilis* pHPLT-GG36 se proporcionó a DNA 2.0 Inc., para la generación de la biblioteca combinatoria NHJ2. DNA 2.0, Inc. proporcionó una reacción de ligación de la biblioteca construida NHJ2 para su transformación en la cepa de *B. subtilis* (genotipo: ΔaprE, ΔnprE, amyE::xylRPxylAcomK-phleo). Las variantes generadas que contenían una o varias de las mutaciones descritas en el presente documento se pueden evaluar para aplicaciones de limpieza en agua fría empleando métodos y composiciones detergentes descritos en el presente documento.

EJEMPLO 8

Construcción de bibliotecas y variantes de GG36 adicionales

[0314] Se construyen bibliotecas y variantes adicionales utilizando el siguiente conjunto de mutaciones: A1R, A230E, E271L, G115R, G20R, H249R, K235F, K27V/F/L, L75E, L82R, N18R, N269R, N43D, N43R, N76D, R45T, S212F, S242R, S24R, S78R, S9A, T22R, V121E, V244R, V28E, V30E, V4R, W241R (numeración BPN'). El plásmido de expresión de *B. subtilis* pHPLT-GG36 se utilizó para construir las bibliotecas y variantes en DNA2.0, Inc. Una reacción de ligación de la biblioteca o variante se transformó en la cepa de *B. subtilis* (genotipo: ΔaprE, ΔnprE, amyE::xylRPxylAcomK-phleo). Las variantes generadas que contenían una o más de estas mutaciones se evaluaron para la limpieza en agua fría en el ensayo de limpieza de micromuestras BMI (Ejemplo 1) empleando métodos y composiciones detergentes descritos en el presente documento. Los resultados se incluyen a continuación en la Tabla 8-1. En las siguientes Tablas, las composiciones detergentes ("Det.") corresponden a las que se muestran en la Tabla 1-2 expuesta anteriormente. Asimismo, según lo indicado, la posición de aminoácido se lista de acuerdo con la numeración BPN'.

[0315] Entre los conjuntos adicionales de variantes de GG36 construidos y evaluados para aplicaciones de limpieza en agua fría utilizando métodos y composiciones detergentes descritos en el presente documento se incluyen: G20R-N43R-H249R, G20R-T22R-N43R, G20R-N43R-S242R, G20R-N43R-E271L, G20R-N43R-V244R, G20R-S24R-N43R-S242R, S9A-T22R-S78R-S212F-W241R, S9A-G20R-N43R-S212F, S9A-N43R-S212F, G20R-N43R-S212F, G20R-T22R-N43R-S212F, S24R-S78R-S212F, S9A-N43R-S78R, S9A-N43R-S78R-S242R, S9A-G20R-N43R-S78R, G20R-S24R-N43R-S78R-S242R, T22R-S24R-S78R-S212F, S9A-G20R-N43R-S78R-S242R, G20R-N43R-S78R-H249R, G20R-N43R-S78R, S9A-S78R-S212F, S9AT22R-N43R-S78R, S9A-G20R-S24R-N43R, S9A-T22R-S78R-S212F, V4R-S9A-T22R-S78R-S212F, G20R-S24R-N43R, A1R-S9A-N43R, G20R-S24R-N43R-G115R, S9A-S24R-N43R, G20R-T22R-S24R-N43R, A1R-S24R-N43R, S9A-G20R-S24R-N43R-S242R, S9A-G20R-T22R-S78R-S212F, S9A-S24R-N43R-V244R, S9A-S24R-N43R-S242R, V4R-S9A-T22R-S24R-S212F y T22R-S24R-N43R (numeración BPN').

TABLA 8-1: Rendimiento de limpieza BMI de variantes WCE4.
IR = Índice de rendimiento relativo a GG36
IR > o = 1,5 es +++; IR entre 1,49 y 1,3 = ++; IR entre 1,29 y 1,0 = + en el detergente 36 k o l

Secuencia de variantes de GG36 (numeración BPN')	IR relativo a GG36; Detergente 36k o l, ensayo BMI, 16 °C
V004R-S009A-G020R-S242R	+++
G020R-N043R-W241R	+++
G020R-S242R-N269R	+++
V004R-S009A-G020R-N043R-	+++
V004R-G020R-H249R-	+++
N018R-S024R-V244R	+++
S009A-T022R-S212F-W241R	+++
G020R-N043R-N269R-	+++

TABLA 8-1: Rendimiento de limpieza BMI de variantes WCE4. IR = Índice de rendimiento relativo a GG36 IR > o = 1,5 es +++; IR entre 1,49 y 1,3 = ++; IR entre 1,29 y 1,0 = + en el detergente 36 k o l	
Secuencia de variantes de GG36 (numeración BPN')	**IR relativo a GG36; Detergente 36k o l, ensayo BMI, 16 °C**
N018R-S024R-S242R	+++
V004R-S009A-N043R-W241R-	+++
G020R-N043R-V244R-	+++
G020R-T022R-S242R-	+++
V004R-G020R-N043R-	+++
V004R-S009A-G020R-N043R-S242R-	+++
G020R-N043R-S242R-	+++
G020R-N043R-S242R-H249R-	+++
G020R-S212F-H249R-	+++
V004R-S009A-W241R-	+++
A001R-S009A-N043R-	+++
G020R-N043R-H249R-	+++
S009A-G020R-N043R-W241R	+++
G020R- T022R-N043R-	+++
G020R-H249R-N269R-	+++
G020R-T022R-W241R-	+++
V004R-S009A-S024R-N043R-W241R-	+++
S009A-N043R-S078R	+++
V004R-G020R-S024R-V244R-	+++
G020R-T022R-S078R-S242R-	+++
G020R-S024R-S242R-H249R-	+++
V004R-S009A-S078R-W241R-	+++
S009A-N043R-S078R-S242R	+++
V004R-G020R-S024R-	+++
S009A-N043R-S212F	+++

TABLA 8-1: Rendimiento de limpieza BMI de variantes WCE4. IR = Índice de rendimiento relativo a GG36 IR > o = 1,5 es +++; IR entre 1,49 y 1,3 = ++; IR entre 1,29 y 1,0 = + en el detergente 36 k o l	
Secuencia de variantes de GG36 (numeración BPN')	**IR relativo a GG36; Detergente 36k o l, ensayo BMI, 16 °C**
G020R-N043R-S212F-	+++
S024R-S078R-S212F-	+++
S009A-G020R-S024R-N043R	+++
S009A-T022R-N043R-S078R	+++
G020R-T022R-S212F-W241R-	+++
G020R-N043R-S212F-W241R-	+++
S009A-N043R-W241R	+++
G020R-N043R-E271L	+++
G020R-T022R-S078R-W241R-	+++
G020R-S024R-N043R-S242R-	+++
G020R-T022R-N043R-W241R-	+++
S009A-G020R-N043R-S212F	+++
V004R-S009A-G020R-S024R-S242R-	+++
G020R-N043R-H249R-E271L	+++
G020R-T022R-S024R-S242R-	+++
S009A-T022R-S078R-S212F	+++
G020R-N043R-S242R-E271L	+++
S009A-T022R-S078R-S212F-W241R	+++
V004R-G020R-S024R-H249R-	+++
G020R-T022R-E271L	+++
G020R-T022R-N043R-S212F-	+++
V004R-G020R-S024R-N043R-S242R-	+++
V004R-G020R-S024R-N043R-	+++
V004R-S009A-T022R-S078R-S212F-	+
G020R-T022R-S078R-S212F-W241R-	+

TABLA 8-1: Rendimiento de limpieza BMI de variantes WCE4. IR = Índice de rendimiento relativo a GG36 IR > o = 1,5 es +++; IR entre 1,49 y 1,3 = ++; IR entre 1,29 y 1,0 = + en el detergente 36 k o l	
Secuencia de variantes de GG36 (numeración BPN')	**IR relativo a GG36; Detergente 36k o l, ensayo BMI, 16 °C**
G020R-T022R-N269R-	+

EJEMPLO 9

Construcción y rendimiento de limpieza de la biblioteca WCE2 de GG36

[0316] La biblioteca combinatoria WCE2 la generó DNA 2.0, Inc., utilizando el plásmido de expresión de *B. subtilis* pHPLT-GG36. Una reacción de ligación de la biblioteca WCE2 construida se transformó en la cepa de *B. subtilis* (genotipo: ΔaprE, ΔnprE, amyE::xylRPxylAcomK-phleo). El conjunto de mutaciones utilizado para generar la biblioteca WCE2 es A230E, G20R, H249R, N18R, N43R/D, N76D, R45T, S242R y S24R (numeración BPN'). Las variantes generadas que contenían una o más de estas mutaciones se evalúan para la limpieza en agua fría en el ensayo de limpieza de micromuestras BMI (Ejemplo 1) empleando métodos y composiciones detergentes descritos en el presente documento. Los resultados se incluyen a continuación en la Tabla 9-1. En la siguiente Tabla, las composiciones detergentes ("Det.") corresponden a las que se muestran en la Tabla 1-2 expuesta anteriormente. Asimismo, según lo indicado, la posición de aminoácido se lista de acuerdo con la numeración BPN'.

TABLA 9-1: Rendimiento de limpieza BMI de variantes de GG36 de la biblioteca WCE2. IR = Índice de rendimiento relativo a GG36 IR > o = 1,5 es +++; IR entre 1,49 y 1,3 = ++; IR entre 1,29 y 1,0 = + en el detergente 36h o 36i	
Secuencia de variantes de GG36 (numeración BPN')	**IR relativo a GG36; ensayo BMI, Detergente 36h o 36i, 16 °C**
N018R-G020R-N043D-R045T-A230E	+++
N018R-N043R-R045T-S242R-H249R	+++
S024R-N043D-H249R	+++
N018R-G020R-R045T	+++
G020R-S024R-N076D-H249R	+++
S024R-N043R-A230E-S242R	+++
N018R-S024R-N043D-A230E	++
G020R-N076D	++
N018R-S024R-N043D-N076D-H249R	++
S024R-N043R-N076D-H249R	+++
N018R-S024R-R045T-S242R	++
G020R-N043D-N076D-A230E-H249R	++
G020R-N043R-R045T-S242R	+++
N018R-S024R-N076D-H249R	++

TABLA 9-1: Rendimiento de limpieza BMI de variantes de GG36 de la biblioteca WCE2. IR = Índice de rendimiento relativo a GG36 IR > o = 1,5 es +++; IR entre 1,49 y 1,3 = ++; IR entre 1,29 y 1,0 = + en el detergente 36h o 36i	
Secuencia de variantes de GG36 (numeración BPN')	**IR relativo a GG36; ensayo BMI, Detergente 36h o 36i, 16 °C**
N018R-G020R-S024R-N043D-R045T-L233I-S242R	+++
S024R-N043R-A230E	+++
N018R-G020R-N043D	+++
N043R-S242R-H249R	+++
G020R-N043R-R045T-A230E	+++
N043R-N076D-S242R-H249R	+++
G020R-S024R-R045T-A230E-S242R	+++
S024R-R045T-N076D-A230E-S242R-H249R	+++
S024R-R045T	+++
S024R-N043R-R045T-N076D-A230E-H249R	++
N018R-S024R-N043D-R045T-H249R	++
N018R-N043R-R045T-H249R	+++
S024R-N043R-S242R	+++
N018R-G020R-N043R-N076D-H249R	+++
G020R-S024R-N043D-H249R	+++
G020R-N043R-A230E-S242R	+++
G020R-N043R-S242R	+++
N018R-N043R-N076D-A230E	++
G020R-S024R-N043D-S242R	+++
G020R-N043R-A230E	+++
N018R-G020R-N043R-N076D-S242R-H249R	+++
N043D-R045T-N076D-H249R	+
N018R-N043R-S242R-H249R	+++
N018R-G020R-N043R-R045T-S242R	+++
N018R-G020R-N043D-A230E-S242R	+++

TABLA 9-1: Rendimiento de limpieza BMI de variantes de GG36 de la biblioteca WCE2. IR = Índice de rendimiento relativo a GG36 IR > o = 1,5 es +++; IR entre 1,49 y 1,3 = ++; IR entre 1,29 y 1,0 = + en el detergente 36h o 36i	
Secuencia de variantes de GG36 (numeración BPN')	**IR relativo a GG36; ensayo BMI, Detergente 36h o 36i, 16 °C**
G020R-S024R-N043R-R045T-H249R	+++
S024R-N043R-H249R	+++
G020R-S024R-K027E-N043R-N076D-A230E	+++
S024R-N043R-R045T-S242R	+++
N018R-G020R-S024R-N043R-R045T-N076D-A230E	+++
G020R-N043R-N076D-A230E-H249R	+++
N018R-N043R-R045T-S242R	+++
G020R-S242R-H249R	+++
N018R-N043R-N076D-A230E-S242R-H249R	++
N018R-S024R-N076D	++
G020R-S024R-K27R-N043D-S242R-H249R	+++
N018R-G020R-S024R-N043D-N076D-S242R	++
N018R-N043R-N076D-S242R-H249R	+++
N018R-S024R-N043D-A230E-H249R	+++
N018R-G020R-N043D-H249R	++
N018R-G020R-N043D-R045T-N076D-S242R	+++
S024R-N043R-N076D-A230E-S242R	+++
G020R-S024R- T38I-N043R-R045T -N076D-S242R-H249R	+++
N018R-G020R-N043R	+++
N018R-S024R-R045T-A230E-S242R	++
N018R-G020R-H249R	+++
S024R-N043R-N076D	+++
N018R-G020R-S024R-N043R-R045T-N076D-H249R	++

TABLA 9-1: Rendimiento de limpieza BMI de variantes de GG36 de la biblioteca WCE2. IR = Índice de rendimiento relativo a GG36 IR > o = 1,5 es +++; IR entre 1,49 y 1,3 = ++; IR entre 1,29 y 1,0 = + en el detergente 36h o 36i	
Secuencia de variantes de GG36 (numeración BPN')	**IR relativo a GG36; ensayo BMI, Detergente 36h o 36i, 16 °C**
N018R-N043D-R045T-N076D-S242R-H249R	+++
S024R-N043D-S242R-H249R	+++
N018R-G020R-S024R-N043D-R045T-S242R	++
G020R-S024R-N043R-N076D	++
N018R-G020R-N043D-R045T-A230E-S242R	++
G020R-S024R-N043R-R045T-N076D-S242R-H249R	++
N018R-N043R-R045T-N076D-S242R	++
N018R-G020R-N043R-N076D-A230E-S242R	++
N018R-S024R-N043D-H249R	++
N018R-S024R-N043R-R045T-A230E-H249R	++
N018R-G020R-N043R-R045T-N076D-H249R	+++
N018R-S024R-S242R	++
N018R-N043R-R045T-N076D-A230E-S242R	++
R045T-S242R-H249R	+++
N018R-S024R-N043D-S242R	+++
N018R-G020R-N043D-R045T-S240P	++
S024R-N043R-R045T-S242R-H249R	++
N018R-S024R-V30S-L31S-D32I-T33Q-G34V-I35F	++
N018R-G020R-N043R-N076D	+++
G020R-N043D-R045T-N076D-S242R-H249R	++
N018R-S024R-N043D-A230E-S242R	++
N018R-S024R-N043D-S242R-H249R	+++
S024R-N043D-R045T-S242R-H249R	++
N043R-A230E-H249R	+

TABLA 9-1: Rendimiento de limpieza BMI de variantes de GG36 de la biblioteca WCE2. IR = Índice de rendimiento relativo a GG36 IR > o = 1,5 es +++; IR entre 1,49 y 1,3 = ++; IR entre 1,29 y 1,0 = + en el detergente 36h o 36i	
Secuencia de variantes de GG36 (numeración BPN')	**IR relativo a GG36; ensayo BMI, Detergente 36h o 36i, 16 °C**
N043R-A230E-H249R	+
G020R-S024R-N043D-N076D-H249R	++
S024R-R045T-S242R-A273V	+
G020R-S024R-R045T-N076D-S242R-H249R	+
N018R-S024R-N043D-N076D-S242R	+
N018R-N043R-N076D-A230E-H249R	+
N018R-G020R-N043R-R045T-H249R	+
N018R-N043R-R045T-A230E-S242R	+
G020R-S024R-N043D-R045T-A230E-S242R	+
N018R-N043D-A230E-H249R	+
N018R-N043R-N076D-S242R	+++
N018R-G020R-N076D	+
N018R-G020R-N043D-N076D-S242R-H249R	+
G020R-S024R-N043D-N076D-S242R-H249R	+++
N043D-S242R-H249R	+++
N018R-G020R-S024R-N043R-N076D	+
N018R-G020R-N043D-R045T-N076D-H249R	+
N018R-G020R-N043R-R045T-N076D-A230EH249R	+
N018R-N076D-S242R	+
G020R-N043R-H249R	+
N018R-N076D-S242R-H249R	+
N018R-S024R-R045T-A230E-H249R	+
A230E-H249R	+++
N018R-R045T-H249R	+

TABLA 9-1: Rendimiento de limpieza BMI de variantes de GG36 de la biblioteca WCE2. IR = Índice de rendimiento relativo a GG36 IR > o = 1,5 es +++; IR entre 1,49 y 1,3 = ++; IR entre 1,29 y 1,0 = + en el detergente 36h o 36i	
Secuencia de variantes de GG36 (numeración BPN')	**IR relativo a GG36; ensayo BMI, Detergente 36h o 36i, 16 °C**
G020R-N043R-N076D	+++
N043R-R045T-H249R	+++
N018R-N043D-N076D-S242R-H249R	+
N043R-N076D-H249R	+++
N018R-R045T	+
G020R-N076D-A230E-S242R	+
G020R-S024R-N043D-R045T	+++
S024R-N043D-N076D-S242R-H249R	+++
G020R-R045T-H249R	+
N043R-N076D-S153 A-H249R	+
N043R-N076D-A230E-H249R	+++
N018R-N043D-N076D-H249R	+
G020R-N043R-N076D-V227I	+

EJEMPLO 10

Construcción y rendimiento de limpieza del conjunto WCE3 de variantes de GG36

[0317] Este Ejemplo describe el conjunto WCE3 de mutantes basadas en las variantes de GG36, GG36-7 (Ejemplo 5) y GG36-9 (Ejemplo 4). Estas variantes son: S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N248D, S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R, S101G-S103A-V104I-G159R-A232V-Q245R-N248D, S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248R, S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N248R, S101G-S103A-V104I-G159R-A232V-Q245R-N248R, y S101G, S103A, V104I, A232V, Q236H, Q245R y N252K. Estas se crearon utilizando el kit de mutagénesis dirigida multisitio QUIKCHANGE® Lightning (kit QCLMS; Stratagene) con el plásmido pRA96 como el molde de ADN descrito en el Ejemplo 5. Las variantes generadas se evaluaron para limpieza en agua fría en el ensayo de micromuestras BMI (Ejemplo 1) utilizando detergentes descritos en la Tabla 1-2.

TABLA 10-1. Rendimiento de limpieza BMI de variantes WCE3. IR = Índice de rendimiento relativo a GG36 IR > o = 1,5 es +++; IR entre 1,49 y 1,3 = ++; IR entre 1,29 y 1,0 = + en el detergente 36h o 36i	
Secuencia de variantes de GG36 (numeración BPN')	**IR relativo a GG36; ensayo BMI, Detergente 36h o 36i, 16 °C**
S101G-S103A-V104I-A232V-Q236H-Q245R-N252K	++
S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N248R	++
S101G-S103A-V104I-G159R-A232V-Q245R-N248D	++

TABLA 10-1. Rendimiento de limpieza BMI de variantes WCE3. IR = Índice de rendimiento relativo a GG36 IR > o = 1,5 es +++; IR entre 1,49 y 1,3 = ++; IR entre 1,29 y 1,0 = + en el detergente 36h o 36i	
Secuencia de variantes de GG36 (numeración BPN')	**IR relativo a GG36; ensayo BMI, Detergente 36h o 36i, 16 °C**
S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248R	+
S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+
S101G-S 103A-V104I-G159D-A232V-Q245R	+
S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N248D	+

EJEMPLO 11

Construcción de bibliotecas y variantes adicionales de GG36

[0318] Este Ejemplo describe la construcción de bibliotecas y variantes de GG36 empleando una o más de las siguientes mutaciones: A16S, T22A, S24R, N62E, N76D, E89P, S101A/G, S103G/A, V104L/I, L111V, S128N, P129E, A232V, L148I, A158E, G159D/E, S166D, R186H, S188D, Y209E, Q236H, N238R, Q245R, N248D/R, H249R, N252K/R, T253R, E271F (numeración BPN') utilizando un plásmido de expresión de *B. subtilis* (por ejemplo, pHPLT-GG36; Fig. 2). Las variantes combinatorias se construyeron mediante DNA2.0, Inc., utilizando un plásmido de expresión de *B. subtilis* (por ejemplo, pHPLT-GG36; Fig. 2) y la cepa de *B. subtilis* (genotipo: ΔaprE, ΔnprE, amyE::xylRPxylAcomK-phleo). En el caso de bibliotecas de ADN, una reacción de ligación de cada una de las bibliotecas construidas utilizando un plásmido de expresión de *B. subtilis* (p. ej., pHPLT-GG36; Fig. 2) se transformó en la cepa de *B. subtilis* (genotipo: ΔaprE, ΔnprE, amyE::xylRPxylAcomK-phleo). Las variantes generadas que contenían una o más de las mutaciones listadas anteriormente se evaluaron para la limpieza en agua fría en el ensayo de micromuestras BMI (Ejemplo 1) empleando composiciones detergentes descritas en la Tabla 1-2.

TABLA 11-1. Rendimiento de limpieza BMI de variantes de la biblioteca NHJ6. IR = Índice de rendimiento IR > o = 1,5 es +++; IR entre 1,49 y 1,3 = ++; IR entre 1,29 y 1,0 = + en el detergente 36b, 36d o 36e	
Secuencia de variantes de GG36 (numeración BPN')	**IR relativo a GG36; ensayo BMI; Detergente 36b, 36d o 36e, 16 °C**
S101G-S103A-V104I-P129E-S188D-A232V-N238R-*Q245R-N248D*	+++
S024R-S101G-S*103A*-V104I-P129E-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	+++
T022A-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	+++
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	+++
S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	+++
S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	+++
S024R-S101G-S103A-V104I-S128N-P129E-A158E-A232V-Q245R-N248D-H249R	+++
S024R-S101G-S103A-V104I-L148I-A158E-S188D-A232V-	+++

TABLA 11-1. Rendimiento de limpieza BMI de variantes de la biblioteca NHJ6. IR = Índice de rendimiento IR > o = 1,5 es +++; IR entre 1,49 y 1,3 = ++; IR entre 1,29 y 1,0 = + en el detergente 36b, 36d o 36e	
Secuencia de variantes de GG36 (numeración BPN')	**IR relativo a GG36; ensayo BMI; Detergente 36b, 36d o 36e, 16 °C**
Q245R-N248D	
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	+++
S024R-S101G-S103A-V104I-S128N-P129E-A232V-Q245R-N248D	+++
S101G-S103A-V104I-P129E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	+++
S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-A232V-Q245R-N248D-H249R	+++
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	+++
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-G159E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D	+++
S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-L148I-A158E-A232V-Q245R-N248D	+++
A016S-S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	+++
S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R	+++
T022A-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-G159E-A232V-N238R-Q245R-N248D	+++
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R	+++
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-S128N-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D	+++
S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-S188D-A232V-Q245R-N248D	+++
T022A-S024R-S10 1 G-S 103 A-V104I-P129E-A158E-A232V-Q245R-N248D	+++
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A232V-Q245R-N248D	+++
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-S188D-A232V-Q245R-N248D	+++
S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D	+++

TABLA 11-1. Rendimiento de limpieza BMI de variantes de la biblioteca NHJ6. IR = Índice de rendimiento IR > o = 1,5 es +++; IR entre 1,49 y 1,3 = ++; IR entre 1,29 y 1,0 = + en el detergente 36b, 36d o 36e	
Secuencia de variantes de GG36 (numeración BPN')	**IR relativo a GG36; ensayo BMI; Detergente 36b, 36d o 36e, 16 °C**
T022A-S101G-S103A-V104I-S128N-P129E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D	+++
S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D	+++
S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D	+++
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-S128N-S188D-A232V-Q245R-N248D	+++
S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D	+++
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-S128N-P129E-A158E-A232V-Q245R-N248D	+++
S024R-S101G-SI03A-V104I-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D	+++
T022A-S101G-S103A-V104I-S128N-P129E-A232V-N238R-Q245R-N248D	+++
S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-G159E-A232V-Q245R-N248D	+++
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D	+++
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D	+++
S024R-S101G-S103A-V104I-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	+++
T022A-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-A232V-N238R-Q245R-N248D	+++
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-A232V-Q245R-N248D-H249R	+++
S024R-S101G-S103A-V104I-L148I-A158E-A232V-Q245R-N248D	+++
T022A-S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	+++
T022A-S101G-S103A-V1041-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D	+++

TABLA 11-1. Rendimiento de limpieza BMI de variantes de la biblioteca NHJ6. IR = Índice de rendimiento IR > o = 1,5 es +++; IR entre 1,49 y 1,3 = ++; IR entre 1,29 y 1,0 = + en el detergente 36b, 36d o 36e	
Secuencia de variantes de GG36 (numeración BPN')	**IR relativo a GG36; ensayo BMI; Detergente 36b, 36d o 36e, 16 °C**
T022A-S101G-S103A-V104I-P129E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D	+++
S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	+++
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D	+++
S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	+++
S024R-S101G-S103A-V104I-S128N-A158E-A232V-Q245R-N248D	+++
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-S128N-P129E-S188D-A232V-Q245R-N248D	+++
T022A-S101G-S103A-V104I-P129E-G159E-A232V-N238R-Q245R-N248D	+++
S101G-S103A-V104I-P129E-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R	+++
T022A-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-A232V-Q245R-N248D-H249R	++
S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-L148I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D	++
T022A-S101G-S103A-V104I-P129E-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R	++
S024R-S101G-S103A-V104I-G159E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D	++
S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R	++
S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-G159E-A232V-N238R-Q245R-N248D	++
S024R-S101G-S103A-V104I-S128N-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D	++
T022A-S101G-S103A-V104I-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	++
S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-G159E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D	++

TABLA 11-1. Rendimiento de limpieza BMI de variantes de la biblioteca NHJ6. IR = Índice de rendimiento IR > o = 1,5 es +++; IR entre 1,49 y 1,3 = ++; IR entre 1,29 y 1,0 = + en el detergente 36b, 36d o 36e	
Secuencia de variantes de GG36 (numeración BPN')	**IR relativo a GG36; ensayo BMI; Detergente 36b, 36d o 36e, 16 °C**
S101G-S103A-V104I-A158E-A232V-N238R-Q245R-N248D	++
T022A-S101G-S103A-V104I-P129E-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	++
S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-L148I-S188D-A232V-Q245R-N248D	++
S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-A232V-Q245R-N248D-H249R	++
T022A-S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-A232V-N238R-Q245R-N248D	++
S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-A232V-N238R-Q245R-N248D	++
T022A-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R	++
S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D	++
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-G159E-A232V-Q245R-N248D	++
S 1 01G-S103A-V104I-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D	++
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-A232V-Q245R-N248D-H249R	++
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-L148I-A158E-A232V-Q245R-N248D	++
S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-G159E-A232V-N238R-Q245R-N248D	++
T022A-S101G-S103A-V104I-G159E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D	++
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	++
T022A-S101G-S103A-V104I-P129E-A232V-N238R-Q245R-N248D	++
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	++
S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R	++

TABLA 11-1. Rendimiento de limpieza BMI de variantes de la biblioteca NHJ6. IR = Índice de rendimiento IR > o = 1,5 es +++; IR entre 1,49 y 1,3 = ++; IR entre 1,29 y 1,0 = + en el detergente 36b, 36d o 36e	
Secuencia de variantes de GG36 (numeración BPN')	**IR relativo a GG36; ensayo BMI; Detergente 36b, 36d o 36e, 16 °C**
T022A-S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R	++
S101G-S103A-V104I-P129E-S188D-A232V-Q245R-N248D	++
S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-G159E-A232V-N238R-Q245R-N248D	++
S101G-S103A-V104I-S128N-P129E-A232V-Q245R-N248D	++
S101G-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D	++
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A232V-Q245R-N248D-H249R	++
S101G-S103A-V104I-P129E-G159E-A232V-N238R-Q245R-N248D	++
S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D	++
S024R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N248D-H249R	++
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-L148I-A232V-Q245R-N248D	++
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-A232V-N238R-Q245R-N248D	++
S101G-S103A-V104I-S128N-P129E-A232V-N238R-Q245R-N248D	++
T022A-S101G-S103A-V104I-S128N-G159E-A232V-Q245R-N248D	+
T022A-S101G-S103A-V104I-S128N-P129E-A158E-A232V-N238R-Q245R-N248D	+
S101G-S103A-V104I-S128N-P129E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	+
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-S128N-P129E-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	+
S024R-S101G-S103A-V104I-S128N-A158E-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D	+
T022A-S024K-S101G-S103A-V104I-S128N-A158E-G159E-A232V-Q245R-N248D	+
S101G-S103A-V104I-P129E-L148I-S188D-A232V-Q245R-	+

TABLA 11-1. Rendimiento de limpieza BMI de variantes de la biblioteca NHJ6. IR = Índice de rendimiento IR > o = 1,5 es +++; IR entre 1,49 y 1,3 = ++; IR entre 1,29 y 1,0 = + en el detergente 36b, 36d o 36e	
Secuencia de variantes de GG36 (numeración BPN')	**IR relativo a GG36; ensayo BMI; Detergente 36b, 36d o 36e, 16 °C**
N248D	
S024R-S101G-S103A-V104I-L148I-A232V-Q245R-N248D	+
T022A-S101G-S103A-V104I-L148I-S188D-A232V-Q245R-N248D	+
S024R-S101G-S103A-V104I-S128N-P129E-S188D-A232V-Q245R-N248D	+
S101G-S103A-V104I-S128N-P129E-A158E-A232V-N238R-Q245R-N248D	+
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-L148I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D	+
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-L148I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D	+
S101G-S103A-V104I-L148I-G159E-A232V-Q245R-N248D	+
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D	+
S101G-S103A-V104I-S128N-P129E-A158E-A232V-Q245R-N248D-H249R	+

TABLA 11-2. Rendimiento de limpieza BMI de variantes de la biblioteca NHJ6. IR = Índice de rendimiento IR > o = 1,5 es +++; IR entre 1,49 y 1,3 = ++; IR entre 1,29 y 1,0 = +	
Secuencia de variantes de GG36 (numeración BPN')	**IR relativo a GG36; ensayo BMI, Detergente 36g, 16 °C**
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-A232V-Q245R-N248D-H249R	+++
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A232V-Q245R-N248D-H249R	+++
S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-A232V-N238R-Q245R-N248D	+++
S024R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N248D-H249R	+++
S101G-S 103A-V104I-A158E-A232V-Q245R-N248D-H249R	+++
S101G-S103A-V104I-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	+++
S024R-S101G-S103A-V104I-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	+++

TABLA 11-2. Rendimiento de limpieza BMI de variantes de la biblioteca NHJ6. IR = Índice de rendimiento IR > o = 1,5 es +++; IR entre 1,49 y 1,3 = ++; IR entre 1,29 y 1,0 = +	
Secuencia de variantes de GG36 (numeración BPN')	**IR relativo a GG36; ensayo BMI, Detergente 36g, 16 °C**
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-A232V-N238R-Q245R-N248D	+++
S024R-S101G-S103A-V104I-G159E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D	+++
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A232V-Q245R-N248D	+++
S024R-S101G-S103A-V104I-L148I-A232V-Q245R-N248D	+++
S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-A232V-Q245R-N248D-H249R	++
S024R-S101G-S103A-V104I-L148I-A158E-A232V-Q245R-N248D	++
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-A232V-Q245R-N248D-H249R	++
A016S-S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	++
S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-G159E-A232V-N238R-Q245R-N248D	++
S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	++
T022A-S 101G-S103A-V104I-P129E-A232V-N238R-Q245R-N248D	++
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-L148I-A158E-A232V-Q245R-N248D	+
S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D	+
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D	+
T022A-S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-A232V-N238R-Q245R-N248D	+
T022A-S024R-S 101G-S103A-V104I-P129E-A158E-A232V-Q245R-N248D	+
S101G-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	+
T022A-S 101G-S103A-V104I-A158E-G159E-A232V-Q245R-	+

TABLA 11-2. Rendimiento de limpieza BMI de variantes de la biblioteca NHJ6. IR = Índice de rendimiento IR > o = 1,5 es +++; IR entre 1,49 y 1,3 = ++; IR entre 1,29 y 1,0 = +	
Secuencia de variantes de GG36 (numeración BPN')	**IR relativo a GG36; ensayo BMI, Detergente 36g, 16 °C**
N248D-H249R	
S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-A232V-Q245R-N248D	+

TABLA 11-3. Rendimiento de limpieza BMI de variantes combinatorias NHJ7. IR = Índice de rendimiento IR > o = 1,5 es +++; IR entre 1,49 y 1,3 = ++; IR entre 1,29 y 1,0 = + en el detergente 36b, 36d o 36e	
Secuencia de variantes de GG36 (numeración BPN')	**IR relativo a GG36; ensayo BMI, Detergente 36b, 36d o 36e, 16 °C**
V104L-S128N-A158E-R186H-H249R	+++
S128N-A158E-S188D-H249R	+++
N062E-S128N-A158E-G159E-E271F	+++
N062E-A158E-S188D-H249R-E271F	+++
N062E-A158E-R186H-H249R-E271F	+++
S128N-A158E-S188D-Y209E-E271F	+++
N062E-G159E-S188D-H249R	+++
A016S-N062E-A158E-R186H-H249R	+++
N062E-A158E-G159E-H249R	+++
S101A-S128N-A158E-Y209E-H249R	+++
S128N-A158E-R186H-E271F	+++
N062E-A158E-S188D-H249R	+++
N062E-A158E-R186H-E271F	+++
N062E-A158E-R186H-H249R	+++
N062E-S101A-R186H-H249R	+++
N062E-S101A-A158E-R186H-E271F	+++
N062E-V104L-A158E-S188D-H249R-E271F	+++
N062E-G159E-R186H-H249R	+++
N062E-G159E-H249R	+++

TABLA 11-3. Rendimiento de limpieza BMI de variantes combinatorias NHJ7. IR = Índice de rendimiento IR > o = 1,5 es +++; IR entre 1,49 y 1,3 = ++; IR entre 1,29 y 1,0 = + en el detergente 36b, 36d o 36e	
Secuencia de variantes de GG36 (numeración BPN')	**IR relativo a GG36; ensayo BMI, Detergente 36b, 36d o 36e, 16 °C**
S128N-A158E-R186H-H249R	+++
S128N-A158E-S188D-E271F	+++
N062E-AI58E-H249R	+++
N062E-R186H-S188D-H249R-E271F	+++
S128N-A158E-Y209E-	+++
N062E-S101A-A158E-H249R	+++
V104L-S128N-A158E-R186H-E271F	+++
N062E-S101A-A158E-R186H-H249R-E271F	+++
A016S-N062E-A158E-H249R	+++
N062E-S101A-G159E-H249R	+++
S128N-A158E-R186H-S188D-E271F	+++
S101A-S128N-A158E-R186H-E271F	+++
N062E-S101A-S188D-H249R	+++
S101A-V104L-A158E-R186H-S188D-H249R	+++
N062E-G159E-H249R-E271F	+++
S128N-A158E-G159E-E271F	+++
A016S-N062E-V104L-A158E-R186H-E271F	+++
T022A-S 128N-A158E-H249R	+++
S128N-A158E-H249R	+++
N062E-S101A-V104L-A158E-R186H-E271F	+++
A016S-N062E-A158E-R186H-E271 F	+++
V104L-S128N-A158E-H249R	+++
V104L-S128N-A158E-S188D-H249R	+++
T022A-N062E-A158E	+++
N062E-S101A-S188D-H249R-E271F	+++

TABLA 11-3. Rendimiento de limpieza BMI de variantes combinatorias NHJ7. IR = Índice de rendimiento IR > o = 1,5 es +++; IR entre 1,49 y 1,3 = ++; IR entre 1,29 y 1,0 = + en el detergente 36b, 36d o 36e	
Secuencia de variantes de GG36 (numeración BPN')	**IR relativo a GG36; ensayo BMI, Detergente 36b, 36d o 36e, 16 °C**
N062E-A158E-H249R-E271F	++
V104L-S128N-A158E-R186H-S188D-E271F	++
N062E-S101A-R186H-E271F	++
N062E-V104L-G159E-H249R	++
N062E-R186H-H249R	++
N062E-S101A-R186H-H249R-E271F	++
S101A-A158E-R186H-S188D-H249R	++
N062E-S101A-R186H	++
S101A-S128N-P129E-R186H-H249R	++
S101A-S103G-A158E-R186H-H249R	++
A016S-N062E-V104L-R186H-S188D-E271F	++
V104L-A158E-R186H-H249R	++
S101A-S128N-A158E-S188D-Y209E-E271F	++
N062E-S101A-R186H-S188D-E271F	++
A016S-N062E-A158E-H249R-E271F	++
N062E-S128N-A158E	++
N062E-S128N-G159E-H249R	++
N062E-S101A-A158E-S188D-H249R	++
S101A-S128N-A158E-H249R	++
N062E-A158E-R186H-S188D-H249R	++
A016S-V104L-A158E-R186H-E271F	++
N062E-L148I-G159E	++
N062E-S101A-A158E-R186H-H249R	++
N062E-S101A-R186H-S188D-H249R	++
V104L-A158E-R186H-S188D-H249R	++

TABLA 11-3. Rendimiento de limpieza BMI de variantes combinatorias NHJ7. IR = Índice de rendimiento IR > o = 1,5 es +++; IR entre 1,49 y 1,3 = ++; IR entre 1,29 y 1,0 = + en el detergente 36b, 36d o 36e	
Secuencia de variantes de GG36 (numeración BPN')	**IR relativo a GG36; ensayo BMI, Detergente 36b, 36d o 36e, 16 °C**
N062E-S101A-V104L-R186H-S188D-E271F	++
T022A-S101A-A158E-R186H-H249R	++
S101A-S128N-A158E-Y209E	++
A158E-R186H-S188D-H249R-E271F	++
V104L-A158E-R186H-S188D-H249R-E271F	++
S101A-V104L-A158E-R186H-H249R	++
V104L-A158E-H249R	++
S101A-V104L-S128N-A158E-R186H-E271F	++
A016S-V104L-S188D-H249R	++
S101A-V104L-A158E-R186H-S188D-E271F	++
V104L-S128N-G159E-E271F	++
V104L-A158E-R186H-H249R-E271F	++
A158E-R186H-H249R	++
S101A-A158E-R186H-H249R	++
V104L-A158E-S188D-H249R-E271F	++
A016S-S128N-A158E-R186H	++
V104L-S128N-R186H-S188D-H249R	++
A016S-S101A-S128N-R186H	++
A016S-N062E-S128N-R186H-E271F	++
A016S-S128N-R186H-E271F	+
S128N-P129E-R186H	+
A158E-R186H-H249R-E271F	+
A016S-A158E-H249R	+
A016S-A158E-R186H-H249R	+
A016S-T022A-A158E-R186H-E271F	+

TABLA 11-3. Rendimiento de limpieza BMI de variantes combinatorias NHJ7. IR = Índice de rendimiento IR > o = 1,5 es +++; IR entre 1,49 y 1,3 = ++; IR entre 1,29 y 1,0 = + en el detergente 36b, 36d o 36e	
Secuencia de variantes de GG36 (numeración BPN')	**IR relativo a GG36; ensayo BMI, Detergente 36b, 36d o 36e, 16 °C**
E089P-S101A-P129E-R186H	+
T022A-S128N-A158E-R186H	+
S101A-V104L-S128N-A158E-R186H	+
T022A-S128N-R186H-S188D-	+
N062E-V104L-A158E-R186H-S188D-H249R	+
T022A-A158E-R186H-H249R-E271F	+
T022A-V104L-A158E-H249R	+
S101A-L111V-P129E	+
A016S-A158E-H249R-E271F	+
A016S-L111V-S188D-	+
T022A-V 104L-R186H-S188D-H249R	+
V104L-L148I-S188D-H249R	+

EJEMPLO 12

Construcción de bibliotecas y variantes adicionales de GG36

[0319] Este Ejemplo describe la construcción de bibliotecas y variantes de GG36 en *B. subtilis* utilizando una o más de las siguientes mutaciones (numeración BPN'): A1R, Q2S, Q2M, Q2A, Q2R, Q2W, S3R, V4R, V4S, V4C, I8A, S9A, S9F, S9W, R10S, R10A, R10H, R10M, Q12F, Q12R, P14K, P14F, P14Q, A15R, A15F, A16S, H17R, H17M, H17F, N18R, N18K, G20F, G20K, G20R, T22A, T22R, T22Y, T22V, T22Q, T22L, T22W, G23A, G23S, G23F, S24R, S24F, S24W, S24Q, S24H, S24L, G25V, G25F, G25R, V26F, K27L, K27F, K27R, K27V, V28A, V28N, V28E, A29T, V30E, L31F, T33S, T33G, T33D, G34P, I35M, S36T, S36F, S36R, T38L, T38F, T38R, P40N, P40L, P40T, P40W, P40H, P40R, L42I, N43A, N43F, N43I, N43S, N43R, N43M, N43W, N43D, R45T, G46R, A48R, F50C, V51W, V51F, V51H, P52F, P52E, P52N, P55Y, T57R, Q59A, Q59F, Q59R, D60P, D60Q, D60A, N62E, N62Q, G63V, G63M, G63T, G63I, G63A, G63S, G63H, G63Q, G63D, G63E, G63P, H64F, H64T, V68A, V68C, A69N, A69T, A69P, A69W, T71G, I72C, A74C, L75A, L75F, L75E, L75R, N76D, S78R, S78N, S78I, I79W, I79Q, V81R, L82F, L82T, L82V, L82R, L82M, A85M, P86W, P86L, P86I, E89P, E89T, E89G, E89H, E89L, E89V, E89W, E89F, E89I, Y91N, Y91F, A92F, K94N, S99F, S99T, S99P, S99G, S99M, G100S, G100N, G100Q, G100I, S101A, S101N, S101G, S101T, S101D, S101E, S101P, S101F, G102A, G102T, G102N, G102H, G102E, S103G, S103N, S103D, S103A, V104L, V104I, V104E, V104D, S105T, S105E, S105Q, S106G, S106T, S106E, S106D, S106A, S106V, S106F, I107M, I107F, A108I, A108G, Q109M, L111V, L111I, E112V, E112L, E112Q, A114G, G115K, G115R, N116K, N116A, N116L, N117F, G118R, G118I, M119C, H120A, H120F, H120R, V121F, V121E, N123G, N123E, L124S, S128D, S128F, S128L, S128N, S128H, S128M, S128I, S128Q, P129E, S132A, S132E, A138G, S144R, V147L, L148I, A158E, G159D, G159E, G159C, S160D, S166D, S166E, Y167W, M175V, V177C, D181A, Q182R, N183I, N183D, N183M, N183F, N183R, N185E, N185V, N185I, R186H, R186K, S188E, S188D, S188R, Y192H, Y192W, A194E, A194V, A194F, D197F, I198L, I198F, V203E, V203C, T208S, Y209S, Y209N, Y209F, Y209T, Y209E, Y209H, Y209G, Y209L, P210R, P210V, P210L, G211Q, G211R, S212I, S212M, S212F, T213A, Y214F, A215N, A215D, A215E, A215H, A215F, S216F, S216A, L217E, L217N, L217D, N218D, N218P, N218E, T224A, T224G, V227I, A230E, A231I, A231C, A232V, L233C, V234F, K235F, Q236F, Q236N, Q236H, N238R, N238K, N238L, P239K, P239G, P239R, P239H, P239T, P239N, P239S, P239F, S240R, W241R, S242L, S242R, N243F, N243R, V244R, Q245R, I246S, N248D, N248V, N248I, N248R, H249R, H249T, L250I, K251R, K251S, N252I, N252F, N252R, N252K, N252H, T253I, T253R, T253F, A254C, S256N, G258R, T260V, T260I,

L262D, L262H, Y263F, S265F, L267V, L267N, L267M, N269I, N269R, A270C, E271I, E271V, E271H, E271M, E271L, E271P, E271A, E271F, E271T, A272F, A272F, A272R, A273F, A273I y T274G. Las variantes y bibliotecas se construyeron mediante DNA2.0, Inc., conforme a lo descrito en el Ejemplo 11. Las variantes generadas que contenían una o más de estas mutaciones se evaluaron para la limpieza en agua fría en el ensayo de micromuestras BMI (Ejemplo 1) y las composiciones detergentes descritas en la Tabla 1-2.

TABLA 12-1: Rendimiento de limpieza BMI de variantes WCE6 y WCE8.
IR = Índice de rendimiento
IR > o = 1,5 es +++; IR entre 1,49 y 1,3 = ++; IR entre 1,29 y 1,0 = + en el detergente 36k o 36l

Secuencia de variantes de GG36 (numeración BPN')	IR relativo a GG36; ensayo BMI, Detergente 36k o 36l, 16 °C
A001R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+++
V004R-S101G-S 103A-V104I-A232V-Q245R	+++
N043R-S 101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-E271L	+++
S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+++
V004R-N043R-S 101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+++
N018R-N043R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+++
G020R-S 101G-S 103A-V104I-A232V-Q245R	+++
S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-E271L	+++
G020R-N043R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+++
S024R-N043R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+++
G020R-G025R-N116A-Y167W	+++
N018R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+++
T022R-S101G-S 103A-V104I-A232V-Q245R	+++
S078R-S103N-S106G-Y167W-Q236N	+++
N018R-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V -Q245R-N269R	+++
N043R-S101G-S 103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	+++
S024R-S101A-H120F-A194F-H249R	+++
G020R-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	+++
S101G-S103A-V104I-S212F-A232V-Q245R	+++
G020R-S144R-N185I-L233C-Q236N	+++
G023A-S078R-S216F-Q236N-H249R	+++

TABLA 12-1: Rendimiento de limpieza BMI de variantes WCE6 y WCE8. IR = Índice de rendimiento IR > o = 1,5 es +++; IR entre 1,49 y 1,3 = ++; IR entre 1,29 y 1,0 = + en el detergente 36k o 36l	
Secuencia de variantes de GG36 (numeración BPN')	**IR relativo a GG36; ensayo BMI, Detergente 36k o 36l, 16 °C**
S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	+++
S101G-S103A-V104I-G115R-A232V-Q245R	+++
P052N-S078R-S 103N-L148I-T213A	+++
N018R-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R	+++
S024R-N043D-S 101G-S 103A-V104I-A232V-Q245R-H249R	+++
S024R-N043D-S 101G-S 103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	+++
G025R-E089I-N116A-P239S-A270C	+++
S024R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+++
L148I-T213A-N252R	+++
S024R-G025R-N183D-Y192W-P239S	+++
G046R-A194F-S212M	+++
V104L-L217E-T224A-H249R-N252R	+++
G023A-Y091F-V121F-Y192W-Q236N	+++
S101G-S103A-V104I-A232V-V244R-Q245R	+++
S099F-S144R-Y167W-N252R	+++
S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R	+++
N043R-S101G-S 103A-V104I-A232V-Q245R	+++
T022W-S078R-Y167W-S212M-A270C	+++
V121F-N252R-A270C	+++
G020R-S103N-S216F-Q236N-N252R	+++
N043R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R	+++
G023A-P052N-Y192W-I198L-N252R	+++
G025R-G046R-V121F	+++

TABLA 12-1: Rendimiento de limpieza BMI de variantes WCE6 y WCE8. IR = Índice de rendimiento IR > o = 1,5 es +++; IR entre 1,49 y 1,3 = ++; IR entre 1,29 y 1,0 = + en el detergente 36k o 36l	
Secuencia de variantes de GG36 (numeración BPN')	**IR relativo a GG36; ensayo BMI, Detergente 36k o 36l, 16 °C**
S024R-S078R-V104L-N116A-N183D	+++
G046R-Q059A-S103N-G211Q-S212M	+++
G020R-P052N-N062Q-Y091F-Y192W	+++
G023A-P052N-S144R-Y192W-S216F	+++
S101G-S103A-V104I-A232V-S242R-Q245R	+++
P052N-S103N-N116A-L148I-Y192W	+++
E089I-N116A-N117F-T224A-H249R	+++
S144R-G211Q-N238L-P239S-H249R	+++
N043A-N062Q-A194F-G211Q	+++
G020R-S024R-P052N-Q059A-S216F	+++
S024R-Y167W-T224A-H249R	+++
T057R-Y167W-H249R	+++
G025R-S103N-R186K-A194F-T224A	+++
S105T-S128N-S144R-L148I-S212M	+++
G020R-Q059A-S144R-Y192W-T224A	+++
S024R-N043A-N117F-A194F-G211Q	+++
N117F-A194F-T213A-A270C	+++
S078R-Y091F-V121F-L233C-N252R	+++
T057R-S099F-S105T-I198L-T213A	+++
G023A-Y091F-S101A-I198L-N252R	+++
N062Q-S 103N-V121F-S144R-H249R	+++
N043R-S101G-S 103A-V104I-A232V-S242R-Q245R	+++
G023A-S024R-N117F-S212M-S216F	+++
V104L-T213A-S216F	+++
A194F-G211Q-Q236N	+++

TABLA 12-1: Rendimiento de limpieza BMI de variantes WCE6 y WCE8. IR = Índice de rendimiento IR > o = 1,5 es +++; IR entre 1,49 y 1,3 = ++; IR entre 1,29 y 1,0 = + en el detergente 36k o 36l	
Secuencia de variantes de GG36 (numeración BPN')	**IR relativo a GG36; ensayo BMI, Detergente 36k o 36l, 16 °C**
N062Q-S103N-N117F-A194F	+++
S024R-N062Q-V104L-S106G-H249R	+++
T057R-E089I-I198L	+++
G046R-Q059A-S106G-L217E-H249R	+++
N117F-T213A-A215F	+++
S101A-H120F-Y192W-A215F-T224A	+++
N043A-T057R-N117F-S144R-N183D	+++
G046R-N183D-N238L	+++
G025R-N043A-E089I-N117F	+++
S078R-V104L-T213A-A215F-T224A	+++
Y091F-S099F-S101A-S105T-Y167W	+++
S106G-N117F-N238L	+++
G046R-E089I-Y091F-S101A-N116A	+++
G020R-N062Q-E089I-R186K-S212M	+++
T057R-S099F-V121F-N185I-Y192W	+++
G046R-E089I-Y192W-L233C-A270C	+++
E089I-N117F-N185I-A215F-L233C	++
P052N-V104L-N183D-S216F-H249R	++
S078R-S099F-N116A-R186K-T224A	++
G025R-S 105T-S 128N-S144R-A270C	++
S105T-G211Q-S216F	++
S024R-G046R-Y091F-V121F	++
S106G-N185I-S216F-Q236N	++
N062Q-S101A-Q236N-N252R-A270C	++
G025R-N043A-Y091F-I198L-A270C	++

TABLA 12-1: Rendimiento de limpieza BMI de variantes WCE6 y WCE8. IR = Índice de rendimiento IR > o = 1,5 es +++; IR entre 1,49 y 1,3 = ++; IR entre 1,29 y 1,0 = + en el detergente 36k o 36l	
Secuencia de variantes de GG36 (numeración BPN')	**IR relativo a GG36; ensayo BMI, Detergente 36k o 36l, 16 °C**
G020R-G023A-V104L-Y192W-L233C	++
S024R-N043A-S 105T-S 106G-I198L	++
G020R-E089I-L217E	++
S024R-Y091F-I198L-A215F-P239S	++
G046R-E089I-S099F-R186K-S212M	++
V104L-H120F-R186K-S216F-N252R	++
T022W-A194F-T213A-L233C-N238L	+
S099F-S105T-S106G-A194F-S212M	+
E089I-S105T-N116A-A215F-S216F	+
G025R-N116A-H120F-T224A-A270C	+
N043A-Q059A-S101A-S216F-T224A	+
T057R-N183D-Q236N	+
G025R-N062Q-S128N-S144R-N185I	+
S103N-H120F-Y167W-I198L-L233C	+
T022W-E089I-S216F	+
S024R-S106G-N116A-S212M-T224A	+
G020R-P052N-S101A-I198L-L233C	+
E089I-Y091F-N185I-G211Q-A270C	+
L111I-A215F-P239S	+
S024R-N116A-R186K-L233C-Q236N	+
G023A-S103N-S106G-S212M-A215F	+

TABLA 12-2: Rendimiento de limpieza BMI de variantes de la biblioteca WCE10 a WCE14. IR = Índice de rendimiento IR > o = 1,5 es +++; IR entre 1,49 y 1,3 = ++; IR entre 1,29 y 1,0 = + en el detergente 36k o 36l	
Secuencia de variantes de GG36 (numeración BPN')	**IR relativo a GG36; ensayo BMI, Detergente 36k o 361, 16 °C**
G020R-T022W-S078R-S101A-S103A-V104I-N116S-	+++

TABLA 12-2: Rendimiento de limpieza BMI de variantes de la biblioteca WCE10 a WCE14. IR = Índice de rendimiento IR > o = 1,5 es +++; IR entre 1,49 y 1,3 = ++; IR entre 1,29 y 1,0 = + en el detergente 36k o 36l	
Secuencia de variantes de GG36 (numeración BPN')	**IR relativo a GG36; ensayo BMI, Detergente 36k o 361, 16 °C**
T213A-A215F-A232V-Q245R	
N018R-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+++
S024R-R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	+++
G020R-T022W-S078R-S101G-S103A-V104I-N116A-A232V-Q245R	+++
G020R-T22W-S 1 01G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+++
N018R-N043R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+++
N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-A232V-Q245R	+++
N018R-V104I-A232V-H249R	+++
N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-G211Q-H249R	+++
N018R-N043D-S078R-S101G-S103A-V104I-L217E-A232V-Q245R	+++
N018R-N043R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	+++
N018R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	+++
N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	+++
G020R-N043D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+++
N018R-N043D-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	+++
S024R-R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	+++
N018R-S 103A-A232V-H249R	+++
N018R-S101G-V104I-A232V-Q245R	+++
G020R-S024R-S 1 01G-S103A-V104I-L217E-A232V-Q245R-H249R	+++
N018R-T22K-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+++
N043R-R045T-S101G-S 103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	+++
G020R-T22W-S101G-S103A-V104I-G211Q-A232V-Q245R	+++
S024R-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	+++
G020R-T22W-S078R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-A232V	+++
N018R-S024R-N076D-N116A-A215F-H249R	+++
N018R-N043R-R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+++

TABLA 12-2: Rendimiento de limpieza BMI de variantes de la biblioteca WCE10 a WCE14. IR = Índice de rendimiento IR > o = 1,5 es +++; IR entre 1,49 y 1,3 = ++; IR entre 1,29 y 1,0 = + en el detergente 36k o 36l	
Secuencia de variantes de GG36 (numeración BPN')	**IR relativo a GG36; ensayo BMI, Detergente 36k o 361, 16 °C**
S024R-N043R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+++
G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+++
G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-G211Q-A232V-Q245R	
G020R-T022W-S078R-S101G-S103A-V104I-N116A-T213A-A215F-A232V-Q245R	+++
N043D-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	+++
N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-T213A-H249R	+++
N018R-S024R-N076D-N116A-G211Q-H249R	+++
N043R-R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+++
N018R-S101G-Q245R	+++
G020R-T22W-S101A-S103A-V104I-G211Q-T213A-A232V-Q245R	+++
G020R-S024R-N043D-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+++
N018R-R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+++
G020R-S078R-S101G-S103A-V104I-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R	+++
R045T-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	+++
S024R-N043D-S 101G-S 103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	+++
N018R-S101G-S103A-H249R	+++
N018R-T22W-S024R-N076D-S101A-N116A-A232V-Q245R	+++
N018R-S101G-V104I-A232V-H249R	+++
G020R-T22W-S 1 01A-S103A-V104I-A215F-A232V-Q245R	+++
N018R-S024R-N076D-G211Q-T213A-H249R	+++
N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-I198L-H249R	+++
S024R-S 1 01G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+++
G020R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	+++
G020R-S 101G-S 103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	+++
N043D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+++
G020R-S101G-V104I-T213A-A215F-A232V-Q245R	+++
G020R-S101G-S103A-V104I-N116A-A215F-A232V-Q245R	+++
S024R-S103A-V104I-H249R	+++

TABLA 12-2: Rendimiento de limpieza BMI de variantes de la biblioteca WCE10 a WCE14. IR = Índice de rendimiento IR > o = 1,5 es +++; IR entre 1,49 y 1,3 = ++; IR entre 1,29 y 1,0 = + en el detergente 36k o 36l	
Secuencia de variantes de GG36 (numeración BPN')	**IR relativo a GG36; ensayo BMI, Detergente 36k o 361, 16 °C**
N018R-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+++
R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	+++
S024R-S101G-V104I-Q245R	+++
G020R-S101G-S103A-V104I-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R	+++
S024R-S103A-V104I-A232V-H249R	+++
N018R-S024R-N076D-N116A-G211Q-A215F-H249R	+++
N018R-Q245R	+++
S024R-S103A-Q245R	+++
S024R-S103A-V104I-Q245R	+++
G020R-S078R-S101G-A232V-Q245R	+++
N018R-S024R-N076D-V104I-H249R	+++
N018R-S024R-V104I-H249R	+++
S024R-S 1 01G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+++
N018R-S024R-N076D-G211Q-A215F-H249R	+++
R019H-G020R-T022W-S078R-S101G-S103A-V104I-G211Q-A232V-Q245R	+++
N018R-S024R-N076D-S101A-I198L-G211Q-T213A-H249R	+++
N018R-S024R-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+++
G020R-T22W-S103A-V104I-A232V-Q245R	+++
N018R-S103A-V104I-H249R	+++
N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-I198L-A215F-H249R	+++
N018R-S024R-S101G-V104I-A232V	+++
S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	+++
S024R-N043R-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+++
N018R-G020R-N043D-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+++
N018R-T22W-S024R-N076D-N116A-T213A-H249R	+++
N018R-S024R-S101G-V104I	+++
G020R-S101A-S103A-V104I-A215F-A232V-Q245R	+++
N018R-R045T-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+++
N018R-S101G-S103A-Q245R	+++
N043R-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+++

TABLA 12-2: Rendimiento de limpieza BMI de variantes de la biblioteca WCE10 a WCE14. IR = Índice de rendimiento IR > o = 1,5 es +++; IR entre 1,49 y 1,3 = ++; IR entre 1,29 y 1,0 = + en el detergente 36k o 36l	
Secuencia de variantes de GG36 (numeración BPN')	**IR relativo a GG36; ensayo BMI, Detergente 36k o 361, 16 °C**
G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-G211Q-A215F-A232V-Q245R	+++
G020R-T22W-S078R-S101G-S103A-V104I-N116A-T213A-A215F-A232V-Q245R	+++
G020R-S078R-S101G-S103A-V104I-A215F-A232V-Q245R	+++
G020R-T022W-S078R-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-A232V-Q245R	+++
N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+++
N076D-S 101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	+++
G020R-T22W-S 1 01A-S103A-V104I-A232V-Q245R	+++
G020R-S101G-S103A-A232V-Q245R	+++
G020R-T022W-S078R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-A232V-Q245R	+++
N018R-G020R-S024R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	+++
N043R-R045T-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+++
N018R-S101G-V104I-H249R	+++
G020R-T22W-S078R-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-A232V-Q245R	+++
G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-I198L-G211Q-T213A-A232V-Q245R	+++
G020R-S078R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-T213A-A232V-Q245R	+++
S024R-N076D-V104I-A232V-Q245R	+++
N018R-G020R-N076D-S 101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+++
N018R-S024R-N076D-S101G-V104I-A232V-H249R	+++
N018R-N043D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+++
A001T-N018R-S024R-N076D-N116A-T213A-H249R	+++
N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+++
G020R-S078R-S101G-S103A-V104I-N116A-A232V-Q245R	+++
N043R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+++
N018R-R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+++
N018R-N076D-S101G-V104I-A232V-Q245R	+++
G020R-S078R-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-A232V-Q245R	+++
N018R-S024R-N076D-S101A-G211Q-T213A-A215F-H249R	+++
R045T-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+++

TABLA 12-2: Rendimiento de limpieza BMI de variantes de la biblioteca WCE10 a WCE14. IR = Índice de rendimiento IR > o = 1,5 es +++; IR entre 1,49 y 1,3 = ++; IR entre 1,29 y 1,0 = + en el detergente 36k o 36l	
Secuencia de variantes de GG36 (numeración BPN')	**IR relativo a GG36; ensayo BMI, Detergente 36k o 361, 16 °C**
N043R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	+++
G020R-T022W-S078R-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-T213A-A232V-Q245R	+++
G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-T213A-A232V-Q245R	+++
G020R-S101G-I198L-A215F-A232V-Q245R	+++
N018R-S024R-N076D-T213A-A215F-H249R	+++
G020R-S078R-S101G-S103A-V104I-N116A-G211Q-A232V-Q245R	+++
G020R-T022W-S078R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-A215F-A232V-Q245R	+++
G020R-T022W-S078R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-T213A-A232V-Q245R	+++
S024R-A232V-Q245R	+++
N018R-S024R-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	
N018R-S024R-N076D-S101A-A215F-H249R	+++
N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-T213A-H249R	+++
S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+++
N018R-S024R-N076D-G211Q-T213A-A215F-H249R	+++
N018R-S024R-N076D-N116A-T213A-A215F-H249R	+++
N043D-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	+++
N043D-S078R-S101G-S 103A-V104I-A232V-Q245R-H249R	+++
G020R-T022W-S078R-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-A232V-Q245R	+++
N018R-S024R-N076D-S101A-I198L-G211Q-A215V-H249R	+++
N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-G211Q-H249R	+++
G020R-S103A-V104I-A232V-Q245R	++
G020R-T22W-S101A-S103A-V104I-G211Q-A215F-A232V-Q245R	++
S024R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	++
G020R-S101G-S103A-V104I-N116A-A232V-Q245R	++
N018R-T22W-S024R-N076D-I198L-A215F-H249R	++
G020R-T022W-S103A-V104I-A232V-Q245R	++
G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-G211Q-T213A-A232V-Q245R	++
G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R	++

TABLA 12-2: Rendimiento de limpieza BMI de variantes de la biblioteca WCE10 a WCE14. IR = Índice de rendimiento IR > o = 1,5 es +++; IR entre 1,49 y 1,3 = ++; IR entre 1,29 y 1,0 = + en el detergente 36k o 36l	
Secuencia de variantes de GG36 (numeración BPN')	**IR relativo a GG36; ensayo BMI, Detergente 36k o 361, 16 °C**
N018R-N043R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	++
N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-I198L-T213A-A215F-H249R	++
N018R-T22W-S024R-N076D-S101A-A215F-H249R	++
G020R-R045T-S 101G-S 103A-V104I-A232V-Q245R	++
G020R-S078R-S101G-S103A-V104I-T180A-A232V-Q245R	++
G020R-T022W-S078R-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-A215F-A232V-Q245R	++
N018R-S101G-S103A-V104I	++
G020R-T22W-S101A-S103A-V104I-N116A-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R	++
N018R-S024R-N076D-S103A-A232V-Q245R	++
G020R-S078R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-A232V-Q245R	++
N018R-S024R-N076D-G211Q-H249R	++
G020R-S101A-S103A-V104I-T213A-A215F-A232V-Q245R	++
N018R-G020R-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	++
G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-G211Q-A232V-Q245R	++
G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-N116A-G211Q-A215F-A232V-Q245R	++
G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-N116A-G211Q-A232V-Q245R	++
N018R-S024R-N076D-A232V-H249R	++
N018R-S024R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	++
N018R-N076D-Q245R	++
S024R-V104I-Q245R	++
S101G-A232V	++
G020R-T22W-S101A-S103A-V104I-N116A-G211Q-A215F-A232V-Q245R	++
N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-T213AH249R	++
G020R-T022W-S078R-S 101A-S 103A-V104I-A232V-Q245R	++
G020R-T022W-S078R-S101A-S103A-V104I-I198L-A232V-Q245R	++
S024R-Q245R-H249R	++
G020R-S101G-S103A-V104I-N116A-G211Q-A232V-	

TABLA 12-2: Rendimiento de limpieza BMI de variantes de la biblioteca WCE10 a WCE14. IR = Índice de rendimiento IR > o = 1,5 es +++; IR entre 1,49 y 1,3 = ++; IR entre 1,29 y 1,0 = + en el detergente 36k o 36l	
Secuencia de variantes de GG36 (numeración BPN')	**IR relativo a GG36; ensayo BMI, Detergente 36k o 361, 16 °C**
Q245R	
N018R-T22W-S024R-N076D-N116A-G211Q-H249R	++
S024R-S101G-V104I-H249R	++
N018R-S024R-N076D-N116A-I198L-G211Q-T213A-A215F-H249R	++
N018R-S024R-V104I	++
G020R-T022W-S078R-S101A-S103A-V104I-N183D-I198L-T213A-A215F-A232V-Q245R	++
N018R-G020R-T22W-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-T213AH249R	++
G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-A232V-Q245R	++
Q012H-G020R-S078R-S101G-S103A-V104I-I198L-G211Q-T213A-A232V-Q245R	++
N018R-S024R-N076D-S101A-G211Q-A215F-H249R	++
N018R-S024R-N076D-T213A-H249R	++
S024R-V104I-H249R	++
N018R-T022W-S024R-N076D-G211Q-H249R	++
N018R-N076D-S103A-V104I-H249R	++
N043R-N076D-S101G-S103A-V104I-L217E-A232V-Q245R	++
G020R-S078R-S101G-S103A-V104I-N183D-G211Q-T213A-A232V-Q245R-E271G	++
N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-A215F-H249R	++
N018R-S024R-N043D-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	++
N018R-S024R-N076D-S101A-I198L-A215F-H249R	++
N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-I198L-G211Q-T213A-H249R	++
N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-T213A-A215F-H249R	++
G020R-N043D-R045T-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	++
R045T-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R	++
N018R-T22W-S024R-N076D-S101A-N116A-A215F-H249R	++
N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	++
G020R-T022W-S078R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-T213A-A215F-A232V-Q245R	++
N018R-S024R-N076D-N116A-G211Q-T213A-A215F-H249R	++
S024R-S103A-M175L-A232V-H249R	++

TABLA 12-2: Rendimiento de limpieza BMI de variantes de la biblioteca WCE10 a WCE14. IR = Índice de rendimiento IR > o = 1,5 es +++; IR entre 1,49 y 1,3 = ++; IR entre 1,29 y 1,0 = + en el detergente 36k o 36l	
Secuencia de variantes de GG36 (numeración BPN')	**IR relativo a GG36; ensayo BMI, Detergente 36k o 361, 16 °C**
N018R-S024R-N076D-N116A-T213A-H249R	++
G020R-R045T-N076D-S101G-S103A-V1041-A232V-Q245R	++
G020R-S078R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R	++
S024R-N043R-R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	++
N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-T213A-A215F-H249R	++
N043R-R045T-S101G-S103A-V1041-A232V-Q245R	++
N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-I198L-G211Q-Q245R	++
G020R-S024R-N043D-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	++
S024R-A232V	++
G020R-S078R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-A232V-Q245R	++
S024R-N076D-S101G-A232V-Q245R	++
N018R-N076D-S101G-S103A-V104I-H249R	++
N018R-S024R-N076D-I198M-G211Q-T213A-A215F-H249R	++
N018R-T22W-S024R-N076D-S101A-I198L-A215F-H249R	++
N018R-N043R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	++
G020R-T022W-S103A-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R	++
G020R-S078R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-T213A-A232V-Q245R	++
R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	++
N018R-T22W-S024R-N076D-S101A-G211Q-T213A-H249R	++
N018R-S024R-N076D-N116A-I198L-A215F-H249R-V268G	++
N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-G211Q-H249R	++
N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-G211Q-H249R	++
S101G-S103A-V104I-Q245R	++
N018R-N076D-S101G-A232V-Q245R	++
N018R-G020R-R045T-S 101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	++
N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-H249R	++

TABLA 12-2: Rendimiento de limpieza BMI de variantes de la biblioteca WCE10 a WCE14. IR = Índice de rendimiento IR > o = 1,5 es +++; IR entre 1,49 y 1,3 = ++; IR entre 1,29 y 1,0 = + en el detergente 36k o 36l	
Secuencia de variantes de GG36 (numeración BPN')	**IR relativo a GG36; ensayo BMI, Detergente 36k o 361, 16 °C**
N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-I198L-T213A-H249R	++
S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R	++
N018R-S078R-S101G-S103A-V104I-L217E-A232V-Q245R	++
G020R-N043R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	++
N018R-N043D-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R	++
R045T-S101G-S 103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	++
S024R-S103A-A232V	++
N018R-S024R-N076D-S101A-G211Q-H249R	++
N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R	++
N018R-N043R-R045T-N076D-S076T-S101G-S103A-V1041-A232V-Q245R-A273T	++
N018R-G020R-N043D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	++
G020R-S078R-S101A-S103A-V104I-N183D-A215F-A232V-Q245R	++
N018R-S024R-N076D-S101G-A232V	++
A232V-Q245R	++
N043R-R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-V234I-Q245R	++
S024R-N076D-S103A-V104I-Q245R	++
G020R-S078R-S101A-S103A-V104I-G211Q-T213A-A232V-Q245R	++
N043D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R-A272V	++
N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-G211Q-H249R	++
N018R-S103A-V104I-A232V	++
G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-T213A-A215F-A232V-Q245R	++
S024R-N043R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	++
N018R-T022W-S024R-N076D-T213A-A215F-H249R	++
N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-G211Q-T213A-H249R	++
G020R-T22W-S078R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-T213A-A232V-Q245R	++
G020R-T022W-S078R-S101G-S103A-V104I-G211Q-T213A-A232V-Q245R	++
G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-A215F-A232V-	++

TABLA 12-2: Rendimiento de limpieza BMI de variantes de la biblioteca WCE10 a WCE14. IR = Índice de rendimiento IR > o = 1,5 es +++; IR entre 1,49 y 1,3 = ++; IR entre 1,29 y 1,0 = + en el detergente 36k o 36l	
Secuencia de variantes de GG36 (numeración BPN')	**IR relativo a GG36; ensayo BMI, Detergente 36k o 361, 16 °C**
Q245R	
N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-N183D-A215F-H249R	++
N018R-S024R-N076D-N116A-M117I-N183D-T213A-H249R	++
N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-T213A-H249R	++
N018R-T22W-S024R-N076D-S101A-I198L-T213A-A215F-H249R	++
N018R-N043D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R	++
N018R-N076D-S101G-S103 A-V104I-A232V-Q245R-H249R	++
G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-I198L-A232V-Q245R	++
N018R-N043R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	++
N018R-S024R-N076D-N116A-I198L-Y209H-T213A-H249R	++
G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-T213A-A232V-Q245R	++
S024R-N076D-S 101G-M175L-A232V-Q245R	++
N018R-N043D-R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	++
R045T-N076D-S078R-S101G-S 103A-VI041-A232V-Q245R	++
G020R-S078R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-I198L-A215F-A232V-Q245R	++
N043R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R	++
N018R-S024R-N076D-I198L-T213A-A215F-H249R	++
N018R-T022W-S024R-N076D-I198L-A215F-H249R	++
N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-T213A-A215F-H249R	++
N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-T213A-A215F-H249R	++
N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-G211Q-T213A-H249R	++
N018R-S024R-Q245R	++
N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-A215F-H249R	++
S024R-N076D-V104I-Q245R	++
K027R-N043R-S 101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	++

TABLA 12-2: Rendimiento de limpieza BMI de variantes de la biblioteca WCE10 a WCE14. IR = Índice de rendimiento IR > o = 1,5 es +++; IR entre 1,49 y 1,3 = ++; IR entre 1,29 y 1,0 = + en el detergente 36k o 36l	
Secuencia de variantes de GG36 (numeración BPN')	**IR relativo a GG36; ensayo BMI, Detergente 36k o 361, 16 °C**
N018R-S024R-N076D-N116A-I198L-G211Q-T213A-H249R	++
N018R-S024R-N076D-N116A-I198L-H249R	++
N018R-S024R-N076D-N183D-I198L-G211Q-T213A-A215F-H249R	++
G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-N116A-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R	++
N018R-N043D-R045T-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	++
N043R-R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	++
N018R-T22W-S024R-N076D-N116A-T213A-A215F-H249R	++
N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-G211Q-A215F-H249R	++
G020R-S078R-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-T213A-A232V-Q245R	++
N018R-N076D-S101G-S103A-V1041-A232V-Q245R	++
N018R-S101G-V104I	++
G020R-S078R-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R	++
G020R-S078R-S 1 01A-S103A-V104I-A232V-Q245R	++
N018R-S024R-N076D-S101A-I198L-G211Q-H249R	++
N018R-S024R-N076D-I198L-G211Q-T213A-H249R	++
N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-G211Q-T213AH249R	++
N018R-N076D-H249R	++
N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-H249R	++
N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-G211Q-T213A-H249R	++
G020R-T022W-S078R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R	++
G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-A114T-T213A-A215F-A232V-Q245R	++
N018R-T22W-S024R-N076D-N116A-G211Q-T213A-H249R	++
N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-H249R	++
G020R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-T213A-A232V-Q245R	++
N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-G211Q-T213A-H249R	++
N018R-T022K-N043D-S101G-S103A-V1041-A232V-	++

TABLA 12-2: Rendimiento de limpieza BMI de variantes de la biblioteca WCE10 a WCE14. IR = Índice de rendimiento IR > o = 1,5 es +++; IR entre 1,49 y 1,3 = ++; IR entre 1,29 y 1,0 = + en el detergente 36k o 36l	
Secuencia de variantes de GG36 (numeración BPN')	**IR relativo a GG36; ensayo BMI, Detergente 36k o 361, 16 °C**
Q245R	
N018R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	++
G020R-S078R-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-T213A-A215F-A232V	++
N018R-S024R-N076D-N116A-H249R	++
G020R-S024R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	++
N043D-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	++
N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-G211Q-H249R	++
N018R-T022W-S024R-N076D-I198L-T213A-A215F-H249R	++
N018R-N043D-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	++
G020R-T22W-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-T213A-A215F-A232V-Q245R	++
G020R-S101G-S103A-V104I-N183D-G211Q-A232V-Q245R-	++
N018R-S024R-N076D-S101A-I198L-T213A-H249R	++
N018R-S024R-N076D-S101A-I198L-H249R	++
N018R-S024R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R	++
N018R-S024R-N076D-S101A-N183D-T213A-H249R	++
N018R-N043D-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	++
G020R-S078R-S101G-S103A-V104I-N116A-A131V-N183D-T213A-A232V-Q245R	++
N018R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	++
N018R-S024R-N076D-S101A-N183D-G211Q-H249R	++
N076D-S101G-S 103A-V104I-A232V-Q245R-H249R	++
S024R-S101G-Q245R	++
S024R-N076D-S101G-Q245R	++
N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R	++
N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N183D-G211Q-A215F-H249R	++
S024R-S101G	++
N018R-T22W-S024R-N076D-T213A-A215F-H249R	++
G020R-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	++
G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-N183D-I198L-T213A-A215F-A232V-Q245R	++

TABLA 12-2: Rendimiento de limpieza BMI de variantes de la biblioteca WCE10 a WCE14. IR = Índice de rendimiento IR > o = 1,5 es +++; IR entre 1,49 y 1,3 = ++; IR entre 1,29 y 1,0 = + en el detergente 36k o 36l	
Secuencia de variantes de GG36 (numeración BPN')	**IR relativo a GG36; ensayo BMI, Detergente 36k o 361, 16 °C**
N018R-N043D-R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	++
N043D-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	++
S024R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	++
G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-I198L-G211Q-A215F-A232V-Q245R	++
G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-A215F-A232V-Q245R	++
N018R-G020R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R	++
N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-A215F-H249R	++
N018R-V104I	++
N018R-S024R-N076D-N116A-I198L-A215F-H249R	++
N018R-S024R-N076D-L088I-S101A-N116A-I198L-G211Q-A215F-H249R	++
N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-G211Q-T213A-H249R	++
N043R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	++
N018R-N076D-S101G-V104I-H249R	++
N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-T213A-A215F-H249R	++
N018R-T22W-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-A215F-H249R	++
N018R-G020R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R	++
S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R-N269R	++
S024R-N076D-Q245R	++
N018R-G020R-N043R-R045T-N076D-S101G-S 103A-V104I-A232V-Q245R	++
N018R-G020R-S024R-N076D-A215F-H249R	++
N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-T213A-H249R	++
N018R-G020R-S024R-N076D-G211Q-A215F-H249R	++
N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	++
G020R-T22W-S078R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-A215F-A232V-Q245R	++
N018R-S024R-N076D-I198L-G211Q-A215F-H249R	++
N043R-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	++
N043R-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-	++

TABLA 12-2: Rendimiento de limpieza BMI de variantes de la biblioteca WCE10 a WCE14. IR = Índice de rendimiento IR > o = 1,5 es +++; IR entre 1,49 y 1,3 = ++; IR entre 1,29 y 1,0 = + en el detergente 36k o 36l	
Secuencia de variantes de GG36 (numeración BPN')	**IR relativo a GG36; ensayo BMI, Detergente 36k o 361, 16 °C**
N269R	
G020R-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R	++
N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-T213A-H249R	++
G020R-T022W-S101A-N116A-I198L-G211Q-T213A-A215F-H249R	++
N043R-R045T-S078R-S101G-S103A-V104I-N218S-A232V-Q245R	++
N018R-S103A	++
G020R-T22W-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-A215F-A232V-Q245R	++
N018R-S024R-N076D-S101A-H249R	++
N018R-T022W-S024R-N076D-G211Q-T213A-H249R	++
S024R-N043R-R045T-N076D-S101G-S103A-VI041-A232V-Q245R	++
G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-A232V-Q245R	++
G020R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R	++
K027R-R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	++
G020R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R	++
N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-N183D-T213A-A215F-H249R	++
N018R-S024R-N076D-V104I	++
S101G-S103A-V104I-A232V-H249R	++
N018R-S024R-N076D-N116A-N183D-G211Q-H249R	++
N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-A215F-H249R	++
N018R-S024R-N076D-N183D-T213A-A215F-H249R	++
N018R-T022W-S024R-N076D-I198L-G211Q-H249R	++
N043D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R-R275S	++
G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-A232V-Q245R	++
N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-I198L-G211Q-T213A-A215F-H249R	++
N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-G211Q-T213A-A215F-H249R	++
N018R-G020R-S024R-N076D-N183D-H249R	++
N018R-S024R-N076D-N116A-I198L-T213A-H249R	++
N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-G211Q-H249R	++

TABLA 12-2: Rendimiento de limpieza BMI de variantes de la biblioteca WCE10 a WCE14. IR = Índice de rendimiento IR > o = 1,5 es +++; IR entre 1,49 y 1,3 = ++; IR entre 1,29 y 1,0 = + en el detergente 36k o 36l	
Secuencia de variantes de GG36 (numeración BPN')	**IR relativo a GG36; ensayo BMI, Detergente 36k o 361, 16 °C**
V004M-N018R-S024R-N076D-N116A-I198L-G211Q-T213A-H249R	++
V104I-A232V-H249R	++
G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-A215F-A232V-Q245R	++
G020R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-A232V-Q245R-T274I	+
G020R-S101A-S103A-V104I-T213A-A232V-Q245R	+
G020R-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-T213A-A232V-Q245R	+
G020R-S024R-N043D-S078R-S101G-S103A-V1041-A232V-Q245R	+
N018R-S024R-N076D-S103A-H249R	+
N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-A215F-H249R	+
N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-H249R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-I198L-A215F-H249R	+
N018R-S024R-N076D-S101A-G211Q-T213A-A215F-H249R-A270V	+
N018R-N043D-R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	+
G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-N183D-A232V-Q245R	+
N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-T213A-H249R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-I198L-G211Q-A215F-H249R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-I198L-T213A-H249R	+
G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-A232V-Q245R	+
N018R-T22W-S024R-N076D-N116A-I198L-T213A-H249R	+
N043R-R045T-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	+
N018R-S024R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V	+
S101G-H249R	+
S024R-N076D-S 101G-S 103A-V104I-M175L-H249R	+
G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-A232V-Q245R-N269S	+
N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-H249R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-H249R	+

TABLA 12-2: Rendimiento de limpieza BMI de variantes de la biblioteca WCE10 a WCE14. IR = Índice de rendimiento IR > o = 1,5 es +++; IR entre 1,49 y 1,3 = ++; IR entre 1,29 y 1,0 = + en el detergente 36k o 36l	
Secuencia de variantes de GG36 (numeración BPN')	**IR relativo a GG36; ensayo BMI, Detergente 36k o 361, 16 °C**
N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-A215F-H249R	+
N018R-S024R-N076D-T213A-A215F-H249R-T260K	+
N018R-S024R-N076D-N116A-G211Q-T213A-H249R	+
N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-N116A-I198L-H249R	+
S024R-N076D-S101G-S103A-V104I-Q245R	+
S024R-N076D-S103A-H249R	+
N018R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R	+
N018R-S024R-N076D-I198L-G211Q-H249R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-I198L-G211Q-T213A-H249R	+
G020R-S024R-R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+
N018R-G020R-S024R-N076D-N183D-G211Q-T213A-H249R	+
N018R-N043D-R045T-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-A272D	+
N018R-S024R-N076D-N116A-I198L-T213A-A215F-H249R	+
N018R-T22W-S024R-N076D-S101A-I198L-H249R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-I198L-H249R	+
S024R-N076D-S 101G-S 103A-A232V	+
S024R-S103A-V104I	+
N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-A215F-H249R	+
+S024R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R	+
G020R-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-A232V-Q245R	+
S024R-N043D-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	+
G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-N183D-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R	+
G020R-R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	+
N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-G211Q-A215F-H249R	+
G020R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-A215F-A232V-Q245R	+
N018R-N043R-S 101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R	+
N018R-S024R-N076D-I198L-T213A-H249R	+

TABLA 12-2: Rendimiento de limpieza BMI de variantes de la biblioteca WCE10 a WCE14. IR = Índice de rendimiento IR > o = 1,5 es +++; IR entre 1,49 y 1,3 = ++; IR entre 1,29 y 1,0 = + en el detergente 36k o 36l	
Secuencia de variantes de GG36 (numeración BPN')	**IR relativo a GG36; ensayo BMI, Detergente 36k o 361, 16 °C**
N018R-S024R-N076D-N116A-N183D-T213A-H249R	+
G020R-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	+
S024R-N076D-S103A-Q245R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-G211Q-T213A-A215F-H249R	+
S103A-V104I-Q245R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-G211Q-A215F-H249R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-H249R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-I198L-G211Q-T213A-H249R	+
N018R-S024R-N076D-N116A-N183D-G211Q-T213A-A215F-H249R	+
N018R-G020R-N043D-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	+
N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-G211Q-T213A-A215F-H249R	+
A016T-N043R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-A215F-H249R	+
N043R-N076D-S101G-S103T-V104I-A232V-Q245R-H249R-N269R	+
G020R-S078R-S101A-S103A-V104I-G115E-N116A-N183D-G211Q-T213A-A232V-Q245R	+
N018R-S024R-N076D-I198L-H249R	+
N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-H249R	+
G020R-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-A232V-Q245R	+
N018R-S024R-N076D-S101G	+
N076D-S 101G-A232V-Q245R	+
N018R-N076D-S101G-S103A-V104I-Q245R	+
N018R-R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R	+
N018R-S024R-N076D-A215F-H249R	+
N018R-V104I-A232V	+
N043D-R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+
S024R-N076D-S101G-A232V-H249R	+
S103A-A232V-Q245R	+
G020R-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R	+

TABLA 12-2: Rendimiento de limpieza BMI de variantes de la biblioteca WCE10 a WCE14. IR = Índice de rendimiento IR > o = 1,5 es +++; IR entre 1,49 y 1,3 = ++; IR entre 1,29 y 1,0 = + en el detergente 36k o 36l	
Secuencia de variantes de GG36 (numeración BPN')	**IR relativo a GG36; ensayo BMI, Detergente 36k o 361, 16 °C**
N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-G211Q-A215F-H249R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-I198L-G211Q-A215F-H249R	+
S024R-N076D-S103A-V104I-H249R	+
S024R-S101G-S103A-V104I	+
G020R-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-A215F-A232V-Q245R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-A215F-H249R	+
G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R	+
G020R-S024R-R045T-N076D-S101G-S103A-V1041-A232V-Q245R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-T213A-H249R	+
N018R-G020R-S024R-N076D-A131T-A215F-H249R	+
N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-T213A-A215F-H249R	+
N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-G211Q-T213A-A215F-H249R	+
N018R-S024R-N076D-I198L-A215F-H249R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-N183D-G211Q-H249R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-T213A-A215F-H249R	+
N018R-G020R-S024R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+
N043R-S101G-S 103A-V104I-Q245R-H249R	+
N018R-N076D-A232V-H249R	+
N018K-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-L217E-A232V-Q245R-N269R	+
N018R-G020R-S024R-N043D-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-T213A-A215F-H249R-L267I	+
A232V-H249R	+
N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-G211Q-T213A-A215F-H249R	+
N076D-V104I-Q245R	+
N018R-G020R-S024R-N076D-N183D-I198L-G211Q-A215F-H249R	+
N018R-S024R-N076D-S101A-G211Q-T213A-H249R	+
S024R-S101G-S103A-A232V	+

TABLA 12-2: Rendimiento de limpieza BMI de variantes de la biblioteca WCE10 a WCE14. IR = Índice de rendimiento IR > o = 1,5 es +++; IR entre 1,49 y 1,3 = ++; IR entre 1,29 y 1,0 = + en el detergente 36k o 36l	
Secuencia de variantes de GG36 (numeración BPN')	**IR relativo a GG36; ensayo BMI, Detergente 36k o 361, 16 °C**
N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-T213A-A215F-H249R	+
N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-G211Q-T213AH249R	+
N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-A215F-H249R	+
G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-A215F-A232V-Q245R	+
N018R-S024R-N076D-N116A-I198L-G211Q-H249R	+
S103A-A232V-H249R	+
N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-A215F-H249R	+
N018R-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-T213A-H249R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-N183D-T213A-H249R	+
N018R-S024R-N076D-S101A-T213A-A215F-H249R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-NI16A-NI83D-G211Q-H249R	+
N018R-R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	+
N018R-G020R-R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-I198L-T213A-A215F-H249R	+
G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-T213A-A232V-Q245R	+
N018R-G020R-S024R-N076D-I198L-H249R	+
N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-G211Q-H249R	+
G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-A232V-Q245R-T274I	+
S024R-S103A-Q245R-H249R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-H249R	+
N018R-S024R-N076D-S101A-I198L-G211Q-A215F-H249R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-I198L-G211Q-A215F-H249R	+
N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-T213A-H249R	+
N018R-N043D-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-G211Q-T213A-A215F-H249R	+

TABLA 12-2: Rendimiento de limpieza BMI de variantes de la biblioteca WCE10 a WCE14. IR = Índice de rendimiento IR > o = 1,5 es +++; IR entre 1,49 y 1,3 = ++; IR entre 1,29 y 1,0 = + en el detergente 36k o 36l	
Secuencia de variantes de GG36 (numeración BPN')	**IR relativo a GG36; ensayo BMI, Detergente 36k o 361, 16 °C**
N018R-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-T213A-H249R	+
N043D-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R	+
N018R-S024R-N076D-I198L-G211Q-T213A-A215F-H249R	+
N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-N183D-T213A-H249R	+
S103A-A232V	+
N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-A215F-H249R	+
N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-H249R	+
N018R-N043R-S078R-S 101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+
N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N183D-G211Q-A215F-H249R	+
N043R-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R	+
N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-T213AH249R	+
N018R-S024R-N076D-N183D-I198L-T213A-H249R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N183D-G211Q-H249R	+
N018R-G020R-S024R-N076D-I198L-T213A-A215F-H249R	+
N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-N183D-G211Q-T213A-H249R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-I198L-H249R	+
N018R-S024R-N076D-N183D-I198L-G211Q-H249R	+
G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-T213A-A232V-Q245R	+
N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-N183D-G211Q-T213A-H249R	+
N018R-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-G211Q-T213A-A215F-H249R	+
G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-A215F-A232V-Q245R	+
N018R-S024R-N076D-S101A-N183D-H249R	+
N018R-S024R-N076D-A232V	+
N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-H249R	+
G020R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-I198L-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R	+
G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-A232V-Q245R-N263S	+

TABLA 12-2: Rendimiento de limpieza BMI de variantes de la biblioteca WCE10 a WCE14. IR = Índice de rendimiento IR > o = 1,5 es +++; IR entre 1,49 y 1,3 = ++; IR entre 1,29 y 1,0 = + en el detergente 36k o 36l	
Secuencia de variantes de GG36 (numeración BPN')	**IR relativo a GG36; ensayo BMI, Detergente 36k o 361, 16 °C**
S024R-N076D-S 101G-V 104I-A232V-H249R	+
N043R-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+
S024R-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R	+
N018R-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-T213A-A215F-H249R	+
N018R-G020R-S024R-N076D-I198L-A215F-H249R	+
N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N116A-T213A-H249R	+
N018R-S024R-N076D-S101A-V197A-T213A-A215F-H249R	+
S024R-S101G-S103A	+
N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-G211Q-A215F-H249R	+
N043R-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-L217E-A232V-Q245R	+
S024R-V104I-A232V	+
N018R-S024R-N076D-N183D-G211Q-H249R	+
G020R-N043R-R045T-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+
N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-T213A-H249R	+
N018R-S024R-N076D-N116A-A150T-T213A-H249R	+
N018R-S024R-N076D-N183D-T213A-H249R	+
N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-N183D-G211Q-A215F-H249R	+
N018R-G020R-S024R-N076D-G211Q-H249R	+
N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-H249R	+
S024R-N076D-A232V-H249R	+
N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-G211Q-T213A-H249R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116T-I198L-A215F-H249R	+
N018R-S024R-N076D-N183D-I198L-G211Q-A215F-H249R	+
N018R-T022R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-H249R	+
R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+
N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N183D-G211Q-H249R	+
G020R-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-T213A-A232V-Q245R	+

TABLA 12-2: Rendimiento de limpieza BMI de variantes de la biblioteca WCE10 a WCE14. IR = Índice de rendimiento IR > o = 1,5 es +++; IR entre 1,49 y 1,3 = ++; IR entre 1,29 y 1,0 = + en el detergente 36k o 36l	
Secuencia de variantes de GG36 (numeración BPN')	**IR relativo a GG36; ensayo BMI, Detergente 36k o 361, 16 °C**
N076D-S101G-S103A-Q245R	+
G020R-N043D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R	+
N018R-S024R-N076D-N116A-N183D-H249R	+
N018R-S024R-N076D-S101A-N183D-G211Q-T213A-A215F-H249R	+
N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-H249R	+
N018R-T22W-S024R-N076D-G211Q-T213A-H249R	+
N018R-G020R-S024R-N076D-N183D-G211Q-H249R	+
N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-T213A-H249R	+
N043R-S078R-S101G-S103A-V104I-L217E-A232V-Q245R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-A215F-H249R	+
N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-G211Q-T213A-H249R	+
N076D-S 101G-V104I-H249R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-T213A-H249R	+
N018R-S024R-N076D-N183D-H249R	+
N018R-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-A215F-H249R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-N183D-I198L-A215F-H249R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-I198L-G211Q-H249R	+
G020R-S 101A-S 103A-V104I-N116A-N183D-A232V-Q245R	+
N018R-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-G211Q-H249R	+
N018R-G020R-S024R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+
N018R-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-L217E-A232V-Q245R	+
G020R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-A232V-Q245R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-Y209H-H249R	+
N018R-S024R-N076D-N183D-I198L-T213A-A215F-H249R	+
N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-T213A-H249R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-	+

TABLA 12-2: Rendimiento de limpieza BMI de variantes de la biblioteca WCE10 a WCE14. IR = Índice de rendimiento IR > o = 1,5 es +++; IR entre 1,49 y 1,3 = ++; IR entre 1,29 y 1,0 = + en el detergente 36k o 36l	
Secuencia de variantes de GG36 (numeración BPN')	**IR relativo a GG36; ensayo BMI, Detergente 36k o 361, 16 °C**
G211Q-T213A-H249R	
N018R-S024R-N076D-N183D-I198L-H249R	+
N018R-S024R-N076D-N183D-A215F-H249R	+
N018R-G020R-S024R-N076D-G211Q-T213A-A215F-H249R	+
N076D-Q245R	+
N076D-S101G-V104I-Q245R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-G211Q-A215F-H249R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-A215F-H249R	+
N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-G211Q-T213A-H249R	+
G020R-S024R-N043R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+
N018R-S024R-N076D-N116A-N183D-G211Q-A215F-H249R	+
G020R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-T213A-A215F-A232V-Q245R	+
S101G-S103A-V104I	+
N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-T213A-H249R	+
N018R-G020R-S024R-N076D-N204D-T213A-H249R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-N183D-I198L-H249R	+
N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-A215F-H249R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-G211Q-T213A-A209V-H249R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-T213A-A215F-H249R	+
N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-T213A-H249R	+
N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N116A-G211Q-T213A-H249R	+
N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-T213A-A215F-H249R	+
N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-T213A-A215F-H249R	+
N018R-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-G211Q-T213A-A215F-H249R	+
N018R-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-G211Q-T213A-H249R	+
N018R-N043R-R045T-S078R-S101G-S103A-V104I-L217E-A232V-Q245R	+

TABLA 12-2: Rendimiento de limpieza BMI de variantes de la biblioteca WCE10 a WCE14. IR = Índice de rendimiento IR > o = 1,5 es +++; IR entre 1,49 y 1,3 = ++; IR entre 1,29 y 1,0 = + en el detergente 36k o 36l	
Secuencia de variantes de GG36 (numeración BPN')	**IR relativo a GG36; ensayo BMI, Detergente 36k o 361, 16 °C**
N018R-S024R-N076D-N183D-G211Q-T213A-A215F-H249R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-A215F-H249R	+
N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-H249R	+
N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-G211Q-A215F-H249R	+
N018R-G020R-S024R-N076D-N183D-G211Q-T213A-A215F-H249R	+
N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-I198L-T213A-H249R	+
N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-G211Q-A215F-H249R-N269D	+
N018R-G020R-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-T213A-H249R	+
G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-N183D-A215F-A232V-Q245R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-Y209H-G211Q-H249R	+
N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-H249R	+
N076D-A232V-Q245R	+
N043D-R045T-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+
N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-I198L-G211Q-A215F-Q245R	+
N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-T213A-H249R	+
G020R-S024R-N043D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R	+
N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-I198L-A215F-H249R	+
G020R-A090S-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-T213A-A215F-A232V-Q245R	+
N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-I198L-G211Q-T213A-A215F-H249R	+
N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N183D-T213A-A215F-H249R	+
N018R-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-G211Q-T213A-H249R	+
N043D-R045T-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	+
N018R-S024R-N076D-S101A-N183D-A215F-H249R	+

TABLA 12-2: Rendimiento de limpieza BMI de variantes de la biblioteca WCE10 a WCE14. IR = Índice de rendimiento IR > o = 1,5 es +++; IR entre 1,49 y 1,3 = ++; IR entre 1,29 y 1,0 = + en el detergente 36k o 36l	
Secuencia de variantes de GG36 (numeración BPN')	**IR relativo a GG36; ensayo BMI, Detergente 36k o 361, 16 °C**
N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-T213A-H249R	+
G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-I198L-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R	+
N018R-G020R-S024R-N043D-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	+
N018R-S024R-N076D-S101A-N183D-T213A-A215F-H249R	+
N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-G211Q-T213A-A215F-H249R	+
N018R-G020R-N043D-S101G-S103A-V104I-L217E-A232V-Q245R	+
N076D-S103A-V104I-A232V-Q245R	+
R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N183D-G211Q-A215F-H249R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-H249R	+
N018R-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-G211Q-A215F-H249R	+
N018R-G020R-N043D-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-L217E-A232V-Q245R	+
N076D-S103A-V104I-Q245R	+
N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N116A-G211Q-T213A-A215F-H249R	+
N018R-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-H249R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-G211Q-A215F-H249R	+
N018R-S024R-N076D-N116A-N183D-T213A-A215F-H249R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-G211Q-H249R	+
N018R-S024R-N076D-S101G-Q245R	+
N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-T213A-A215F-H249R	+
N043R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+
N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-N116A-I198L-T213A-A215F-H249R	+
N076D-V104I-A232V-Q245R	+
K027R-N043R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N183D-T213A-	+

TABLA 12-2: Rendimiento de limpieza BMI de variantes de la biblioteca WCE10 a WCE14. IR = Índice de rendimiento IR > o = 1,5 es +++; IR entre 1,49 y 1,3 = ++; IR entre 1,29 y 1,0 = + en el detergente 36k o 36l	
Secuencia de variantes de GG36 (numeración BPN')	**IR relativo a GG36; ensayo BMI, Detergente 36k o 361, 16 °C**
A215F-H249R	
N018R-S024R-N076D-S103A-V104I-L135I-A232V	+
N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-N183D-I198L-G211Q-H249R	+
N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-A215F-H249R	+
N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-H249R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-N183D-G211Q-T213A-A215F-H249R	+
N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-H249R	+
P005S-N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-T213A-A215F-H249R	+
N018R-S024R-N076D-N116A-N183D-A215F-H249R	+
N018R-S024R-N076D-N183D-I198L-A215F-H249R	+
N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-H249R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-G211Q-H249R	+
N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-H249R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-T213A-H249R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N183D-G211Q-T213A-H249R	+
N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-I198L-H249R	+
N018R-S024R-N076D-N183D-G211Q-T213A-H249R	+
N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-T213A-H249R	+
N018R-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-A215F-H249R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-N183D-I198L-G211Q-A215F-H249R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-N183D-H249R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-A215F-H249R	+
N018R-G020R-N043D-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+
G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-N183D-I198L-A215F-A232V-Q245R	+
N076D-S101G-S103A-V104I-H249R	+
N018R-G020R-S024R-N076D-N183D-I198L-A215F-H249R	+

TABLA 12-2: Rendimiento de limpieza BMI de variantes de la biblioteca WCE10 a WCE14. IR = Índice de rendimiento IR > o = 1,5 es +++; IR entre 1,49 y 1,3 = ++; IR entre 1,29 y 1,0 = + en el detergente 36k o 36l	
Secuencia de variantes de GG36 (numeración BPN')	**IR relativo a GG36; ensayo BMI, Detergente 36k o 361, 16 °C**
N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N183D-A215F-H249R	+
N018R-G020R-S024R-N076D-G211Q-T213A-H249R	+
N018R-S024R-N076D-N116A-N183D-G211Q-T213A-H249R	+
N018R-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-H249R	+
N018R-G020R-S024R-N076D-G211Q-N243D-H249R	+
N018R-G020R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-N183D-I198L-G211Q-T213A-H249R	+
N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-G211Q-T213A-H249R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-I198L-G211Q-T213A-A215F-H249R	+
S024R-N076D-S101G	+
N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-I198L-T213A-A215F-H249R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-G211Q-T213A-H249R	+
N018R-G020R-S024R-N076D-N183D-A215F-H249R	+
N018R-N043D-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-G211Q-T213A-Q245R	+
G020R-S024R-N076D-S078R-S 1 01G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R	+
N018R-G020R-R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R	+
N018R-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-G211Q-H249R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-N183D-G211Q-T213A-H249R	+
N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-I198L-G211Q-A215F-H249R-N269S	+
N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-G211Q-A215F-H249R	+
G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-N183D-T213A-A215F-A232V-Q245R	+
N018R-S024R-N076D-A086V-S101A-N183D-I198L-G211Q-H249R	+
N018R-N076D-S101G-I198T-A232V	+
N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-G211Q-A215F-H249R	+

TABLA 12-2: Rendimiento de limpieza BMI de variantes de la biblioteca WCE10 a WCE14. IR = Índice de rendimiento IR > o = 1,5 es +++; IR entre 1,49 y 1,3 = ++; IR entre 1,29 y 1,0 = + en el detergente 36k o 36l	
Secuencia de variantes de GG36 (numeración BPN')	**IR relativo a GG36; ensayo BMI, Detergente 36k o 361, 16 °C**
N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-T213A-A215F-H249R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N183D-G211Q-T213A-A215F-H249R	+
N018R-S024R-N076D-N183D-H249R-A248T	+
N018R-N076D-V104I-Q245R-H249R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-A215F-H249R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-T213A-A215F-H249R	+
N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-G211Q-T213A-A215F-H249R	+
N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-H249R	+
N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N116A-T213A-A215F-H249R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-G211Q-A215F-H249R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-G211Q-T213A-H249R	+
N043R-R045T-S078R-S101G-S103A-V104I-L217E-A232V-Q245R	+
N043R-R045T-S101G-S 103A-V104I-A232V-Q245R-H249R	+
N018R-N076D-S101G-V104I	+
G020R-R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R	+
N043D-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+
N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-H249R	+
N018R-N076D-V104I	+
N018R-G020R-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R	+
N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-N183D-G211Q-H249R	+
N018R-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-G211Q-A215F-H249R	+
S101G-V104I	+
N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-G211Q-T213A-A215F-H249R	+
N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N183D-G211Q-T213A-A215F-H249R	+
N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-N183D-A215F-H249R-N263D	+
N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N183D-H249R	+

TABLA 12-2: Rendimiento de limpieza BMI de variantes de la biblioteca WCE10 a WCE14. IR = Índice de rendimiento IR > o = 1,5 es +++; IR entre 1,49 y 1,3 = ++; IR entre 1,29 y 1,0 = + en el detergente 36k o 36l	
Secuencia de variantes de GG36 (numeración BPN')	**IR relativo a GG36; ensayo BMI, Detergente 36k o 361, 16 °C**
N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-A215F-H249R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-I198L-A215F-H249R-R269H	+
N018R-N043D-R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+
N018R-S024R-R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	+
S078R-S101G-S103A-V104I-L217E-A232V-Q245R	+
N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-T213A-A215F-H249R	+
N018R-G020R-S024R-N076D-N183D-I198L-T213A-H249R	+
N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-N116A-I198L-G211Q-A215F-H249R	+
N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-G211Q-H249R	+
N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-I198L-G211Q-T213A-H249R	+
N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-H249R	+
G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-I198L-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R	+
V104I-A232V	+
N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-A215F-H249R	+
N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-G211Q-T213A-A215F-H249R	+
N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N183D-T213A-A215F-H249R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-G211Q-T213A-H249R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-H249R	+
N043D-R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	+
N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-G211Q-H249R	+
N018R-G020R-N043R-S101G-S103A-V104I-L217E-A232V-Q245R	+
S024R-N043R-N076D-S078R-S 1 01G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	+
N043R-R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-Y166F-A176P-A179V-N184T-A187P-A194P	+
N018R-T022W-S024R-D041E-N076D-S101A-S160T-N183D-G211Q-T213A-H249R	+

TABLA 12-2: Rendimiento de limpieza BMI de variantes de la biblioteca WCE10 a WCE14. IR = Índice de rendimiento IR > o = 1,5 es +++; IR entre 1,49 y 1,3 = ++; IR entre 1,29 y 1,0 = + en el detergente 36k o 36l	
Secuencia de variantes de GG36 (numeración BPN')	**IR relativo a GG36; ensayo BMI, Detergente 36k o 361, 16 °C**
N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-G211Q-A215F-H249R	+
N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-T213A-H249R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-G211Q-T213A-H249R	+
N018R-G020R-S024R-N076D-I198L-T213A-H249R	+
N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-G211Q-H249R	+
N018R-G020R-S024R-N076D-N183D-G211Q-A215F-H249R	+
S024R-N076D-V104I	+
N018R-N076D-S101G-A232V	+
N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-G211Q-T213A-A215F-H249R	+
N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-A215F-H249R	+
N018R-S024R-L031F-N076D-N116A-N183D-G211Q-T213A-A215F-H249R	+
N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-T213A-H249R-N269S	+
N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-A215F-H249R	+
N018R-N043R-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	+
N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N114T-I198L-G211Q-A215F-H249R	+
S024R-N043R-S078R-S101G-S103A-V104I-L217E-A232V-Q245R	+
S024R-N076D-S103A-V104I-A232V	+
N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-I198L-G211Q-A215F-H249R	+
S101G-V104I-A232V	+
N018R-T022W-S024R-N076D-N183D-I198L-T213A-A215F-H249R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-N183D-I198L-G211Q-H249R	+
N018R-G020R-S024R-N076D-N183D-T213A-H249R	+
N018R-S024R-N076D-S101A-N183D-G211Q-A215F-H249R	+
N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-N116A-G211Q-T213A-H249R	+
N018R-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	+

TABLA 12-2: Rendimiento de limpieza BMI de variantes de la biblioteca WCE10 a WCE14. IR = Índice de rendimiento IR > o = 1,5 es +++; IR entre 1,49 y 1,3 = ++; IR entre 1,29 y 1,0 = + en el detergente 36k o 36l	
Secuencia de variantes de GG36 (numeración BPN')	**IR relativo a GG36; ensayo BMI, Detergente 36k o 361, 16 °C**
N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-A215F-H249R-T260A	+
N076D-H249R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-N183D-G211Q-A215F-H249R	+
N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-G211Q-A215F-H249R	+
N018R-G020R-S024R-N076D-T213A-H249R	+
N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-H249R	+
N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N183D-H249R	+
N076D-V104I-H249R	+
G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R	+
S024R-N043R-R045T-S078R-S101G-S103A-V104I-L217E-A232V-Q245R	+
N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-N183D-I198L-A215F-H249R	+
N018R-N076D-S101G-S103A	+
G020R-S024R-S 1 01G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	+
N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-H249R	+
S101G-S103A-A232V	+
S024R-N076D-S 101G-A232V	+
N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-G211Q-H249R	+
N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-G211Q-A215F-H249R	+
N018R-G020R-S024R-N076D-N183D-I198L-H249R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-G211Q-H249R	+
N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-A156V-N183D-G211Q-A215F-H249R-N269S	+
R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R	+
N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-H249R	+
N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-I198L-G211Q-A215F-H249R	+
N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-G211Q-A215F-H249R	+
N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-N116A-H249R	+

TABLA 12-2: Rendimiento de limpieza BMI de variantes de la biblioteca WCE10 a WCE14. IR = Índice de rendimiento IR > o = 1,5 es +++; IR entre 1,49 y 1,3 = ++; IR entre 1,29 y 1,0 = + en el detergente 36k o 36l	
Secuencia de variantes de GG36 (numeración BPN')	**IR relativo a GG36; ensayo BMI, Detergente 36k o 361, 16 °C**
N018R-N076D-S101G	+
N018R-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-T213A-A215F-H249R	+
N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-T213A-A215F-H249R	+
N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-G211Q-H249R	+
N018R-N076D-A232V	+
N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-A232V-Q245R	+
N018R-N043D-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-N183D-T213A-A215F-H249R	+
N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-G211Q-T213A-N237D-H249R	+
N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-H249R-R275S	+
N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-G211Q-T213A-A215F-H249R	+
S024R-N076D	+
N018R-S024R-N076D-N183D-G211Q-A215F-H249R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-T213A-A215F-H249R	+
N076D-V104I-A232V-H249R	+
N018R-N076D-S103A-A232V	+
N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-G211Q-T213A-H249R	+
N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N183D-T213A-H249R	+
N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-D175E-N183D-G211Q-A215F-H249R	+
N018R-G020R-N043D-S078R-S101G-S103A-V104I-L217E-A232V-Q245R-A273E	+
G020R-S024R-N043D-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+
P005S-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R	+
S103A-V104I-A232V	+
N018R-G020R-S024R-V068A-N076D-S101A-N116A-T213A-A215F-H249R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-I198L-A215F-H249R-R275S	+
N018R-S024R-N076D-N183D-I198L-G211Q-T213A-H249R	+

TABLA 12-2: Rendimiento de limpieza BMI de variantes de la biblioteca WCE10 a WCE14. IR = Índice de rendimiento IR > o = 1,5 es +++; IR entre 1,49 y 1,3 = ++; IR entre 1,29 y 1,0 = + en el detergente 36k o 36l	
Secuencia de variantes de GG36 (numeración BPN')	**IR relativo a GG36; ensayo BMI, Detergente 36k o 361, 16 °C**
N043D-R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+

TABLA 12-3: Índice de rendimiento BMI de variantes WCE15 y WCE16. IR = Índice de rendimiento IR > o = 1,5 es +++; IR entre 1,49 y 1,3 = ++; IR entre 1,29 y 1,0 = + en el detergente 36m	
Secuencia de variantes de GG36 (numeración BPN')	**IR relativo a GG36; Detergente 36m, BMI, 16 °C**
N018R-S024R-N043R-N076D-H249R-N269R	+++
N018R-T022R-S024R-N043R-N076D-H249R	+++
N018R-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+++
G020R-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+++
N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	+++
N043D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+++
N043R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+++
T022R-N043R-S101G-S 103A-V104I-A232V-Q245R	+++
N043R-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+++
G020R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+++
N043R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+++
T022R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+++
N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+++
N018R-S024R-N043R-N076D-H249R	+++
N018R-S024R-N076D-S242R-H249R	+++
N018R-S024R-N076D-H249R-N269R	+++
N018R-T022R-S024R-N076D-H249R	+++
N018R-S024R-N076D-S078R-H249R	+++
N018R-S024R-N043D-N076D-H249R-N269R	+++
N018R-T022R-S024R-N043D-N076D-H249R	+++
N018R-S024R-N043D-N076D-S078R-H249R	+++
G020R-S 101G-S 103G-V104I-A232V-Q245R	+++
G020R-S 101G-S 103A-V104L-A232V-Q245R	+++
G020R-S 101G-S 103A-V104V-A232V-Q245R	+++
G020R-S101G-S103S-V104I-A232V-Q245R	+++
G020R-S101G-S103S-V104L-A232V-Q245R	+++
G020R-S101S-S103S-V104I-A232V-Q245R	+++
G020R-S101S-S103S-V104L-A232V-Q245R	+++
G020R-S 101A-S 103A-V104L-A232V-Q245R	+++
G020R-S101S-S103S-V104V-A232V-Q245R	+++
G020R-S101S-S103A-V104I-A232V-Q245R	+++
G020R-S101S-S103A-V104V-A232V-Q245R	+++

TABLA 12-3: Índice de rendimiento BMI de variantes WCE15 y WCE16. IR = Índice de rendimiento IR > o = 1,5 es +++; IR entre 1,49 y 1,3 = ++; IR entre 1,29 y 1,0 = + en el detergente 36m	
Secuencia de variantes de GG36 (numeración BPN')	**IR relativo a GG36; Detergente 36m, BMI, 16 °C**
G020R-S101S-S103G-V104I-A232V-Q245R	+++
G020R-S101S-S103G-V104V-A232V-Q245R	+++
G020R-S 101A-S 103A-V104V-A232V-Q245R	+++
G020R-S101A-S103S-V104I-A232V-Q245R	+++
G020R-S101A-S103S-V104V-A232V-Q245R	+++
N018R-S024R-N043R-N076D-S078R-H249R	++
S024R-N043D-S 101G-S 103A-V104I-A232V-Q245R	++
N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R	++
S024R-N076D-S 101G-S 103A-V104I-A232V-Q245R	++
N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-S242R-Q245R	++
N018R-G020R-S024R-N076D-L217E-H249R	++
N018R-S024R-N043R-N076D-L217E-H249R	++
N018R-S024R-N043D-N076D-S242R-H249R	++
N018R-G020R-S024R-N043R-N076D-H249R	++
G020R-S101A-S103G-V104V-A232V-Q245R	++
N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+
N018R-S024R-N076D-L217E-H249R-N269R	+
N018R-S024R-N076D-L217E-S242R-H249R	+

TABLA 12-4: Rendimiento de limpieza BMI de variantes de la biblioteca WCE20 y WCE21. IR = Índice de rendimiento IR > o = 1,5 es +++; IR entre 1,49 y 1,3 = ++; IR entre 1,29 y 1,0 = + en el detergente 36m o 36n	
Secuencia de variantes de GG36 (numeración BPN')	**IR relativo a GG36; ensayo BMI, Detergente 36m o 36n, 16 °C**
G020R-S101A-S103A-V104I-G118R-A232V-Q245R	+++
G020R-S024R-N116A-T213A	+++
N043R-S101A-N116A-A215F-N269R	+++
S024R-N043R-S101A-N116A	+++
S024R-N043R-S101A-N116A-A215F-N269R	+++
G020R-S101G-S103A-V104I-A215F-A232V-Q245R	+++
N043R-S101A-N269R	+++
S024R-N043R-N116A-T213A-N269R	+++
G020R-S024R-N043R-R045T-S101A-T213A	+++
S024R-N043R-N116A-A215F-N269R	+++
G020R-S024R-T213A-A215F	+++
G020R-N116A-N269R	+++
S024R-N116A-T213A-N269R	+++
N043R-S101A-N116A-N269R	+++
S101G-S103A-V104I-N116A-T213A-A232V-Q245R-N269R	+++

TABLA 12-4: Rendimiento de limpieza BMI de variantes de la biblioteca WCE20 y WCE21. IR = Índice de rendimiento IR > o = 1,5 es +++; IR entre 1,49 y 1,3 = ++; IR entre 1,29 y 1,0 = + en el detergente 36m o 36n	
Secuencia de variantes de GG36 (numeración BPN')	**IR relativo a GG36; ensayo BMI, Detergente 36m o 36n, 16 °C**
S024R-N043R-R045T-S101A-N116A-A215F-N269R	+++
G020R-N043R-S 101A-N269R	+++
S101A-S103A-V104I-T213A-A232V-Q245R-N269R	+++
S024R-A215F-N269R	+++
N043R-S101A-N116A-T213A-A215F-N269R	+++
N043R-S101A-T213A-N269R	+++
G020R-S024R-N043R-R045T-N116A-T213A	+++
S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	+++
S024R-N043R-R045T-S 101A-N116A-T213A-N269R	+++
S024R-N043R-R045T-N269R	+++
G020R-N043R-R045T-S 101A-N269R	+++
S024R-N043R-N116A-N269R	+++
G020R-S024R-N043R-R045T	+++
N043R-N116A-N269R	+++
S024R-N043R-S101A-A215F-N269R	+++
S024R-N043R-R045T-T213A-A215F-N269R	+++
G020R-S024R-R045T-N269R	+++
G020R-N043R-S101A-N116A-T213A-A215F	+++
G020R-S101G-S103A-V104I-T213A-A215F-A232V-Q245R	+++
G020R-S024R-R045T-N116A-N269R	+++
G020R-S101A-N116A-N269R	+++
S024R-N043R-A215F	+++
G020R-S024R-T213A	+++
S024R-N043R-S101A-A215F	+++
G020R-S024R-N043R-R045T-N116A	+++
G020R-S024R-N043R-R045T-S101A-N269R	+++
G020R-S024R-S101A-A215F	+++
G020R-S024R-N116A-T213A-A215F	+++
G020R-S024R-N116A	+++
G020R-S024R-S101A-N116A	+++
N043R-T213A-A215F-N269R	+++
S024R-S101A-N269R	+++
S024R-N043R-N116A-A215F	+++
G020R-T038A-N043R-S101A	+++
G020R-S024R-N116A-A215F	+++
S024R-N043R-S101A-T213A	++
P014L-G020R-S024R-N043R-R045T-S101A-A215F	++

TABLA 12-4: Rendimiento de limpieza BMI de variantes de la biblioteca WCE20 y WCE21. IR = Índice de rendimiento IR > o = 1,5 es +++; IR entre 1,49 y 1,3 = ++; IR entre 1,29 y 1,0 = + en el detergente 36m o 36n	
Secuencia de variantes de GG36 (numeración BPN')	**IR relativo a GG36; ensayo BMI, Detergente 36m o 36n, 16 °C**
G020R-S024R-A215F	++
G020R-N116A-A215F-N269R	++
G020R-R045T-N116A-N269R	++
G020R-S024R-N043R-R045T-A215F	++
G020R-S024R-N043R-R045T-N116A-T213A-A215F	++

TABLA 12-5. Rendimiento de limpieza BMI de variantes de la biblioteca NHJ8. IR = Índice de rendimiento IR > o = 1,3 es +++; IR entre 1,29 y 1,2 = ++; IR entre 1,19 y 1,0 = + en el detergente 36f	
Secuencia de variantes de GG36 (numeración BPN')	**IR relativo a GG36; ensayo BMI, Detergente 36f, 16 °C**
N043R-N076D-S101A-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F	+++
S024R-N043R-N076D-S101A-S103A-V104I-A158E-S188D-L217E-A232V-Q245R-N248D-H249R	+++
S101A-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F-E271F	+++
S101A-S103A-V104I-A158E-S188D-L217E-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F	++
N076D-S101G-S103A-V104I-A114V-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F	++
S024R-N076D-S101G-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F	+
S024R-N043R-S101A-S103A-V104I-A158E-S188D-L217E-A232V-Q245R-N248D-H249R	+
S024R-N043R-S101A-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	+
S024R-S101A-S103A-V104I-A158E-S166D-S188D-L217E-A232V-Q245R-N248D-H249R	+
N076D-S101G-S103A-V104I-S128L-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F	+
N043R-N076D-S101G-S103A-V104I-A158E-S166D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F	+

TABLA 12-6. Rendimiento de limpieza BMI de variantes de la biblioteca NHJ8, NHJ9, NHJ14. IR = Índice de rendimiento IR > o = 1,5 es +++; IR entre 1,49 y 1,3 = ++; IR entre 1,29 y 1,0 = + en el detergente 36c	
Secuencia de variantes de GG36 (numeración BPN')	**IR relativo a GG36; ensayo BMI, Detergente 36c, 16 °C**
T022A-S 101G-S103A-V104I-G159D-L217E-A232V-Q245R-N248D-E271F	+++
T022A-N043R-S101G-S103A-V104I-G159D-S188D-L217E-A232V-Q245R-N248D-E271F	+++
T022A-S101G-S103A-V104I-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D-E271F	+++

TABLA 12-6. Rendimiento de limpieza BMI de variantes de la biblioteca NHJ8, NHJ9, NHJ14. IR = Índice de rendimiento IR > o = 1,5 es +++; IR entre 1,49 y 1,3 = ++; IR entre 1,29 y 1,0 = + en el detergente 36c	
Secuencia de variantes de GG36 (numeración BPN')	**IR relativo a GG36; ensayo BMI, Detergente 36c, 16 °C**
N043R-S101A-S 103A-V104I-A158E-S188D-L217E-A232V-Q245R-N248D-H249R	+++
N043R-N076D-S101A-S103A-V104I-A158E-S188D-L217E-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F	+++
S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-S188D-L217E-A232V-Q245R-N248D-H249R	+++
S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	+++
S101G-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	+++
S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-N183D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	+++
T022A-N076D-S101G-S103A-V104I-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D-E271F	++
T022A-N043R-N076D-S101G-S103A-V104I-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D-E271F	++
T022A-N076D-S101G-S103A-VI041-G159D-A232V-Q245R-N248D-E271F	++
T022A-S101G-S 103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-E271F	++
N076D-S101A-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F	++
N043R-S101A-S103A-V104I-A158E-S166D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	++
S024R-N076D-S101A-S103A-V104I-A158E-S166D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F	++
N076D-S101A-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	++
S 101A-S 103A-V104I-A158E-S166D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F	++
N043R-N076D-S101A-S103A-V104I-A158E-S166D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F	++
S 101G-S 103A-V104I-A158E-S166D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F	++
S 101A-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F	++
S 101A-S 103A-V104I-A158E-S188D-L217E-A232V-Q245R-N248D-H249R	++
N076D-S101A-S103A-V104I-A158E-S166D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F	++
S101G-S103A-V104I-A158E-N183D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	++
S024R-S101G-S103A-V104I-S128L-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	++
N076D-S101G-S103A-V104I-A158E-S166D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F	+

TABLA 12-6. Rendimiento de limpieza BMI de variantes de la biblioteca NHJ8, NHJ9, NHJ14. IR = Índice de rendimiento IR > o = 1,5 es +++; IR entre 1,49 y 1,3 = ++; IR entre 1,29 y 1,0 = + en el detergente 36c	
Secuencia de variantes de GG36 (numeración BPN')	**IR relativo a GG36; ensayo BMI, Detergente 36c, 16 °C**
N043R-N076D-S101A-S103A-V104I-A158E-S166D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	+
N076D-S101A-S103A-V104I-A158E-S188D-L217E-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F	+

TABLA 12-7. Índice de rendimiento BMI de variantes de la biblioteca NHJ9. IR = Índice de rendimiento IR > o = 1,3 es +++; IR entre 1,29 y 1,2 = ++; IR entre 1,19 y 1,0 = + para el detergente 36f	
Secuencia de variantes de GG36 (numeración BPN')	**IR relativo a GG36; ensayo BMI; Detergente 36f, 16 °C**
H017R-T022A-N076D-S101G-S103A-V104I-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D-E271F	+++
T022A-N043R-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-E271F	++
T022A-S 101G-S103A-V104I-G159D-S 188D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F	++
H017R-T022A-N076D-S101G-S 103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-E271F	++
T022A-N076D-S 101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F	+
T022A-S101G-G102A-S103A-V104I-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D-E271F	+
T022A-N043R-N076D-S101G-S 103A-V1041-G159D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F	+

TABLA 12-8. Rendimiento de limpieza BMI de variantes NHJ11. IR = Índice de rendimiento IR > o = 1,5 es +++; IR entre 1,49 y 1,3 = ++; IR entre 1,29 y 1,0 = + en el detergente 36a o 36c	
Secuencia de variantes de GG36 (numeración BPN')	**IR relativo a GG36; ensayo BMI, Detergente 36a o 36c1 sin blanqueador 16 °C**
S101S-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	+++
S101S-S103G-V104V-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	+++
S101G-S103S-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	+++
S101A-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	+++
S101A-S103A-V104L-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	+++
S101G-S103G-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	+++
S101S-S103G-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	+++
S101S-S103S-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	++

TABLA 12-8. Rendimiento de limpieza BMI de variantes NHJ11. IR = Índice de rendimiento IR > o = 1,5 es +++; IR entre 1,49 y 1,3 = ++; IR entre 1,29 y 1,0 = + en el detergente 36a o 36c	
Secuencia de variantes de GG36 (numeración BPN')	**IR relativo a GG36; ensayo BMI, Detergente 36a o 36c1 sin blanqueador 16 °C**
S101S-S103S-V104V-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	++
S101A-S103S-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	++
S 101A-S 103S-V104I-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R	++
S101S-S103A-V104I-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R	++
S101G-S103A-V104L-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	++
S101A-S103A-V104L-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R	+
S101A-S103S-V104L-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R	+
S101G-S103S-V104L-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R	+
S101S-S103A-V104L-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R	+
S101A-S103G-V104V-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R	+
S101S-S103A-V104V-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R	+

TABLA 12-9. Rendimiento de limpieza BMI de variantes NHJ12. IR = Índice de rendimiento IR > o = 1,3 es +++; IR entre 1,29 y 1,2 = ++; IR entre 1,19 y 1,0 = + en el detergente 36a	
Secuencia de variantes de GG36 (numeración BPN')	**IR relativo a GG36; ensayo BMI, Detergente 36a, 16 °C**
V026F-V051W-V104L-S106E	+++
V026F-L031F-S078N-G102A-S160D	+++
G020K-G100S-N116L-A158E-S166D-N243F	+++
T033S-N043W-N218D-P239G-N243F	+++
T022L-T038F-A048R-N062E-G100S-R186K	+++
S 101D-S 103N-N116L-S144R-A215D	+++
V104L-S105T-T213A-L217E-S256N	+++
N043W-S101D-S212M-N243F	+++
V026F-A048R-S105T-T213A-N218D-T224A	+++
S024F-S101D-G118R-A215D-L250I-A272F	++
V121F-N185E-T224A-P239G	++
T022L-L031F-G102A-S128D-T224A-N243F	++
N062E-S078N-G102A-N116L-S 144R-L250I	++
T022L-T038F-V 121F-S 160D-A272F	++
V026F-S078N-G159C-R186K-N243F	++

TABLA 12-9. Rendimiento de limpieza BMI de variantes NHJ12. IR = Índice de rendimiento IR > o = 1,3 es +++; IR entre 1,29 y 1,2 = ++; IR entre 1,19 y 1,0 = + en el detergente 36a	
Secuencia de variantes de GG36 (numeración BPN')	**IR relativo a GG36; ensayo BMI, Detergente 36a, 16 °C**
S024F-A048R-G118R-S166D-L217E	++
G023A-T038F-S078N-G100S-S212M-A215D	++
G100S-N116L-A158E-T213A	++
S078N-V104L-G118R-S128D	++
G102A-S103N-S105T-A194E	++
T022L-S078N-S128D-T213A	+
K027R-G100S-G118R-S160D-S188D-N243F	+
S024F-G102A-R186K-T213A-L217E-N243F	+
T033S-S105T-S188D-S216F	+
G023A-G100S-A194E-S212M	+
A048R-S128D-N185E-P239G	+
G020K-S024F-T033S-P129E-A194E	+
G020K-K027R-P129E-S166D-P239G	+
T022L-G023A-K027R-S101D-V104L-S216F	+
T033S-G118R-P129E-A194E-P239G	+
T022L-S078N-N116L-P129E-S256N	+
K027R-S101D-S103N-S105T-A272F	+
A048R-S078N-N116L-N185E-L217E-P239G	+
G023A-S024F-K027R-N062E	+
S024F-S103N-V104L-G118R-S188D	+
V026F-V104L-S256N-A272F	+
S024F-N043W-V104L-V121F-P129E	+
N062E-S078N-N116L-T224A	+
G023A-S024F-V051W-A158E	+
K027R-T038F-G102A-N116L	+
N062E-S078N-S144R-S212M	+
L031F-N116L-S256N-A272F	+
T022L-T033S-V104L-N116L-S160D-R186K	+
S024F-G118R-P129E-R186K-T213A	+
N043W-S105T-T213A-A215D-S216F	+
L031F-S105T-R186K-S188D	+
V026F-A194E-T213A-S256N	+
S103N-S160D-L250I-S256N	+

TABLA 12-10. Rendimiento de limpieza BMI de variantes de la biblioteca NHJ15. IR = Índice de rendimiento IR > o = 1,3 es +++; IR entre 1,29 y 1,2 = ++; IR entre 1,19 y 1,0 = + en el detergente 36a	
Secuencia de variantes de GG36 (numeración BPN')	**IR relativo a GG36; ensayo BMI, Detergente 36a, 16 °C**
T022A-S024R-S101D-S103A-V104I-G118R-G159D-	+++

TABLA 12-10. Rendimiento de limpieza BMI de variantes de la biblioteca NHJ15. IR = Índice de rendimiento IR > o = 1,3 es +++; IR entre 1,29 y 1,2 = ++; IR entre 1,19 y 1,0 = + en el detergente 36a	
Secuencia de variantes de GG36 (numeración BPN')	**IR relativo a GG36; ensayo BMI, Detergente 36a, 16 °C**
S188D-A232V-N248D-E271F	
T022A-S024R-S 103A-V104I-P129E-G159D-S 188D-A232V-N248D-E271F	+++
T022A-S024R-S103A-V104I-G118R-G159D-S188D-L217D-A232V-N248D	+++
T022A-S024R-S101D-S103A-V104I-G118R-P129E-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D	+++
T022A-S024R-S101D-S103A-V104I-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D	+++
T022A-N043R-S103A-V104I-G118R-P129E-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D	+++
T022A-N043R-S103A-V104I-G118R-S128I-P129E-G159D-S188D-A232V-N248D	++
T022A-N043R-S101D-S103A-V104I-G118R-P129E-G159D-S188D-A232V-N248D-E271F	++
T022A-S024R-N043R-S101D-S103A-V104I-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D	++
T022A-S 103A-V104I-G159D-S188D-A232V-N248D	++
T022A-S024R-S103A-V104I-G118R-P129E-G159D-S188D-A232V-N248D-E271F	++
T022A-S024R-S103A-V104I-G159D-S188D-L217D-A232V-Q245R-N248D-E271F	++
T022A-N043R-N062E-S103A-V104I-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D-E271F	++
T022A-N043R-S103A-V104I-P129E-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D	++
T022A-S024R-S 103A-V104I-G159D-S188D-L217D-A232V-N248D-E271F	++
T022A-S103A-V104I-G118R-G159D-S188D-L217D-A232V-Q245R-N248D	++
T022A-S024R-S101D-S103A-V104I-G118R-S128I-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D	++
T022A-S024R-N043R-SI03A-V104I-G159D-S188D-L217D-A232V-N248D-E271F	++
T022A-N043R-S103A-V104I-G118R-G159D-S188D-L217D-A232V-N248D-E271F	++
T022A-N043R-S103A-V104I-G118R-G159D-S188D-A232V-N248D-E271F	++
T022A-S103A-V104I-S128I-P129E-G159D-S188D-A232V-N248D-E271F	+
T022A-S 103A-V104I-G159D-S 188D-L217D-A232V - Q245R-N248D-E271F	+
T022A-N043R-S103A-V104I-S128I-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D	+
T022A-S101D-S103A-V104I-G118R-G159D-S188D-L217D-A232V-Q245R-N248D-E271F	+

TABLA 12-10. Rendimiento de limpieza BMI de variantes de la biblioteca NHJ15. IR = Índice de rendimiento IR > o = 1,3 es +++; IR entre 1,29 y 1,2 = ++; IR entre 1,19 y 1,0 = + en el detergente 36a	
Secuencia de variantes de GG36 (numeración BPN')	**IR relativo a GG36; ensayo BMI, Detergente 36a, 16 °C**
T022A-S103A-V104I-G118R-P129E-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D-E271F	+
T022A-S024R-N043R-S103A-V104I-G118R-G159D-S188D-L217D-A232V-N248D	+
T022A-N062E-S103A-V104I-G118R-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D	+
T022A-N043R-S101D-S103A-V104I-G118R-P129E-G159D-S188D-L217D-A232V	+
T022A-S024R-S103A-V104I-G159D-S188D-L217D-A232V-N248D	+
T022A-S024R-N043R-S103A-V104I-G118R-S128I-P129E-G159D-S188D-L217D-A232V-N248D-E271F	+
T022A-S103A-V104I-G118R-G159D-S188D-L217D-A232V-Q245R-N248D-E271F	+

TABLA 12-11. Rendimiento de limpieza BMI de variantes de la biblioteca NHJ16. IR = Índice de rendimiento IR > o = 1,3 es +++; IR entre 1,29 y 1,2 = ++; IR entre 1,19 y 1,0 = + en el detergente 36a	
Secuencia de variantes de GG36 (numeración BPN')	**IR relativo a GG36; Detergente 36a, 16 °C**
G020K-S024F-N062E-S 188D- P239G	+++
S024F-N062E-N116L-P239G	+++
G020K-G023A-N062E-S188D	+++
G020K-G023A-S024F-N062E-G118R-S188D-T213A	+++
G020K-N043W-N062E-N116L-S188D-T213A-P239G	+++
G023A-N062E-N116L-G118R	+++
G023A-S024F-N062E-N116L-G118R	+++
S024F-N116L	+++
S024F-N062E-S188D-T213A	+++
G023A-N062E-N116L-G118R-S188D-P239G	+++
G020K-S024F-N062E	++
G020K-N043W-N062E-N116L-P239G	++
S024F-N062E-N116L-T213A-P239G	++
G020K-S024F-N043W-N062E-N116L-T213A	++
G020K-G023A-S024F-N062E-N116L-S188D-T213A	++
S024F-N062E-S188D-P239G	++
G023A-N043W-N062E-N116L-G118R-T213A	++
N062E-S188D-P239G	++
G020K-S024F-N062E-P239G	+
S024F-N116L-G118R-S188D-P239G	+
G020K-G023A-N062E-N116L-G118R-T213A	+
G020K-G023A-S024F-N062E-S188D-T213A-P239G	+

TABLA 12-11. Rendimiento de limpieza BMI de variantes de la biblioteca NHJ16. IR = Índice de rendimiento IR > o = 1,3 es +++; IR entre 1,29 y 1,2 = ++; IR entre 1,19 y 1,0 = + en el detergente 36a	
Secuencia de variantes de GG36 (numeración BPN')	**IR relativo a GG36; Detergente 36a, 16 °C**
S024F-N043W-G118R-S188D	+
G023A-S024F-N116L-G118R-S188D-T213A	+
G020K-G023A-N043W-N116L-S188D-T213A-P239G	+
G023A-S024F-N116L-S188D-P239G	+
G023A-N043W-N116L-G118R-S188D	+
G023A-S024F-G118R-S188D-P239G	+
G023A-S024F-N043W-N062E-N116L-G118R	+
G020K-N043W-S188D-T213A	+
S024F-N062E-G118R-P239G	+
G023A-N043W-S188D-T213A	+
G020K-S024F-N043W-N062E-N116L-G118R-S188D-P239G	+
G020K-N116L-S188D-P239G	+
G020K-N043W-N062E-G118R	+
G020K-N043W-N116L-S188D-T213A	+
G020K-S024F	+
G023A-N043W-N116L-P239G	+
G023A-S024F-N043W-N116L-G118R-S188D-P239G	+
G020K-G023A-N043W-T213A	+
G023A-S024F-N062E-G118R-T213A-P239G	+

TABLA 12-12. Rendimiento de limpieza BMI de variantes de la biblioteca NHJ15 y NHJ16. IR = Índice de rendimiento IR > o = 1,3 es +++; IR entre 1,29 y 1,2 = ++; IR entre 1,19 y 1,0 = + en el detergente 36a, 36d o 36f	
Secuencia de variantes de GG36 (numeración BPN')	**IR relativo a GG36; BMI Detergente 36a, 36d o 36f; 16 °C**
G020K-G023A-N043W-G118R-S128I-P129E-G159D-S188D	+++
S024F-G118R-S128I-P129E-G159D	+++
G020K-S024F-N062E-N116L-G118R-S188D	+++
G020K-N062E-N116L-S188D	+++
N062E-N116L-G118R-T213A	+++
G020K-G023A-N062E-N116L-S188D	+++
N062E-N116L-G118R-S188D	+++
G020K-N062E-N116L-T213A	+++
G020K-G023A-N062E-N116L	+++
G020K-N062E-S188D-T213A	+++
G020K-N062E	+++
G020K-S024F-N062E-N116L-S188D	+++
G020K-N043W-N062E-N116L-S188D	+++
G020K-S024F-N062E-S 188D-T213A	+++

TABLA 12-12. Rendimiento de limpieza BMI de variantes de la biblioteca NHJ15 y NHJ16. IR = Índice de rendimiento IR > o = 1,3 es +++; IR entre 1,29 y 1,2 = ++; IR entre 1,19 y 1,0 = + en el detergente 36a, 36d o 36f	
Secuencia de variantes de GG36 (numeración BPN')	**IR relativo a GG36; BMI Detergente 36a, 36d o 36f; 16 °C**
N062E-N116L-S188D-T213A	+++
G020K-N062E-N116L	+++
G020K-G023A-N062E-N116L-S188D-T213A	+++
G023A-S024F-N062E-N116L-T213A	+++
T022A-N043R-S103A-V104I-S128I-P129E-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D	+++
T022A-N043R-S103A-V104I-G118R-S128I-P129E-G159D-S188D-A232V-N248D-E271F	+++
S024F-N062E-N116L-S188D	+++
T022A-S024R-S103A-V104I-G118R-S128I-P129E-G159D-S188D-A232V-N248D	+++
G023A-N062E-N116L-S188D	+++
N043W-N062E-N116L	+++
G020K-G023A-N116L-S188D	++
N043W-N062E-N116L-S188D	++
S024F-N062E-N116L	++
N062E-N116L-S188D	++
T022A-S024R-S103A-V104I-S128I-G159D-S188D-A232V-N248D	+

EJEMPLO 13

Construcción de bibliotecas y variantes adicionales de GG36

[0320] Este Ejemplo describe la limpieza en agua fría de variantes adicionales de GG36 y bibliotecas construidas en *B. subtilis*. La mayoría de las bibliotecas de ADN se sintetizaron en DNA2.0, Inc., utilizando el plásmido de expresión de *B. subtilis* pHPLT-GG36. Las reacciones de ligación de las bibliotecas construidas se transformaron en la cepa de *B. subtilis* (genotipo: ΔaprE, ΔnprE, amyE::xylRPxylAcomK-phleo) tras la amplificación del ADN mediante amplificación de círculo rodante, según se ha descrito en el Ejemplo 4. La biblioteca y variantes WCE9 y NHJ10 se crearon mediante PCR de extensión o mutagénesis por QuickChange (véase el Ejemplo 4 para la descripción de métodos). La biblioteca y variantes WCE9 y NHJ10 se crearon también utilizando el plásmido de expresión pHPLT-GG36 de *B. subtilis*. Las variantes se expresaron en células de *B. subtilis* (genotipo: ΔaprE, ΔnprE, amyE::xylRPxylAcomK-phleo) según lo descrito en el Ejemplo 1, y además se caracterizaron utilizando el ensayo de limpieza de micromuestras BMI descrito en el Ejemplo 1. En las siguientes tablas, las composiciones detergentes ("Det.") corresponden a las que se muestran en la Tabla 1-2 expuesta anteriormente. Asimismo, según lo indicado, la posición de aminoácido se lista de acuerdo con la numeración BPN'.

TABLA 13-1: Rendimiento de limpieza BMI de variantes WCE5. IR = Índice de rendimiento IR > o = 1,5 es +++; IR entre 1,49 y 1,3 = ++; IR entre 1,29 y 1,0 = + en el detergente 36k o 36l	
Secuencia de variantes de GG36 (numeración BPN')	**IR relativo a GG36; ensayo BMI, Detergente 36k o 36l, 16 °C**
S087R-S101G-S103A-V104I-Q109R-S212P-A232V-Q245R-E271V	+++
S101G-S103A-V104I-Q109R-A232V-Q245R	+++
S101G-S103A-V104I-Q109R-S212P-A232V-Q245R-E271V	+++
S101G-S103A-V104I-Q109R-S212P-A232V-Q245R	+++

TABLA 13-1: Rendimiento de limpieza BMI de variantes WCE5. IR = Índice de rendimiento IR > o = 1,5 es +++; IR entre 1,49 y 1,3 = ++; IR entre 1,29 y 1,0 = + en el detergente 36k o 36l	
Secuencia de variantes de GG36 (numeración BPN')	**IR relativo a GG36; ensayo BMI, Detergente 36k o 36l, 16 °C**
N076D-S87R-S103A-V104I-S212P-E271V	+++
N076D-S103A-V104I-Q109R	+++
N076D-S103A-V104I-S212P-E271V	+++
N076D-S103A-V104I-Q109R-Q245R	+++
N076D-S 103A-V104I-S212P-Q245L-E271V	+++

TABLA 13-2: Rendimiento de limpieza BMI de variantes WCE9. IR = Índice de rendimiento IR > o = 1,5 es +++; IR entre 1,49 y 1,3 = ++; IR entre 1,29 y 1,0 = + en el detergente 36j, 36d o 36e	
Secuencia relativa a GG36 (numeración BPN')	**IR relativo a GG36; ensayo BMI, Detergente 36j, 36d o 36e, 16 °C**
S024R-P086W-G118R	+++
S024R-S078R-P086W-N243F	+++
S024R-T033S-P086S-S087N-Y209A	+++
T033S-G118R	+++
S024R-S078R-P086W-G118R-A270T	+++
S024R-T033S-P086W-G118R	+++
S078R-P086W-N243F	+++
T033S-S078R-P086W-G118R-Y209A	+++
T033S-S078R-Y209A	+++
P086W-G118R-N243F	+++
S024R-P086W	+++
S078R-P086W-K235F	+++
S024R-G118R	+++
S024R-P086R	+++
S101G-S103A-V104I-A232V	+++
S024R-T033S-S078R-P086W-G118R	+++
S024R-G118R-Y209A	+++
Y209A-W241R	+++
T033S-P086W-N243F	+++
T033S-A172V-Y209A	+++
G118R-Y209A-N243F	+++
S024R-P086S-S141G	+++
S024R-G118R-Y209A-N243F	+++
S024R-T033S-P086S-S085N-K235F	+++
S024R-T033S-A133V	+++
S024R-T033S-S078R-P086W	+++
S024R-P086W-Y209A	+++
S024R-W241R	+++

TABLA 13-2: Rendimiento de limpieza BMI de variantes WCE9. IR = Índice de rendimiento IR > o = 1,5 es +++; IR entre 1,49 y 1,3 = ++; IR entre 1,29 y 1,0 = + en el detergente 36j, 36d o 36e	
Secuencia relativa a GG36 (numeración BPN')	**IR relativo a GG36; ensayo BMI, Detergente 36j, 36d o 36e, 16 °C**
T033S-G118R-N243F	+++
S024R-K235F	+++
S024R-S078R-P086W	+++
S024R-G118R-Y209A-K235F	+++
S024R-Y209A-W241R	+++
T033S-G118R-W241R	+++
P086W-G118R-Y209A	+++
T033S-G118R-G159D-Y209A	+++
T033S-S078R-P086W	+++
S024R-P086W-N243F	+++
G118R-Y209A	+++
S024R-P086W-G118R-V203I	+++
S078R-Y209A-K235F	+++
S024R-T033S-W241R	+++
S078R-G118R	+++
T033S-G118R-Y209A-N243F	+++
L021M-S024R-T033S	+++
S024R-T033S-P086W	+++
T033S-K235F	+++
S078R-P086W-Y209A	+++
S024R-T033S-Y209A-K235F	+++
T033S-P086W-G118R	+++
S024R-T033S-S078R-Y209A	+++
T033S-P086W-G118R-Y209A-N243F	+++
P086W-Y209A-N243F	+++
P005S-S078R-G118R-W241R	+++
S024R-A174T	+++
T033S-Y209A-N243F	+++
P086W-G118R-A133V	+++
S024R-T033S-G118R	+++
S024R-P086W-Y209A-K235F	++
P086W-Y209A	++
I008T-S024R	++
P086W-G118R	++
T033S-W241R	++
P005S-S024R-T033S-N243F	++
S024R-Y209A-S242P	++
S024R-T033S-S078R-G118R	++

TABLA 13-2: Rendimiento de limpieza BMI de variantes WCE9. IR = Índice de rendimiento IR > o = 1,5 es +++; IR entre 1,49 y 1,3 = ++; IR entre 1,29 y 1,0 = + en el detergente 36j, 36d o 36e	
Secuencia relativa a GG36 (numeración BPN')	**IR relativo a GG36; ensayo BMI, Detergente 36j, 36d o 36e, 16 °C**
S024R-T033S-A194T	++
S024R-N243F	++
S024R-Y209A	++
S024R-T033S-G118R-Y209A	++
T033S-P086W	++
S024R-T033S	++
S024R-T033S-S078R-N243F	++
P086W-N243F	++
T033S-G118D-A138V-Y209A	++
T033S-Y209A-K235F	++
S024R-P086R-G118R	++
T033S-P201S	++
S024R-P239Q	++
T033S-G118R-Y209A-	++
S078R-P086W	++
K235F-N243F	++
S024R-Y209A-K235F	++
G118R-A172V	++
H017Y-S024R-T033S-P086W	++
T033S-L148F	++
S024R-G118R-K235F	++
T033S-S078R	++
T033S-N243F	++
S024C-T033S	++
G118R-A194T	++
T033S-Y209A	++
G118R-Y209A-K235F	++
S024R-T033S-Y209A-N243F	++
S024R-T033S-K235F	++
S024R-T033S-G118R-K235F	++
S024R-S141G	++
S024R-T274I	++
S024R-T033S-Y209A	++
P086W-K235F	+
S024R-Y209A-N243F	+
V004E-T033S-S078R	+
P086W-Y209A-K235F	+
A015T-T033S	+

TABLA 13-2: Rendimiento de limpieza BMI de variantes WCE9. IR = Índice de rendimiento IR > o = 1,5 es +++; IR entre 1,49 y 1,3 = ++; IR entre 1,29 y 1,0 = + en el detergente 36j, 36d o 36e	
Secuencia relativa a GG36 (numeración BPN')	**IR relativo a GG36; ensayo BMI, Detergente 36j, 36d o 36e, 16 °C**
T033S-P086W-S 156L-Y209A	+
S024R-G118R-N243F-R269H	+
Y209A-K235F	+
S024R-R247H	+
S024R-T033S-A228T	+
S078R-K235F	+
S024R-T033S-A174V-K235F	+
S024R-K235F-N243F	+
S024R-T033S-K235F-W241R	+
S024R-T033S-A151V	+
S024R-V104A	+
T033S-A048T	+
Q012H-V104A-G118R	+
G118R-K235F	+
T033S-T253A	+
T143A-Y209A	+
S024R-T033S-N243F	+
T033S-P239T	+
Y209A-N243F	+
S024R-T033S-P129H-N184D-T253M	+
S024R-A085V-P086W-G118R-K235F	+
S024R-A272P	+
S024R-R269C	+

TABLA 13-3: Rendimiento de limpieza BMI de variantes WCE15. IR = Índice de rendimiento IR > o = 1,5 es +++; IR entre 1,49 y 1,3 = ++; IR entre 1,29 y 1,0 = + en el detergente 36m	
Secuencia de variantes de GG36 (numeración BPN')	**IR relativo a GG36; ensayo BMI, Detergente 36m, 16 °C**
G020R-S087D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+++
G020R-S101G-S103A-V104I-V150L-A232V-Q245R	+++
N018R-G020R-S024R-N076D-S087D-H249R	+++
N018R-G020R-S024R-N076D-V150L-H249R	+++
N018R-S024R-N043R-N076D-S087D-H249R	+++
N018R-S024R-N043R-N076D-V150L-H249R	+++
N018R-S024R-N076D-S078R-S087D-H249R	+++
N018R-S024R-N076D-S078R-V150L-H249R	+++
N018R-S024R-N076D-S087D-H249R-N269R	+++
N018R-S024R-N076D-S087D-S242R-H249R	+++

TABLA 13-3: Rendimiento de limpieza BMI de variantes WCE15. IR = Índice de rendimiento IR > o = 1,5 es +++; IR entre 1,49 y 1,3 = ++; IR entre 1,29 y 1,0 = + en el detergente 36m	
Secuencia de variantes de GG36 (numeración BPN')	**IR relativo a GG36; ensayo BMI, Detergente 36m, 16 °C**
N018R-S024R-N076D-S087D-V150L-H249R	+++
N018R-S024R-N076D-V150L-H249R	+++
N018R-S087D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+++
N018R-S101G-S103A-V1041-V150L-A232V-Q245R	+++
N018R-T022R-S024R-N076D-S087D-H249R	+++
N018R-T022R-S024R-N076D-V150L-H249R	+++
N043R-S087D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	+++
N043R-S101G-S103A-V104I-V150L-A232V-Q245R	+++
S024R-S087D-S 101G-S 103A-V104I-A232V-Q245R	+++
S024R-S101G-S103A-V104I-V150L-A232V-Q245R	+++
S078R-S087D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+++
S078R-S101G-S103A-V104I-V150L-A232V-Q245R	+++
S087D-S 101G-S 103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	+++
S101G-S103A-V104I-V150L-A232V-Q245R-H249R	+++
S101G-S103A-V104I-V150L-A232V-Q245R-N269R	+++
T022R-S087D-S 101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+++
N018R-S024R-N043D-N076D-V150L-H249R	++
N043R-S087D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	++
T022R-S101G-S 103A-V104I-V150L-A232V-Q245R	++
N018R-S024R-N043D-N076D-S087D-H249R	+
N018R-S024R-N076D-S087D-H249R	+
N018R-S024R-N076D-V150L-S242R-H249R	+
N043R-S101G-S 103A-V1041-V150L-A232V-Q245R-N269R	+
N076D-S101G-S103A-V104I-V150L-A232V-Q245R	+
S087D-S 101G-S 103A-V104I-A232V-S242R-Q245R	+
S101G-S103A-V104I-V150L-A232V-Q245R	+
N076D-S087D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+
S087D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+
S101G-S103A-V104I-V150L-A232V-S242R-Q245R	+

TABLA 13-4: Rendimiento de limpieza BMI de variantes de la biblioteca NHJ14. IR = Índice de rendimiento IR > o = 1,5 es +++; IR entre 1,49 y 1,3 = ++; IR entre 1,29 y 1,0 = + en el detergente del Ejemplo 36c	
Secuencia de variantes de GG36 (numeración BPN')	**IR relativo a GG36; ensayo BMI, Detergente 36c, 16 °C**
S024R-S101G-S103A-V104I-P129Q-A158E-S188D-L217E-A232V-Q245R-N248D-H249R	+++
S024R-S101G-S103A-V104I-S130A-A158E-N183D-S188D-	+++

TABLA 13-4: Rendimiento de limpieza BMI de variantes de la biblioteca NHJ14. IR = Índice de rendimiento IR > o = 1,5 es +++; IR entre 1,49 y 1,3 = ++; IR entre 1,29 y 1,0 = + en el detergente del Ejemplo 36c	
Secuencia de variantes de GG36 (numeración BPN')	**IR relativo a GG36; ensayo BMI, Detergente 36c, 16 °C**
A232V-Q245R-N248D-H249R	
S024R-S101G-S103A-V104I-P129Q-A158E-N183D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	+++
S101G-S103A-V104I-S130A-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	+++
S024R-S101G-S103A-V104I-P129Q-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	+++
S024R-S101G-S103A-V104I-S130A-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	+++
S024R-S101G-S103A-V104I-P129Q-S130A-A158E-N183D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	+++
S024R-S101G-S103A-V104I-S128L-P129Q-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	+++
S024R-S101G-S103A-V104I-P129Q-S130A-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	++
S101G-S103A-V104I-P129Q-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	++
S101G-S103A-V104I-P129Q-S130A-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	++
S024R-S101G-S103A-V104I-S128L-P129Q-S130A-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	++
S101G-S103A-V104I-S128L-P129Q-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	++
S024R-K027R-S101G-S103A-V104I-S128L-P129Q-S130A-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	++

TABLA 13-5: Rendimiento de limpieza BMI de variantes NHJ10. IR = Índice de rendimiento IR > o = 1,3 es +++; IR entre 1,29 y 1,2 = ++; IR entre 1,19 y 1,0 = + en el detergente 36a	
Secuencia de variantes de GG36 (numeración BPN')	**IR relativo a GG36; ensayo BMI, Detergente 36a, 16 °C**
S101G-S103A-V104I-A232V-M222Q-Q245R	+++
S101G-S103A-V104I-A158E-S188D-M222S-A232V-Q245R-N248D-H249R	+++
S101G-S103A-V104I-A158E-S188D-M222Q-A232V-Q245R-N248D-H249R	+++
N076D-S101G-S 103A-V104I-A232V-M222Q-Q245R	+++
S101G-S103A-V104I-A232V-M222S-Q245R	++
N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-M222S-Q245R	++
N076D-S101G-S103A-V104I-A158E-S188D-M222S-A232V-Q245R-N248D-H249R	+

TABLA 13-6: Rendimiento de limpieza BMI de variantes de la biblioteca NHJ14. IR = Índice de rendimiento IR > o = 1,3 es +++; IR entre 1,29 y 1,2 = ++; IR entre 1,19 y 1,0 = + en el detergente 36f	
Secuencia de variantes de GG36 (numeración BPN')	**IR relativo a GG36; ensayo BMI, Detergente 36f, 16 °C**
S024R-S101G-S103A-V104I-S128L-P129Q-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	+++
S101G-S103A-V104I-S130A-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	+++
S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	++
S101G-S103A-V104I-S128L-P129Q-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	++
S101G-S103A-V104I-P129Q-S130A-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	++
S101G-S103A-V104I-S130A-A158E-N183D-S188D-L217E-A232V-Q245R-N248D-H249R	++
S024R-S101G-S103A-V104I-S128L-P129Q-S130A-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	++
S024R-S101G-S103A-V104I-P129Q-A158E-S188D-L217E-A232V-Q245R-N248D-H249R	++
S101G-S103A-V104I-S128L-S130A-A158E-S188D-L217E-A232V-Q245R-N248D-H249R	++
S024R-S101G-S103A-V104I-S128L-P129Q-A158E-N183D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	+
S024R-S101G-S103A-V104I-S128L-P129Q-S130A-A158E-N183D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	+
S024R-S101G-S103A-V104I-S128L-P129Q-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271G	+
S101G-S103A-V104I-P129Q-A158E-N183D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	+
S024R-S101G-S103A-V104I-S130A-A158E-S188D-L217E-A232V-Q245R-N248D-H249R	+
S024R-S101G-S103A-V104I-S128L-A158E-N183D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	+
S101G-S103A-V104I-P129Q-A158E-S188D-L217E-A232V-Q245R-N248D-H249R	+
S024R-S101G-S103A-V104I-S128L-S130A-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	+

EJEMPLO 14

Composiciones para ropa granuladas y/o en pastilla

[0321] Este Ejemplo expone diversas fórmulas para detergentes para ropa granulados y/o en pastilla. Las siguientes composiciones para ropa, que pueden encontrarse en forma de gránulos o pastilla, se dan a conocer a continuación. En cada una de estas fórmulas, se incluye al menos una variante de proteasa expuesta en el presente documento en una concentración de aproximadamente 0,0001 a aproximadamente 10 por ciento en peso. En algunos ejemplos alternativos, se podrán utilizar otras concentraciones, según determine el formulador, en función de sus necesidades.

Tabla 14-1: Composiciones para ropa granuladas y/o en pastilla					
Compuesto	**Fórmulas**				
	I	**II**	**III**	**IV**	**V**
Producto de base					
C_{14}-C_{15}AS o TAS	8,0	5,0	3,0	3,0	3,0
LAS	8,0	-	8,0	-	7,0
C_{12}-$C_{15}AE_3S$	0,5	2,0	1,0	-	-
C_{12}-$C_{15}E_5$ o E_3	2,0	-	5,0	2,0	2,0
QAS	-	-	-	1,0	1,0
Zeolita A	20,0	18,0	11,0	-	10,0
SKS-6 (aditivo seco)	-	-	9,0	-	-
MA/AA	2,0	2,0	2,0	-	-
AA	-	-	-	-	4,0
Citrato de 3Na $2H_2O$	-	2,0	-	-	-
Ácido cítrico (anhidro)	2,0	-	1,5	2,0	-
DTPA	0,2	0,2	-	-	-
EDDS	-	-	0,5	0,1	-
HEDP	-	-	0,2	0,1	-
PB1	3,0	4,8	-	-	4,0
Percarbonato	-	-	3,8	5,2	-
NOBS	1,9	-	-	-	-
NACA OBS	-	-	2,0	-	-
TAED	0,5	2,0	2,0	5,0	1,00
BB1	0,06	-	0,34	-	0,14
BB2	-	0,14	-	0,20	-
Carbonato de Na anhidro	15,0	18,0	-	15,0	15,0
Sulfato	5,0	12,0	5,0	17,0	3,0
Silicato	-	1,0	-	-	8,0
nprE (opcional)	0,03	-	0,1	0,06	-
PMN	-	0,05	-	-	0,1
Proteasa B (opcional)	-	0,01	-	-	-
Proteasa C (opcional)	-	-	-	0,01	-
Lipasa	-	0,008	-	-	-
Amilasa	0,001	-	-	-	0,001
Celulasa	-	0,0014	-	-	-
Pectina liasa	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
Aldosa oxidasa	0,03	-	0,05	-	-
PAAC	-	0,01	-	-	0,05
Resto hasta el 100 % Humedad y/o Componentes menores*					
* Perfume, tinte, abrillantador / SRP1 / carboximetilcelulosa de Na / fotoblanqueador / $MgSO_4$ / PVPVI/ supresor de espuma /PEG de alto peso molecular/arcilla.					

EJEMPLO 15

Composiciones detergentes en pastilla

[0322] Este Ejemplo da a conocer diversas fórmulas de detergentes en pastilla. Las siguientes composiciones detergentes en pastilla se preparan mediante compresión de una composición detergente granulada de lavavajillas con una presión de 13 KN/cm^2 utilizando una prensa rotativa estándar de 12 cabezales. En cada una de estas fórmulas, se incluye al menos una variante de proteasa expuesta en el presente documento en una concentración de aproximadamente un 0,0001 a aproximadamente un 10 por ciento en peso. En algunos ejemplos alternativos, se podrán utilizar otras concentraciones, según determine el formulador, en función de sus necesidades.

Tabla 15-1: Composiciones detergentes en pastilla								
Compuesto	**Fórmulas**							
	I	**II**	**III**	**IV**	**V**	**VI**	**VII**	**VIII**
STPP	-	48,8	44,7	38,2	-	42,4	46,1	46,0
Citrato de 3Na 2H2O	20,0	-	-	-	35,9	-	-	-
Carbonato de Na	20,0	5,0	14,0	15,4	8,0	23,0	20,0	-
Silicato	15,0	14,8	15,0	12,6	23,4	2,9	4,3	4,2
Lipasa	0,001	-	0,01	-	0,02	-	-	-
Proteasa B (opcional)	0,01	-	-	-	-	-	-	-
Proteasa C (opcional)	-	-	-	-	-	0,01	-	-
nprE (opcional)	0,01	0,08	-	0,04	-	0,023	-	0,05
PMN	-	-	0,05	-	0,052	-	0,023	-
Amilasa	0,012	0,012	0,012	-	0,015	-	0,017	0,002
Pectina liasa	0,005	-	-	0,002	-	-	-	-
Aldosa oxidasa	-	0,03	-	0,02	0,02	-	0,03	-
PB1	-	-	3,8	-	7,8	-	-	4,5
Percarbonato	6,0	-	-	6,0	-	5,0	-	-
BB1	0,2	-	0,5	-	0,3	0,2	-	-
BB2	-	0,2	-	0,5	-	-	0,1	0,2
No iónico	1,5	2,0	2,0	2,2	1,0	4,2	4,0	6,5
PAAC	0,01	0,01	0,02	-	-	-	-	-
DETBCHD	-	-	-	0,02	0,02	-	-	-
TAED	-	-	-	-	-	2,1	-	1,6
HEDP	1,0	-	-	0,9	-	0,4	0,2	-
DETPMP	0,7	-	-	-	-	-	-	-
Parafina	0,4	0,5	0,5	0,5	-	-	0,5	-
BTA	0,2	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	-
Policarboxilato	4,0	-	-	-	4,9	0,6	0,8	-
PEG 400 - 30 000	-	-	-	-	-	2,0	-	2,0
Glicerol	-	-	-	-	-	0,4	-	0,5
Perfume	-	-	-	0,05	0,2	0,2	0,2	0,2
Resto hasta el 100 % Humedad y/o Componentes secundarios *								
*Abrillantador / SRP1 / carboximetilcelulosa de Na/ fotoblanqueador / $MgSO_4$ / PVPVI/ supresor de espuma /PEG de alto peso molecular/arcilla. El pH de los Ejemplos 15(1) a 15(VII) es de aproximadamente 10 a aproximadamente 11.5; el pH de 15(VIII) es de 8-10. El peso de la pastilla en los Ejemplos 15(1) a 15(VIII) es de aproximadamente 20 gramos a								

Tabla 15-1: Composiciones detergentes en pastilla								
Compuesto	**Fórmulas**							
	I	**II**	**III**	**IV**	**V**	**VI**	**VII**	**VIII**
aproximadamente 30 gramos.								

EJEMPLO 16

Composiciones detergentes líquidas para ropa

[0323] En este Ejemplo, se dan a conocer diversas fórmulas para composiciones detergentes líquidas para ropa. Las siguientes composiciones detergentes líquidas para ropa se preparan según se muestra a continuación. En cada una de estas fórmulas, se incluye al menos una variante de proteasa expuesta en el presente documento en una concentración de aproximadamente un 0,0001 a aproximadamente un 10 por ciento en peso. En algunos ejemplos alternativos, se podrán utilizar otras concentraciones, según determine el formulador, en función de sus necesidades.

Tabla 16-1: Composiciones detergentes líquidas para ropa					
Compuesto	**Fórmulas**				
	I	**II**	**III**	**IV**	**V**
LAS	24,0	32,0	6,0	3,0	6,0
NaC_{16}-C_{17}HSAS	-	-	-	5,0	-
C_{12}-$C_{15}AE_{1.8}S$	-	-	8,0	7,0	5,0
Propil dimetilamina C_8-C_{10}	2,0	2,0	2,0	2,0	1,0
Óxido de alquil-dimetil-amina C_{12}-C_{14}	-	-	-	-	2,0
C_{12}-C_{15} AS	-	-	17,0	-	8,0
CFAA	-	5,0	4,0	4,0	3,0
Etoxilado de alcohol graso C_{12}-C_{14}	12,0	6,0	1,0	1,0	1,0
Ácido graso C_{12}-C_{18}	3,0	-	4,0	2,0	3,0
Ácido cítrico (anhidro)	4,5	5,0	3,0	2,0	1,0
DETPMP	-	-	1,0	1,0	0,5
Monoetanolamina	5,0	5,0	5,0	5,0	2,0
Hidróxido de sodio	-	-	2,5	1,0	1,5
1 N de solución acuosa de HCl	#1	#1	-	-	-
Propanodiol	12,7	14,5	13,1	10,0	8,0
Etanol	1,8	2,4	4,7	5,4	1,0
DTPA	0,5	0,4	0,3	0,4	0,5
Pectina liasa	-	-	-	0,005	-
Amilasa	0,001	0,002	-		-
Celulasa	-	-	0,0002		0,0001
Lipasa	0,1	-	0,1	-	0,1
NprE (opcional)	0,05	0,3	-	0,5	0,2
PMN	-	-	0,08	-	-
Proteasa A (opcional)	-	-	-	-	0,1
Aldosa oxidasa	-	-	0,3	-	0,003
ZnCl2	0,1	0,05	0,05	0,05	0,02
Formiato de Ca	0,05	0,07	0,05	0,06	0,07
DETBCHD	-	-	0,02	0,01	-

Tabla 16-1: Composiciones detergentes líquidas para ropa					
Compuesto	**Fórmulas**				
SRP1	0,5	0,5	-	0,3	0,3
Ácido bórico	-	-	-	-	2,4
Xilen sulfonato de sodio	-	-	3,0	-	-
Cumen sulfonato de sodio	-	-	-	0,3	0,5
DC 3225C	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
2-butil-octanol	0,03	0,04	0,04	0,03	0,03
Abrillantador 1	0,12	0,10	0,18	0,08	0,10
Resto hasta el 100 % perfume / tinte y/o agua					
#1: Añadir 1 N de solución acuosa de HCl para ajustar el pH sin diluir de la fórmula en el intervalo de aprox. 3 a aprox. 5. El pH de los Ejemplos anteriores 16(I)-(II) es de aprox. 5 a aprox. 7, y el de los 16(III)-(V) es de aprox. 7.5 a aprox. 8.5.					

Tabla 16-2: Detergentes líquidos para ropa						
Compuesto	**Fórmulas**					
	I	**II**	**III**	**IV**	**V**	**VI**
LAS	11,5	11,5	9,0	-	4,0	-
C_{12}-$C_{15}AE_{2.85}S$	-	-	3,0	18,0	-	16,0
C_{14}-$C_{15}E_{2.5}$ S	11,5	11,5	3,0	-	16,0	-
C_{12}-$C_{13}E_9$	-	-	3,0	2,0	2,0	1,0
C_{12}-$C_{13}E_7$	3,2	3,2	-	-	-	-
CFAA	-	-	-	5,0	-	3,0
TPKFA	2,0	2,0	-	2,0	0,5	2,0
Ácido cítrico (anhidro)	3,2	3,2	0,5	1,2	2,0	1,2
Formiato de Ca	0,1	0,1	0,06	0,1	-	-
Formiato de Na	0,5	0,5	0,06	0,1	0,05	0,05
ZnCl2	0,1	0,05	0,06	0,03	0,05	0,05
Cumen sulfonato de Na	4,0	4,0	1,0	3,0	1,2	-
Borato	0,6	0,6	1,5	-	-	-
Hidróxido de Na	6,0	6,0	2,0	3,5	4,0	3,0
Etanol	2,0	2,0	1,0	4,0	4,0	3,0
1,2 Propanodiol	3,0	3,0	2,0	8,0	8,0	5,0
Monoetanolamina	3,0	3,0	1,5	1,0	2,5	1,0
TEPAE	2,0	2,0	-	1,0	1,0	1,0
nprE (opcional)	0,03	0,05	-	0,03	-	0,02
PMN	-	-	0,01	-	0,08	-
Proteasa A (opcional)	-	-	0,01	-	-	-
Lipasa	-	-	-	0,002	-	-
Amilasa	-	-	-	-	0,002	-
Celulasa	-	-	-	-	-	0,0001

Tabla 16-2: Detergentes líquidos para ropa						
Compuesto	**Fórmulas**					
Pectina liasa	0,005	0,005	-		-	-
Aldosa oxidasa	0,05	-	-	0,05	-	0,02
Galactosa oxidasa	-	0,04				
PAAC	0,03	0,03	0,02	-	-	-
DETBCHD	-	-	-	0,02	0,01	-
SRP 1	0,2	0,2	-	0,1	-	-
DTPA	-	-	-	0,3	-	-
PVNO	-	-	-	0,3	-	0,2
Abrillantador 1	0,2	0,2	0,07	0,1	-	-
Antiespumante de silicona	0,04	0,04	0,02	0,1	0,1	0,1
Resto hasta el 100 % perfume / tinte y/o agua						

EJEMPLO 17

Composiciones detergentes líquidas para lavado de vajilla a mano

[0324] En este Ejemplo, se dan a conocer diversas fórmulas de detergentes líquidos para lavado de vajilla a mano. A continuación, se exponen las siguientes composiciones detergentes líquidas para lavavajillas a mano. En cada una de estas fórmulas, se incluye al menos una variante de proteasa expuesta en el presente documento en una concentración de aproximadamente un 0,0001 a aproximadamente un 10 por ciento en peso. En algunos ejemplos alternativos, se podrán utilizar otras concentraciones, según determine el formulador, en función de sus necesidades.

Tabla 17-1: Composiciones detergentes líquidas para lavado de vajilla a mano						
Compuesto	**Fórmulas**					
	I	**II**	**III**	**IV**	**V**	**VI**
C_{12}-$C_{15}AE_{1.8}S$	30,0	28,0	25,0	-	15,0	10,0
LAS	-	-	-	5,0	15,0	12,0
Sulfonato de parafina	-	-	-	20,0	-	-
Óxido de alquil-dimetil-amina C_{10}-C_{18}	5,0	3,0	7,0	-	-	-
Betaína	3,0	-	1,0	3,0	1,0	-
Amida de ácido graso poli-OH C_{12}	-	-	-	3,0	-	1,0
Amida de ácido graso poli-OH C_{14}	-	1,5	-	-	-	-
$C_{11}E_9$	2,0	-	4,0	-	-	20,0
DTPA	-	-	-	-	0,2	-
Citrato de trisodio dihidratado	0,25	-	-	0,7	-	-
Diamina	1,0	5,0	7,0	1,0	5,0	7,0
$MgCl_2$	0,25	-	-	1,0	-	-
nprE (opcional)	0,02	0,01	-	0,01	-	0,05
PMN	-	-	0,03	-	0,02	-
Proteasa A (opcional)	-	0,01	-	-	-	-
Amilasa	0,001	-	-	0,002	-	0,001
Aldosa oxidasa	0,03	-	0,02	-	0,05	-
Cumen sulfonato de sodio	-	-	-	2,0	1,5	3,0

PAAC	0,01	0,01	0,02	-	-	-
DETBCHD	-	-	-	0,01	0,02	0,01
Resto hasta el 100 % perfume / tinte y/o agua						
El pH de los Ejemplos 17(I)-(VI) es de aproximadamente 8 a aproximadamente 11.						

EJEMPLO 18

Composiciones detergentes líquidas para lavavajillas automático

[0325] En este Ejemplo, se dan a conocer diversas fórmulas de detergentes líquidos para lavavajillas automático. A continuación, se exponen las siguientes composiciones detergentes líquidas para lavavajillas a mano. En cada una de estas fórmulas, se incluye al menos una variante de proteasa expuesta en el presente documento en una concentración de aproximadamente un 0,0001 a aproximadamente un 10 por ciento en peso. En algunos ejemplos alternativos, se podrán utilizar otras concentraciones, según determine el formulador, en función de sus necesidades.

Tabla 18-1: Composiciones detergentes líquidas para lavavajillas automático					
Compuesto	**Fórmulas**				
	I	**II**	**III**	**IV**	**V**
STPP	16	16	18	16	16
Sulfato de potasio	-	10	8	-	10
1,2 propanodiol	6,0	0,5	2,0	6,0	0,5
Ácido bórico	-	-	-	4,0	3,0
$CaCl_2$ dihidratado	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
No iónico	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
nprE (opcional)	0,1	0,03	-	0,03	-
PMN	-	-	0,05	-	0,06
Proteasa B (opcional)	-	-	-	0,01	-
Amilasa	0,02	-	0,02	0,02	-
Aldosa oxidasa	-	0,15	0,02	-	0,01
Galactosa oxidasa	-	-	0,01	-	0,01
PAAC	0,01	-	-	0,01	-
DETBCHD	-	0,01	-	-	0,01
Resto hasta el 100 % perfume / tinte y/o agua					

EJEMPLO 19

Detergentes lavavajillas de alta densidad

[0326] Este Ejemplo da a conocer diversas fórmulas para detergentes lavavajillas de alta densidad. A continuación, se exponen los siguientes detergentes lavavajillas compactos de alta densidad. En cada una de estas fórmulas, se incluye al menos una variante de proteasa expuesta en el presente documento en una concentración de aproximadamente un 0,0001 a aproximadamente un 10 por ciento en peso. En algunos ejemplos alternativos, se podrán utilizar otras concentraciones, según determine el formulador, en función de sus necesidades.

Tabla 19-1: Detergentes lavavajillas de alta densidad						
Compuesto	**Fórmulas**					
	I	**II**	**III**	**IV**	**V**	**VI**
STPP	-	45,0	45,0	-	-	40,0
Citrato de 3Na $2H_2O$	17,0	-	-	50,0	40,2	-
Carbonato de Na	17,5	14,0	20,0	-	8,0	33,6

Tabla 19-1: Detergentes lavavajillas de alta densidad						
Compuesto	**Fórmulas**					
	I	**II**	**III**	**IV**	**V**	**VI**
Bicarbonato	-	-	-	26,0	-	-
Silicato	15,0	15,0	8,0	-	25,0	3,6
Metasilicato	2,5	4,5	4,5	-	-	-
PB1	-	-	4,5	-	-	-
PB4	-	-	-	5,0	-	-
Percarbonato	-	-	-	-	-	4,8
BB1	-	0,1	0,1	-	0,5	-
BB2	0,2	0,05	-	0,1	-	0,6
No iónico	2,0	1,5	1,5	3,0	1,9	5,9
HEDP	1,0	-	-	-	-	-
DETPMP	0,6	-	-	-	-	-
PAAC	0,03	0,05	0,02	-	-	-
Parafina	0,5	0,4	0,4	0,6	-	-
nprE (opcional)	0,072	0,053	-	0,026	-	0,01
PMN	-	-	0,053	-	0,059	-
Proteasa B (opcional)	-	-	-	-	-	0,01
Amilasa	0,012	-	0,012	-	0,021	0,006
Lipasa	-	0,001	-	0,005	-	-
Pectina liasa	0,001	0,001	0,001	-	-	-
Aldosa oxidasa	0,05	0,05	0,03	0,01	0,02	0,01
BTA	0,3	0,2	0,2	0,3	0,3	0,3
Policarboxilato	6,0	-	-	-	4,0	0,9
Perfume	0,2	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2
Resto hasta el 100 % Humedad y/o Componentes secundarios *						
*Abrillantador / tinte / SRP1 / carboximetilcelulosa de Na/ fotoblanqueador / MgSO4 / PVPVI/ supresor de espuma /PEG molecular alto/arcilla. El pH de los Ejemplos 19(1) a (VI) es de aproximadamente 9.6 a aproximadamente 11.3.						

EJEMPLO 20

Detergentes líquidos para limpieza de superficies duras

[0327] Este Ejemplo da a conocer diversas fórmulas de detergentes líquidos para limpieza de superficies duras. A continuación, se exponen las siguientes composiciones detergentes líquidas para limpieza de superficies duras. En cada una de estas fórmulas, se incluye al menos una variante de proteasa expuesta en el presente documento en una concentración de aproximadamente un 0,0001 a aproximadamente un 10 por ciento en peso. En algunos ejemplos alternativos, se podrán utilizar otras concentraciones, según determine el formulador, en función de sus necesidades.

Tabla 20-1: Detergentes líquidos para limpieza de superficies duras							
Compuesto	**Fórmulas**						
	I	**II**	**III**	**IV**	**V**	**VI**	**VII**
C_9-$C_{11}E_5$	2,4	1,9	2,5	2,5	2,5	2,4	2,5
C_{12}-$C_{14}E_5$	3,6	2,9	2,5	2,5	2,5	3,6	2,5

Tabla 20-1: Detergentes líquidos para limpieza de superficies duras							
Compuesto	**Fórmulas**						
	I	**II**	**III**	**IV**	**V**	**VI**	**VII**
C_7-C_9E_6	-	-	-	-	8,0	-	-
C_{12}-$C_{14}E_{21}$	1,0	0,8	4,0	2,0	2,0	1,0	2,0
LAS	-	-	-	0,8	0,8	-	0,8
Cumen sulfonato de sodio	1,5	2,6	-	1,5	1,5	1,5	1,5
Isachem ® AS	0,6	0,6	-	-	-	0,6	-
Na_2CO_3	0,6	0,13	0,6	0,1	0,2	0,6	0,2
Citrato de 3Na $2H_2O$	0,5	0,56	0,5	0,6	0,75	0,5	0,75
NaOH	0,3	0,33	0,3	0,3	0,5	0,3	0,5
Ácido graso	0,6	0,13	0,6	0,1	0,4	0,6	0,4
2-butil octanol	0,3	0,3	-	0,3	0,3	0,3	0,3
PEG DME-2000®	0,4	-	0,3	0,35	0,5	-	-
PVP	0,3	0,4	0,6	0,3	0,5	-	-
MME PEG (2000) ®	-	-	-	-	-	0,5	0,5
Jeffamine ® ED-2001	-	0,4	-	-	0,5	-	-
PAAC	-	-	-	0,03	0,03	0,03	-
DETBCHD	0,03	0,05	0,05	-	-	-	-
nprE (opcional)	0,07	-	0,08	0,03	-	0,01	0,04
PMN	-	0,05	-	-	0,06	-	-
Proteasa B (opcional)	-	-	-	-	-	0,01	-
Amilasa	0,12	0,01	0,01	-	0,02	-	0,01
Lipasa	-	0,001	-	0,005	-	0,005	-
Pectina liasa	0,001	-	0,001	-	-	-	0,002
ZnCl2	0,02	0,01	0,03	0,05	0,1	0,05	0,02
Formiato de calcio	0,03	0,03	0,01	-	-	-	-
PB1	-	4,6	-	3,8	-	-	-
Aldosa oxidasa	0,05	-	0,03	-	0,02	0,02	0,05
Resto hasta el 100 % perfume / tinte y/o agua							
El pH de los Ejemplos 20(1) a (VII) es de aproximadamente 7.4 a aproximadamente 9.5							

EJEMPLO 21

Pruebas de rendimiento de lavavajillas automático

[0328] En este Ejemplo, se describen métodos utilizados para determinar el rendimiento de lavado de variantes de proteasa empleando algunos detergentes lavavajillas comercializados. Estas variantes de proteasa se evalúan en diversas condiciones. Estos detergentes los comercializa WFK y se hace referencia a los mismos por medio de las designaciones indicadas más adelante. Los protocolos para cada uno de los tipos de manchas (carne picada, yema de huevo, y yema de huevo con leche) se exponen a continuación. Antes de poder aplicar cada uno de los tipos de manchas en los platos del ensayo, los platos se deben lavar minuciosamente. Este hecho resulta especialmente necesario, puesto que pueden encontrarse todavía residuos de ciertas manchas persistentes en los platos procedentes de ensayos previos. Los platos nuevos también se sometieron a tres lavados a fondo antes de utilizarlos por primera vez en una prueba.

[0329] Las pruebas de lavado se llevan a cabo normalmente en un lavavajillas automático (p. ej., Miele: G690SC), provisto de platos manchados y láminas de acero inoxidable, según se ha descrito anteriormente. Se utiliza una cantidad determinada del detergente, según lo indicado en las tablas de resultados que se incluyen

más adelante. En algunos experimentos, las temperaturas analizadas son 45 °C, 55 °C y 65 °C. En algunos experimentos, la dureza del agua es de 9° o de 21° GH (dureza alemana) (374 ppm de Ca).

[0330] Conforme a lo indicado anteriormente, los platos manchados con carne picada o pasta/salsa/carne/queso se examinan visualmente utilizando una escala de valoración de imagen de 0 a 10, donde “0” indica un plato completamente sucio y “10” indica un plato limpio. Estos valores se corresponden con la capacidad de eliminación de manchas o suciedad (SR) del detergente que contiene enzimas.

[0331] Los platos de acero inoxidable lavados que estén manchados con yema de huevo y/o yema de huevo y leche se analizan gravimétricamente para determinar la cantidad de mancha residual presente tras el lavado.

[0332] A continuación, se exponen algunos ejemplos de detergentes.

Tabla 21-1: Detergente sin fosfato IEC-60436 WFK Tipo B (pH = 10.4 en 3 g/l)	
Componente	**% en peso**
Citrato de sodio dihidratado	30,0
Sal sódica de copolímero de ácido maleico/ácido acrílico (SOKALAN® CP5; BASF)	12,0
Perborato de sodio monohidrato	5,0
TAED	2,0
Disilicato de sodio: Protil A (Cognis)	25,0
Alcohol graso etoxilado lineal	2,0
Carbonato de sodio anhidro	Añadir hasta 100

Tabla 21-2: Detergente con fosfato: IEC-60436 WFK Tipo C (pH = 10.5 en 3 g/l)	
Componente	**% en peso**
Tripolifosfato de sodio	23,0
Citrato de sodio dihidratado	22,3
Sal sódica de copolímero de ácido maleico/ácido acrílico	4,0
Perborato de sodio monohidrato	6,0
TAED	2,0
Disilicato de sodio: Protil A (Cognis)	5,0
Alcohol graso etoxilado lineal	2,0
Carbonato de sodio anhidro	Añadir hasta 100

REIVINDICACIONES

1. Variante de subtilisina aislada, donde dicha variante de subtilisina es una forma madura que presenta actividad proteolítica y comprende una secuencia de aminoácidos comprendiendo una combinación de sustituciones de aminoácidos seleccionadas de entre: G020R-N043R-A230E, G020R-N043R-A230E-S242R, G020R-N043RE271L, G020R-N043R-H249R, G020R-N043R-H249R-E271L, G020R-N043R-N076D, G020R-N043R-N076D-A230E-H249R, G020R-N043R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, , G020R-N043R-N269R, G020R-N043R-R045T-A230E, , G020R-N043R-R045T-S101A-N269R, G020R-N043R-R045T-S242R, G020R-N043R-S101A-N116A-T213A-A215F, G020R-N043R-S101A-N269R, G020R-N043R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, , G020R-N043R-S212F, G020R-N043R-S212F-W241R, G020R-N043R-S242R, G020R-N043R-S242R-E271L, G020R-N043R-V244R, G020R-N043R-W241R, G020R-S024R-N043R-N076D, G020R-S024R-N043R-R045T, G020R-S024R-N043R-R045T-A215F, G020R-S024R-N043R-R045T-H249R, G020R-S024R-N043R-R045T-N076D-S242R-H249R, G020R-S024R-N043R-R045T-N116A, G020R-S024R-N043R-R045T-N116A-T213A, G020R-S024R-N043R-R045T-N116A-T213A-A215F, G020R-S024R-N043R-R045T-S101A-N269R, G020R-S024R-N043R-R045T-S101A-T213A,, G020R-S024R-N043R-S242R, G020R-S024R-T38I-N043R-R045T-N076D-S242R-H249R, G020R-T022R-N043R, G020R-T022R-N043R-S212F, G020R-T022R-N043R-W241R, G020R-T038A-N043R-S101A, N018R-G020R-N043R, N018R-G020R-N043R-N076D, N018R-G020R-N043R-N076D-A230E-S242R, N018R-G020R-N043R-N076D-H249R, N018R-G020R-N043R-N076D-S242R-H249R, N018R-G020R-N043R-R045T-N076D-H249R, N018R-G020R-N043R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-G020R-N043R-R045T-S242R, N018R-G020R-S024R-N043R-N076D-H249R, N018R-G020R-S024R-N043R-R045T-N076D-A230E, N018R-G020R-S024R-N043R-R045T-N076D-H249R, P014L-G020R-S024R-N043R-R045T-S101A-A215F, S009A-G020R-N043R-S212F, S009A-G020R-N043R-W241R, S009A-G020R-S024R-N043R, V004R-G020R-N043R, V004R-G020R-S024R-N043R, V004R-G020R-S024R-N043R-S242R, V004R-S009A-G020R-N043R y V004R-S009A-G020R-N043R-S242R, donde la carga neta total de la variante es 0, +1, +2, +3, +4, +5, -1, -2, -3, -4, o -5 en relación con la carga neta total de la proteasa subtilisina GG36 de *Bacillus lentus*, y donde la carga neta total se obtiene mediante una o más sustituciones seleccionada(s) de entre: R45T, N62E, N76D, S101D, P129E, A158E, G159D, G159E, S166D, S188D, A230E, N18R, T22R, S24R, G118R, Q245R, H249R, N269R, E271F y E271L, donde la variante es una variante de una proteasa parental proteasa subtilisina GG36 de *Bacillus lentus* comprendiendo la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID N.º 2, donde dicha variante presenta al menos un 90 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 2, y donde las posiciones de aminoácidos de la variante de proteasa se numeran conforme a la numeración de posiciones de aminoácidos correspondientes en la secuencia de aminoácidos de subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens* que se muestra en la SEQ ID N.º 1.

2. Variante de proteasa según la reivindicación 1, donde la variante de proteasa presenta una o más de las siguientes características: a) un índice de rendimiento del Método de Ensayo 2 de al menos 1,1, al menos 1,2, al menos 1,3, al menos 1,4, al menos 1,5, al menos 1,6, al menos 1,7, al menos 1,8, al menos 1,9, al menos 2, desde 1,1 hasta aproximadamente 10, desde 1,1 hasta aproximadamente 8, o incluso desde 1,1 hasta aproximadamente 5; b) un índice de rendimiento del Método de Ensayo 3 de al menos 1,1, al menos 1,2, al menos 1,3, al menos 1,4, al menos 1,5, al menos 1,6, al menos 1,7, al menos 1,8, al menos 1,9, al menos 2, desde 1,1 hasta aproximadamente 10, desde 1,1 hasta aproximadamente 8, o incluso desde 1,1 hasta aproximadamente 5; c) un índice de rendimiento del Método de Ensayo 4 de al menos 1,0, al menos 1,1, al menos 1,2, al menos 1,3, al menos 1,4, al menos 1,5, al menos 1,6, al menos 1,7, al menos 1,8, al menos 1,9, al menos 2, desde 1,0 hasta aproximadamente 10, desde 1,0 hasta aproximadamente 8, o incluso desde 1,0 hasta aproximadamente 5; y/o d) un índice de rendimiento del Método de Ensayo 6 de al menos 1,0, al menos 1,1, al menos 1,2, al menos 1,3, al menos 1,4, al menos 1,5, al menos 1,6, al menos 1,7, al menos 1,8, al menos 1,9, al menos 2, desde 1,0 hasta aproximadamente 10, desde 1,0 hasta aproximadamente 8, o incluso desde 1,0 hasta aproximadamente 5.

3. Ácido nucleico aislado comprendiendo una secuencia de polinucleótidos que codifica la variante de subtilisina expuesta en la reivindicación 1 o 2.

4. Vector de expresión comprendiendo el ácido nucleico de la reivindicación 3, y opcionalmente ligado de forma operativa a un promotor.

5. Célula hospedadora comprendiendo el vector de expresión de la reivindicación 4.

6. Método para producir al menos una variante de subtilisina de una subtilisina de *Bacillus*, comprendiendo:

a) transformar una célula hospedadora con un vector de expresión comprendiendo al menos un ácido nucleico que codifica al menos una variante de subtilisina de la reivindicación 1 para producir una célula hospedadora transformada, donde dicha célula hospedadora es opcionalmente una especie de *Bacillus*; y
b) cultivar la célula hospedadora transformada en condiciones adecuadas para la producción de al menos una variante de subtilisina, con el fin de producir al menos una variante de subtilisina, y comprendiendo además opcionalmente la extracción de la variante de subtilisina producida.

7. Composición comprendiendo al menos una variante de subtilisina según la reivindicación 1, donde dicha composición no es un producto de limpieza del hogar ni de tejidos, donde la composición es opcionalmente una composición de limpieza que presenta una composición granulada, en polvo, sólida, en barra, líquida, en pastilla, en gel, o en pasta, y donde la composición comprenda además opcionalmente al menos un agente blanqueador o una enzima adicional seleccionada de entre hemicelulasas, celulasas, peroxidasas, proteasas, metaloproteasas, xilanasas, lipasas, fosfolipasas, esterasas, perhidrolasas, cutinasas, pectinasas, pectato liasas, mananasas, queratinasas, reductasas, oxidasas, fenoloxidasas, lipoxigenasas, ligninasas, pululanasas, tanasas, pentosanasas, malanasas, β-glucanasas, arabinosidasas, hialuronidasas, condroitinasas, lacasas, y amilasas, o cualquier combinación de estas.

8. Método de limpieza, comprendiendo poner en contacto una superficie o un artículo con una composición de limpieza comprendiendo al menos una variante de subtilisina según la reivindicación 1 o la composición de limpieza según la reivindicación 7.

FIG. 1

```
BPN'   1     AQSVPYGVSQ IKAPALHSQG YTGSNVKVAV IDSGIDSSHP DLKVAGGASM VPSETNPFQD
GG36   1     AQSVPWGISR VQAPAAHNRG LTGSGVKVAV LDTGIS-THP DLNIRGGASF VPGEPST-QD

BPN'  61 NNSHGTHVAG TVAALNNSIG VLGVAPSASL YAVKVLGADG SGQYSWIING IEWAIANNMD
GG36  59 GNGHGTHVAG TIAALNNSIG VLGVAPSAEL YAVKVLGASG SGSVSSIAQG LEWAGNNGMH

BPN'  121 VINMSLGGPS GSAALKAAVD KAVASGVVVV AAAGNEGTSG SSSTVGYPGK YPSVIAVGAV
GG36  119 VANLSLGSPS PSATLEQAVN SATSRGVLVV AASGNSGAGS ----ISYPAR YANAMAVGAT

BPN'  181 DSSNQRASFS SVGPELDVMA PGVSIQSTLP GNKYGAYNGT SMASPHVAGA AALILSKHPN
GG36  175 DQNNNRASFS QYGAGLDIVA PGVNVQSTYP GSTYASLNGT SMATPHVAGA AALVKQKNPS

BPN'  241 WTNTQVRSSL ENTTTKLGDS FYYGKGLINV QAAAQ
GG36  235 WSNVQIRNHL KNTATSLGST NLYGSGLVNA EAATR
```

FIG. 2

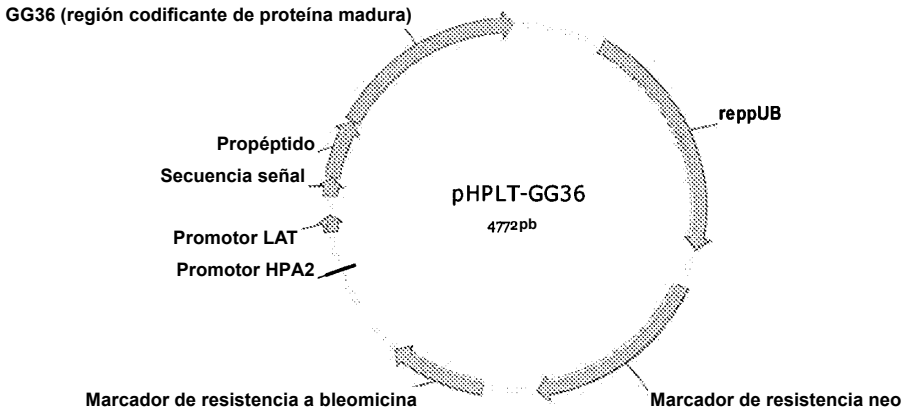

GG36 (región codificante de proteína madura)
reppUB
Propéptido
Secuencia señal
pHPLT-GG36
4772pb
Promotor LAT
Promotor HPA2
Marcador de resistencia a bleomicina
Marcador de resistencia neo

FIG 3.

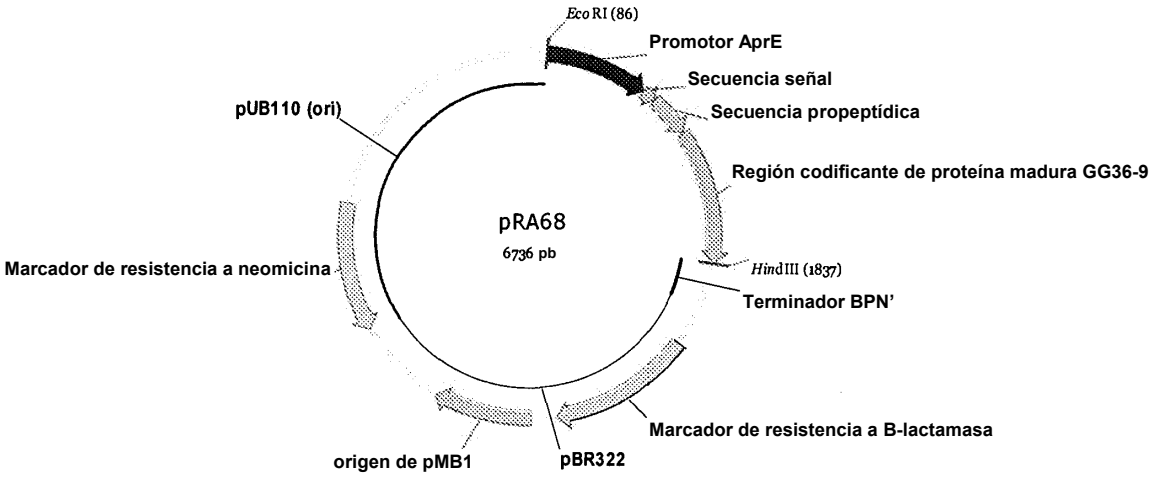
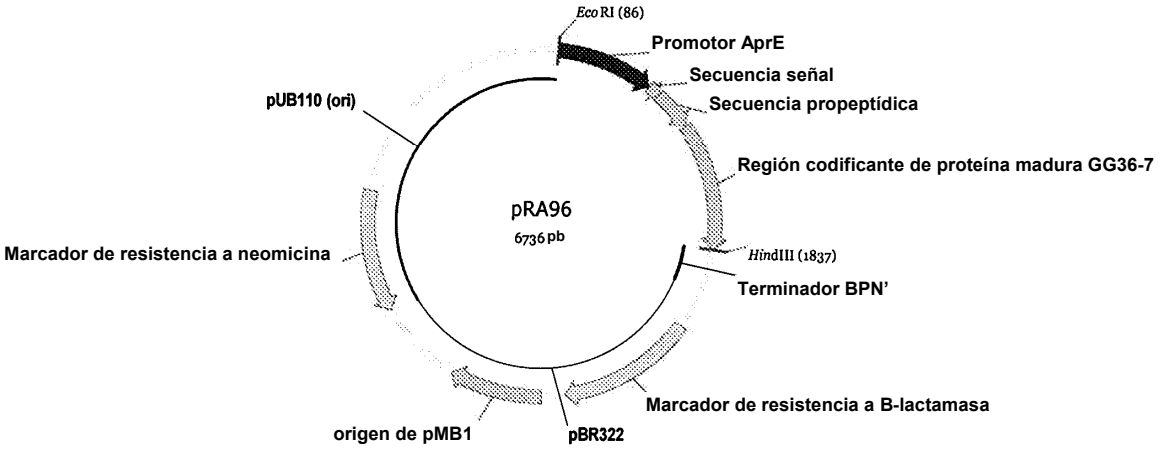

Eco RI (86)
Promotor AprE
Secuencia señal
Secuencia propeptídica
Región codificante de proteína madura GG36-9
pUB110 (ori)
pRA68
6736 pb
Hind III (1837)
Terminador BPN'
Marcador de resistencia a neomicina
Marcador de resistencia a B-lactamasa
origen de pMB1
pBR322

FIG. 4


EcoRI (86)
Promotor AprE
Secuencia señal
Secuencia propeptídica
Región codificante de proteína madura GG36-7
pUB110 (ori)
pRA96
6736 pb
Marcador de resistencia a neomicina
HindIII (1837)
Terminador BPN'
Marcador de resistencia a B-lactamasa
origen de pMB1
pBR322