(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 723 948**

(51) Int. CI.:

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

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.12.2014 PCT/US2014/070097**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **18.06.2015 WO15089441**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.12.2014 E 14825213 (3)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.02.2019 EP 3080262**

(54) Título: **Serina proteasas procedentes de especies de Bacillus**

(30) Prioridad:

13.12.2013 US 201361915745 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.09.2019

(73) Titular/es:

DANISCO US INC. (100.0%)
925 Page Mill Road
Palo Alto, California 94304, US

(72) Inventor/es:

KOLKMAN, MARC;
MEJLDAL, RIE;
KELLETT-SMITH, ANJA HEMMINGSEN;
BABE, LILIA MARIA y
BOTT, RICHARD R.

(74) Agente/Representante:

RIZZO , Sergio

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

DESCRIPCIÓN

Serina proteasas procedentes de especies de Bacillus

CAMPO

[0001] La presente exposición se refiere a serina proteasas clonadas a partir de *Bacillus* spp., y a variantes de las mismas. Las composiciones que contienen las serina proteasas resultan adecuadas para su uso en la limpieza de tejidos y superficies duras, así como en varias aplicaciones industriales.

ANTECEDENTES

[0002] Las serina proteasas son enzimas (EC n.º 3.4.21) que poseen una serina de sitio activo que inicia la hidrólisis de enlaces peptídicos de proteínas. Existen dos categorías amplias de serina proteasas en función de su estructura: de tipo quimotripsina (de tipo tripsina) y de tipo subtilisina. La subtilisina prototípica (EC n.º 3.4.21.62) se obtuvo inicialmente a partir de *Bacillus subtilis*. Las subtilisinas y sus homólogos son miembros de la familia de la peptidasa S8 del esquema de clasificación MEROPS. Los miembros de la familia S8 poseen una tríada catalítica del orden de Asp, His y Ser en su secuencia de aminoácidos.

[0003] Aunque las serina proteasas se han conocido durante mucho tiempo en la técnica de las enzimas industriales, siguen resultando necesarias otras serina proteasas que sean adecuadas para usos y condiciones concretos.

[0004] En el documento WO 09/054185 se describe una proteasa alcalina novedosa del tipo subtilisina de *Bacillus gibsonii* (DSM 14391), así como proteínas relacionadas y derivados de las mismas. El documento WO 03/055974 se refiere a una proteasa alcalina novedosa del tipo subtilisina de *Bacillus* sp. (DSM 14392) y a diversas proteínas y derivados relacionados de la misma.

Sumario

[0005] Las presentes composiciones y métodos se refieren a serina proteasas recombinantes clonadas de *Bacillus* spp., y variantes de las mismas, siempre y cuando dichos métodos y composiciones sean como los definidos en las reivindicaciones. Las composiciones que contienen las serina proteasas resultan adecuadas para su uso en la limpieza de tejidos y superficies duras, así como en varias aplicaciones industriales, y se definen en las reivindicaciones.

[0006] En un primer aspecto, la invención es un polipéptido recombinante de una subtilisina del clado *B. akibai/clarkii*, o un fragmento activo del mismo, donde el polipéptido recombinante o el fragmento activo de este posee actividad proteolítica y comprende una secuencia de aminoácidos que presenta al menos un 72 % de identidad con una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º 11, 14, 17, 32, 35, 38, 41 u 84 o al menos un 70 % de identidad con una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º 3, 6, 20, 23, 26 o 29, y comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º 42, 43, 44, 45, 46, 47 o 48.

[0007] En algunas formas de realización, al menos uno de los polipéptidos recombinantes anteriores posee actividad de proteasa, en concreto de hidrólisis de caseína. En algunas formas de realización, al menos uno de los polipéptidos recombinantes anteriores conserva al menos el 50 % de su actividad máxima de proteasa en el rango de pH de 8 a 12. En algunas formas de realización, al menos uno de los polipéptidos recombinantes anteriores conserva al menos el 50 % de su actividad de proteasa máxima en un rango de temperatura de 50 °C a 75 °C. En algunas formas de realización, al menos uno de los polipéptidos recombinantes anteriores posee actividad de limpieza en una composición detergente, incluyendo un detergente para lavavajillas automático y un detergente para ropa.

[0008] En algunas formas de realización, la invención es una composición que comprende un tensioactivo y al menos uno de los polipéptidos recombinantes indicados anteriormente. En algunas formas de realización, el tensioactivo se selecciona del grupo que consiste en un tensioactivo no iónico, un tensioactivo aniónico, un tensioactivo catiónico, un tensioactivo zwitteriónico, un tensioactivo anfolítico, un tensioactivo semipolar no iónico, y una combinación de estos. En algunas formas de realización, la composición es una composición detergente, tal como un detergente para ropa, un suavizante para ropa, un detergente para lavavajillas, y un detergente para la limpieza de superficies duras. En algunas formas de realización, la composición comprende, además, al menos un ion de calcio y/o un ion de zinc, al menos un estabilizador, al menos un agente blanqueador, fosfato o borato. En algunas formas de realización, la composición no contiene fosfato ni borato. En algunas formas de realización, la composición es una composición granulada, en polvo, sólida, en barra, líquida, en pastillas, en gel, en pasta o monodosis. En algunas formas de realización, la composición comprende, además, una o varias enzimas adicionales o derivados enzimáticos seleccionados del grupo que consiste en aciltransferasas, alfa-amilasas, beta-amilasas, alfa-galactosidasas, arabinosidasas, arilesterasas, beta-galactosidasas, carragenasas, catalasas, celobiohidrolasas, celulasas, condroitinasas, cutinasas, endo-beta-1, 4-glucanasas, endo-beta-mananasas, esterasas, exomananasas, galactanasas, glucoamilasas, hemicelulasas, hialuronidasas, queratinasas, lacasas, lactasas, ligninasas, lipasas, lipoxigenasas, mananasas, oxidasas, pectato liasas, pectina acetilesterasas, pectinasas, pentosanasas, peroxidasas, fenoloxidasas, fosfatasas, fosfolipasas,

fitasas, poligalacturonasas, proteasas, pululanasas, reductasas, ramnogalacturonasas, beta-glucanasas, tanasas, transglutaminasas, xilano acetilesterasas, xilanasas, xiloglucanasas, xilosidasas, metaloproteasas, serina proteasas adicionales, y combinaciones de estas.

[0009] En algunas formas de realización, la invención es un método de limpieza que comprende poner en contacto una superficie o un artículo con una composición listada anteriormente. En algunas formas de realización, la invención es un método para producir un polipéptido recombinante que comprende transformar de manera estable una célula huésped con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica al menos uno de los polipéptidos recombinantes expuestos anteriormente.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0010]

La figura 1 expone un mapa de plásmido de pHYT-BspAI02518 para la expresión de la serina proteasa BspAI02518.

La figura 2 expone un mapa de plásmido de pBN-BspU02193 para la expresión de la serina proteasa BspU02193.

La figura 3 muestra un gráfico de la actividad de proteasa de BspAI02518 en un sustrato DMC.

La figura 4 muestra un gráfico de la actividad de proteasa de BspU02193 en un sustrato DMC.

La figura 5A representa curvas de eficiencia de limpieza de BspAI02518 en detergentes para ropa líquidos concentrados (HDL). La figura 5B representa curvas de eficiencia de limpieza de BspAI02518 en detergentes para ropa secos concentrados (HDD). La figura 5C representa curvas de eficiencia de limpieza de BspAI02518 en detergentes para lavavajillas automáticos (ADW).

La figura 6A representa curvas de eficiencia de limpieza de BspU02193 en detergentes para ropa secos concentrados (HDD). La figura 6B representa curvas de eficiencia de limpieza de BspU02193 en detergentes para lavavajillas automáticos (ADW).

Las figuras 7A-F exponen un alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las formas maduras de BspAI02518 (SEQ ID n.º 3) y BspU02193 (SEQ ID n.º 6) con las secuencias de aminoácidos de diversas serina proteasas bacterianas (SEQ ID n.ºs 49-79). Se muestra una secuencia de consenso bajo el alineamiento (SEQ ID n.º 81).

La figura 8 muestra un árbol filogenético de BspAI02518, BspU02193 y varias serina proteasas bacterianas.

Las figuras 9A-C exponen un alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las formas maduras de BspAI02518 (SEQ ID n.º 3), BspU02193 (SEQ ID n.º 6), Bakn00315 (SEQ ID n.º 11), Bcl04009 (SEQ ID n.º 14) y SWT66_254731 (SEQ ID n.º 17) con las secuencias de muchas otras serina proteasas bacterianas. Las secuencias de aminoácidos de subtilisinas de *B. pseudofirmus* (SEQ ID n.º 49), *B. lentus* (SEQ ID n.º 600), *LG12* de *Bacillus* sp. (SEQ ID n.º 62), *B. licheniformis* (SEQ ID n.º 67) y *B. amyloliquefaciens* (SEQ ID n.º 73) corresponden a los números de acceso al NCBI (Centro Nacional para la Información Biotecnológica de EE. UU.) ADC49870, P29600, AAC43580, CAJ70731 y CAA24990.

La figura 10 muestra un árbol filogenético de BspAI02518, BspU02193, Bakn00315, Bcl04009, SWT66_254731 y muchas otras serina proteasas bacterianas.

La figura 11A representa curvas de eficiencia de limpieza de SWT66_254731 en el detergente para ropa líquido concentrado (HDL) de OMO. La figura 11B representa curvas de eficiencia de limpieza de SWT66_254731 en el detergente para ropa seco concentrado (HDD) de OMO. La figura 11C representa curvas de eficiencia de limpieza de SWT66_254731 en el detergente para lavavajillas automático (ADW) de Quantum con pH 9, utilizando muestras no enjuagadas. La figura 11D representa curvas de eficiencia de limpieza de SWT66_254731 en el detergente para lavavajillas automáticos (ADW) de Quantum con pH 9, utilizando muestras enjuagadas. La figura 11E representa curvas de eficiencia de limpieza de SWT66_254731 en el detergente para lavavajillas automático (ADW) de GSMB con pH 10, utilizando muestras no enjuagadas. La figura 11F representa curvas de eficiencia de limpieza de SWT66_254731 en el detergente para lavavajillas automático (ADW) de GSMB con pH 10, utilizando muestras enjuagadas.

Las figuras 12A-C exponen un alineamiento de 18 secuencias de aminoácidos correspondientes a las formas maduras de: BspAI02518 (SEQ ID n.º 3), BspU02193 (SEQ ID n.º 6), Bakn00315 (SEQ ID n.º 11), Bcl04009 (SEQ ID n.º 14), SWT66_254731 (SEQ ID n.º 17), ACB102 (SEQ ID n.º 20), COG104 (SEQ ID n.º 23), ACB83 (SEQ ID n.º 26), ACB90 (SEQ ID n.º 29), ACB82 (SEQ ID n.º 32), ACB89 (SEQ ID n.º 35), ACB92 (SEQ ID n.º 38), DETPh35 (SEQ ID n.º 41), y las formas maduras de subtilisinas procedentes de *B. amyloliquefaciens, B. lentus, B. licheniformis, Bacillus* sp. LG12 y *B. pseudofirmus* (n.^{os} de acceso al NCBI CAA24990, P29600, CAJ70731, AAC43580 y ADC49870, respectivamente).

La figura 13 da a conocer un árbol filogenético de BspAI02518, BspU02193, Bakn00315, Bcl04009, SWT66_254731, ACB102, COG104, ACB83, ACB90, ACB82, ACB89, ACB92, DETPh35 y muchas otras

serina proteasas bacterianas con un corchete que indica las secuencias que abarcan las subtilisinas del clado *B. akibai*/*clarkii*.

Las figuras 14A-C ofrecen un alineamiento de secuencias basado en la estructura de BspAI02518, BspU02193, Bakn00315, Bcl04009, SWT66_254731, ACB102, COG104, ACB83, ACB90, ACB82, ACB89, ACB92 y DETPh35 (es decir, subtilisinas del clado *B. akibai*/*clarkii*) con la subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* (entrada del pdb (banco de datos de proteínas) 2STI), Carlsberg de *B. licheniformis* (entrada pdb 3UNX), la subtilisina de *B. lentus* (entrada pdb 1JEA) y la estructura propia de la subtilisina LG12. Se subraya la tríada de sitio activo Asp32, H62 y S215 y N153 que contribuye al agujero oxianión (numeación BspAI02518) de las subtisilinas de *Bacillus*. También se subraya una región del alineamiento basado en la estructura, en la cual las secuencias de subtilisinas del clado *B. akibai*/*clarkii* presentan un motivo común de Val (V)91 a Gly (G)99 o Ser (S)99.

La figura 15 muestra la ubicación esperada del motivo DRN en el pliegue de la cadena principal de las subtilisinas del clado *B. akibai*/*clarkii* inspiradas en la estructura de la subtilisina de *B. lentus* (entrada pdb 1JEA) con respecto a la tríada catalítica. Las cadenas laterales residuales de la tríada catalítica que son comunes para todas las serina proteasas aparecen coloreadas en negro.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0011] Se describen composiciones y métodos que se refieren a serina proteasas recombinantes procedentes de cepas del clado *B. akibai*/*clarkii* de C-M2-3, GICC 2089392, ATCC n.º 43226, DSM 8720, ACB102_2847966, COG104_4065768, ACB83_2687815, ACB90_2720294, ACB82_2683104, ACB89_2715301, ACB92_2732966 y DETPh35_2828044. Las composiciones y métodos se basan, en parte, en que se ha observado que BspAI02518 recombinante y BspU02193 poseen actividad de proteasa en presencia de un tensioactivo, en condiciones de reacción básicas, y a temperaturas elevadas. Estas características de BspAI02518 y BspU02193, que se prevé que sean compartidas por Bakn00315, Bcl04009, SWT66_254731, ACB102, COG104, ACB83, ACB90, ACB82, ACB89, ACB92 y DETPh35, provocan que estas proteasas sean muy adecuadas para su uso en la limpieza de tejidos y de superficies duras, así como en el procesamiento de textiles, cuero y plumaje. Como consecuencia, al menos BspAI02518 y BspU02193, así como Bakn00315, Bcl04009, SWT66_254731, ACB102, COG104, ACB83, ACB90, ACB82, ACB89, ACB92 y DETPh35, resultan muy adecuadas para su incorporación en composiciones para la degradación de proteínas, incluyendo, aunque sin carácter limitativo, detergentes para ropa y para lavavajillas. BspAI02518 y BspU02193, así como Bakn00315, Bcl04009, SWT66_254731, ACB102, COG104, ACB83, ACB90, ACB82, ACB89, ACB92 y DETPh35, resultan también adecuadas para su incorporación en composiciones de cuidado personal, así como en aplicaciones de alimentación humana y pienso para animales.

I. Definiciones

[0012] Antes de describir las presentes composiciones y métodos con más detalle, se definen los siguientes términos para mayor claridad. A los términos y abreviaturas no definidos se les debería otorgar su significado utilizado habitualmente en la técnica. A menos que se definan de otro modo en el presente documento, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente un experto en la materia. A no ser que se indique de otro modo, la práctica de la presente descripción implica técnicas convencionales utilizadas frecuentemente en biología molecular, ingeniería de proteínas y microbiología. Aunque cualquiera de los métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente texto se utilizan en la práctica de la presente descripción, algunos métodos y materiales adecuados se describen en el presente documento. Los términos definidos inmediatamente después se describen con más detalle en referencia a la memoria en su conjunto.

[0013] En el sentido en que se usan en la presente memoria, los términos singulares «un», «una», «el» y «la» incluyen el plural a no ser que el contexto indique claramente lo contrario. A no ser que se indique de otro modo, las secuencias de ácidos nucleicos se escriben de izquierda a derecha en una orientación de 5' a 3'; las secuencias de aminoácidos se escriben de izquierda a derecha en una orientación de amino a carboxi. Ha de entenderse que la presente exposición no se limita a la metodología, los protocolos y los reactivos concretos descritos en el presente documento, a no ser que se indique lo contrario.

[0014] Se pretende que todo límite numérico máximo dado a lo largo de esta memoria incluya todo límite numérico inferior, como si dichos límites numéricos inferiores estuvieran escritos expresamente en el presente documento. Todo límite numérico mínimo dado a lo largo de esta memoria incluirá todo límite numérico superior, como si dichos límites numéricos superiores estuvieran escritos expresamente en el presente documento. Todo intervalo numérico dado a lo largo de esta memoria incluirá todo intervalo numérico más reducido que se encuentre dentro de dicho intervalo numérico más amplio, como si dichos intervalos numéricos más reducidos estuvieran escritos expresamente en el presente documento.

[0015] Según se utiliza en el presente documento, en conexión con un valor numérico, el término «aproximadamente» se refiere a un rango de +/- 0,5 del valor numérico, a menos que el término se defina específicamente de otro modo en el contexto. Por ejemplo, la frase un «valor de pH de aproximadamente 6» se refiere a valores de pH desde 5,5 a 6,5, a menos que el valor de pH se defina específicamente de otra forma.

[0016] Tal como se utiliza en el presente documento, los términos «proteasa» y «proteinasa» hacen referencia a una enzima que posee la capacidad de descomponer proteínas y péptidos. Una proteasa posee la capacidad de llevar a cabo la «proteólisis» mediante la hidrólisis de enlaces peptídicos que unen aminoácidos entre sí en una cadena peptídica o polipeptídica que forma la proteína. Esta actividad de una proteasa como una enzima capaz de digerir proteínas se denomina «actividad proteolítica». Existen muchos procedimientos ampliamente conocidos para medir la actividad proteolítica. Por ejemplo, la actividad proteolítica se puede determinar mediante ensayos comparativos que analizan la capacidad que presenta la proteasa respectiva para hidrolizar un sustrato adecuado. Entre los ejemplos de sustratos útiles para el análisis de actividad de proteasa o proteolítica se incluye, aunque sin carácter limitativo, la 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 resultan conocidos en la técnica (véase, p. ej., el documento WO 99/34011y el documento de patente estadounidense n.º 6,376,450). El ensayo del peptidilo pNA (véase, p. ej., Del Mar *et al.*, Anal Biochem, 99:316-320, 1979) se puede utilizar también para determinar la concentración de enzima activa. Este ensayo mide el ritmo al que se libera la p-nitroanilina conforme la enzima hidroliza un sustrato sintético soluble, tal como succinil-alanina-alanina-prolina-fenilalanina-p-nitroanilida (suc-AAPF-pNA). El ritmo de producción del 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 emplear para determinar la concentración total de proteínas en una muestra de proteína purificada. La actividad en la concentración de sustrato/proteína determina la actividad específica de la enzima.

[0017] El término «variante», con respecto a un polipéptido, se refiere a un polipéptido que difiere de un polipéptido específico natural, original o de referencia en cuanto a que este incluye una o varias sustituciones, inserciones o deleciones de origen natural o artificial de un aminoácido. Del mismo modo, el término «variante», con respecto a un polinucleótido, se refiere a un polinucleótido que difiere en cuanto a la secuencia de nucleótidos de un polinucleótido específico natural, original o de referencia. La identidad del polipéptido o polinucleótido natural, original o de referencia resultará evidente a partir del contexto.

[0018] Tal como se utiliza en el presente documento, «el género *Bacillus*» incluye todas las especies incluidas dentro del género «*Bacillus*», tal como las conocen los expertos en la materia, incluyendo, aunque sin carácter limitativo, *B. subtilis, B. licheniformis, B. lentus, B. brevis, B. stearothermophilus, B. alkalophilus, B. amyloliquefaciens, B. clausii, B. halodurans, B. megaterium, B. coagulans, B. circulans, B. lautus, B. gibsonii, B. agaradhaerens, B akibai, B. clarkii* y *B. thuringiensis.* Se reconoce que el género *Bacillus* sigue estando sometido a reorganización taxonómica. Así, se pretende que el género incluya especies que hayan sido reclasificadas, incluyendo, aunque sin carácter limitativo, organismos tales como *B. stearothermophilus,* actualmente denominado «*Geobacillus stearothermophilus*». La producción de endosporas resistentes en condiciones ambientales estresantes se considera el rasgo definitorio del género *Bacillus*, aunque esta característica también se aplica a los recientemente nombrados *Alicyclobacillus, Amphibacillus, Aneurinibacillus, Anoxybacillus, Brevibacillus, Filobacillus, Gracilibacillus, Halobacillus, Paenibacillus, Salibacillus, Thermobacillus, Ureibacillus* y *Virgibacillus*.

[0019] Los términos «polinucleótido» y «ácido nucleico», que se utilizan indistintamente en el presente documento, se refieren a un polímero de cualquier longitud de monómeros nucleotídicos unidos de manera 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 poseen distintas funciones biológicas. Entre los polinucleótidos o los ácidos nucleicos se incluye, aunque sin carácter limitativo, ADN monocatenario, bicatenario o tricateniario, ADN genómico, ADNc, ARN, híbrido de ADN-ARN, o un polímero que comprenda bases de purina y pirimidina, u otras bases nucleotídicas naturales, modificadas químicamente o bioquímicamente, no naturales o derivadas. A continuación, se presentan 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.

[0020] Tal como se utiliza en el presente documento, el término «mutación» hace referencia a los cambios realizados en una secuencia de aminoácidos o de ácidos nucleicos de referencia. Se pretende que el término abarque las sustituciones, inserciones y deleciones.

[0021] Tal como se utiliza en el presente documento, el término «vector» se refiere a un constructo de ácido nucleico utilizado para introducir o transferir ácido(s) nucleico(s) a un tejido o célula diana. Normalmente, se utiliza un vector para introducir ADN foráneo en una célula o tejido. Los vectores incluyen plásmidos, vectores de clonación, bacteriófagos, virus (p. ej., vector viral), cósmidos, vectores de expresión, vectores transportadores, y similares. Un vector incluye normalmente un origen de replicación, un sitio de clonación múltiple y un marcador de selección. El proceso de inserción de un vector en una célula diana se denomina normalmente transformación. La presente invención incluye, en una forma de realización, un vector que comprende una secuencia de ADN que codifica un polipéptido de serina proteasa (p. ej., un polipéptido de serina proteasa precursor o maduro) que se encuentra ligado de forma operativa a una prosecuencia adecuada (p. ej., secretora,

secuencia de péptido señal, etc.) capaz de efectuar la expresión de la secuencia de ADN en un huésped adecuado y el plegamiento y la translocación de la cadena polipeptídica recombinante.

[0022] Tal como se utiliza en el presente documento, los términos «casete de expresión», «plásmido de expresión» o «vector de expresión» se refieren a un vector o constructo de ácido nucleico generado de forma recombinante o sintética para la expresión de un ácido nucleico de interés en una célula diana. Un vector de expresión o casete de expresión comprende normalmente una secuencia nucleotídica promotora que dirige la expresión del ácido nucleico foráneo. El vector o casete de expresión también incluye normalmente cualquier otro elemento de ácido nucleico específico 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. Muchos vectores de expresión procariotas y eucariotas se encuentran disponibles comercialmente.

[0023] Tal como se utiliza en el presente documento, un «plásmido» se refiere a una molécula de ADN extracromosómico que es capaz de replicarse con independencia del ADN cromosómico. Un plásmido es bicatenario (ds) y puede ser circular, y se utiliza normalmente como un vector de clonación.

[0024] Tal como se utiliza en el presente documento en el contexto de la introducción de una secuencia de ácidos nucleicos en una célula, el término «introducido» se refiere a cualquier método adecuado para transferir la secuencia de ácidos nucleicos en la célula. Dichos métodos de introducción incluyen, aunque sin carácter limitativo, la fusión de protoplastos, transfección, transformación, electroporación, conjugación y transducción. La transformación hace referencia a la alteración genética de una célula que resulta de la captación, la incorporación genómica opcional y la expresión de material genético (p. ej., ADN).

[0025] Tal como se entiende en el presente documento, un ácido nucleico está «ligado de forma operativa» a otra secuencia de ácidos nucleicos cuando se coloca en una relación funcional con otra secuencia de ácidos nucleicos. 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 del ribosoma puede encontrarse ligado de forma operativa a una secuencia codificante si se coloca para facilitar 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. La unión se consigue mediante ligadura en sitios de restricción convenientes. Si no existen dichos sitios, se pueden utilizar adaptadores o conectores oligonucleotídicos sintéticos según la práctica convencional.

[0026] Tal como se utiliza en el presente documento, el término «gen» se refiere a un polinucleótido (p. ej., un segmento de ADN) que codifica un polipéptido e incluye regiones anteriores y posteriores a las regiones codificantes. En algunos casos, un gen incluye secuencias de intervención (intrones) entre segmentos codificantes individuales (exones).

[0027] Tal como se utiliza en el presente documento, el término «recombinante», al utilizarse en referencia a una célula, indica normalmente que la célula se ha modificado mediante la introducción de una secuencia de ácidos nucleicos foránea o que la célula se deriva de una célula modificada de esta manera. Por ejemplo, una célula recombinante puede comprender un gen que no se encuentre de forma 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), que haya sido modificado y reintroducido en la célula. Una célula recombinante puede comprender un ácido nucleico endógeno a la célula que haya sido modificado sin extraer el ácido nucleico de la célula; dichas modificaciones incluyen las obtenidas mediante sustitución genética, mutación de sitio específico 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 donde pueda expresarse o propagarse, produciendo así un polipéptido recombinante. «Recombinar» y la «recombinación» de polinucleótidos o ácidos nucleicos hacen referencia, por lo general, al ensamblaje o a la combinación de dos o más hebras o fragmentos de ácidos nucleicos o polinucleótidos para generar un nuevo polinucleótido o ácido nucleico.

[0028] Se dice que un ácido nucleico o polinucleótido «codifica» un polipéptido si, en su estado nativo o al manipularse mediante métodos conocidos por los expertos en la materia, se puede transcribir y/o traducir para producir el polipéptido o un fragmento del mismo. También se dice que la hebra antisentido de dicho ácido nucleico codifica la secuencia.

[0029] Los términos «cepa huésped» o «célula huésped» se refieren a un huésped adecuado para un vector de expresión que comprende una secuencia de ADN de interés.

[0030] 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 exposición, se utiliza el código de una y tres letras para los aminoácidos, tal como se define de acuerdo con la comisión conjunta de nomenclatura bioquímica (JBCN, por sus siglas en inglés) de la IUPAC-IUB. La letra X sola hace referencia a cualquiera de los veinte aminoácidos. Se comprenderá también que se puede codificar un polipéptido mediante más de una secuencia de nucleótidos debido a la degeneración del código genético. Las mutaciones se pueden denominar mediante el código de una letra para el aminoácido original, seguido por un

número de posición y, a continuación, el código de una letra para la variante de aminoácido. Por ejemplo, la mutación de glicina (G) en la posición 87 a serina (S) se representa como «G087S» o «G87S». Al describir modificaciones, una posición seguida por aminoácidos listados entre paréntesis indica una lista de sustituciones en esa posición por cualquiera de los aminoácidos listados. Por ejemplo, 6(L,I) significa que la posición 6 se puede sustituir por una leucina o isoleucina. En ocasiones, en una secuencia, se utiliza una barra (/) para definir sustituciones, p. ej., F/V, e indica que la posición concreta puede presentar una fenilalanina o valina en esa posición.

[0031] Una «prosecuencia» o «secuencia propeptídica» se refiere a una secuencia de aminoácidos entre la secuencia del péptido señal y la secuencia de la proteasa madura que resulta necesaria para el plegamiento adecuado y la secreción de la proteasa; en ocasiones, se les denomina chaperonas intramoleculares. La escisión de la prosecuencia o secuencia propeptídica da lugar a una proteasa activa madura. Las serina proteasas bacterianas se expresan a menudo como proenzimas.

[0032] Los términos «secuencia señal» y «péptido señal» se refieren a una secuencia de residuos de aminoácidos que puede participar en la secreción o el transporte directo de la forma madura o precursora de una proteína. La secuencia señal se sitúa normalmente en el extremo N-terminal con respecto a la secuencia de la proteína precursora o madura. La secuencia señal puede ser endógena o exógena. Normalmente, una secuencia señal está ausente de la proteína madura. Normalmente, una secuencia señal se escinde de la proteína mediante una peptidasa señal después de que la proteína se haya transportado.

[0033] El término forma «madura» de una proteína, polipéptido o péptido se refiere a la forma funcional de la proteína, el polipéptido o el péptido sin la secuencia de péptido señal ni la secuencia propeptídica.

[0034] El término forma «precursora» 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 de la proteína. El precursor también puede tener una secuencia «señal» ligada de forma operativa al extremo amino terminal de la prosecuencia. El precursor también puede presentar polipéptidos adicionales implicados en la actividad posterior a la traducción (p. ej., polipéptidos escindidos de esta para dejar la forma madura de una proteína o péptido).

[0035] El término «natural», en referencia a una secuencia de aminoácidos o a una secuencia de ácidos nucleicos, indica que la secuencia de aminoácidos o la secuencia de ácidos nucleicos 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 cosa (p. ej., secuencias de ácidos nucleicos, proteínas o aminoácidos) que se halla en la naturaleza. Por el contrario, el término «de origen no natural» se refiere a cualquier cosa que no se halle en la naturaleza (p. ej., ácidos nucleicos recombinantes y secuencias de proteínas producidas en el laboratorio o modificación de la secuencia natural).

[0036] Tal como se utiliza en el presente documento con respecto a las posiciones de residuos de aminoácidos, los términos «correspondiente(s) a», «corresponde(n) a» y «se corresponde(n) con» se refieren a un residuo de aminoácidos en la posición enumerada en una proteína o un péptido, o un residuo de aminoácidos que sea análogo, homólogo o equivalente a un residuo enumerado en una proteína o péptido. Según se utiliza en el presente documento, «región correspondiente» se refiere en general a una posición análoga a lo largo de proteínas relacionadas o una proteína de referencia.

[0037] Los términos «derivado/a(s) de» y «obtenido/a(s) de» no solo se refieren a una proteína producida o que puede ser producida por una cepa del organismo en cuestión, sino también a una proteína codificada por una secuencia de ADN aislada de dicha cepa y producida en un organismo huésped que contenga dicha secuencia de ADN. Asimismo, el término se refiere a una proteína codificada por una secuencia de ADN de origen sintético y/o de ADNc y que posee las características identificativas de la proteína en cuestión. A modo de ejemplo, las «proteasas derivadas de *Bacillus*» hacen referencia a aquellas enzimas que presenten actividad proteolítica producidas de manera natural por *Bacillus*, así como a serina proteasas, como aquellas producidas por fuentes de *Bacillus*, pero que, por medio del uso de técnicas de ingeniería genética, son producidas por otras células huésped transformadas con un ácido nucleico que codifica las serina proteasas.

[0038] El término «idéntico», en el contexto de dos secuencias polinucleotídicas o polipeptídicas, se refiere a los residuos que son iguales en las dos secuencias cuando se alinean para una correspondencia máxima, medidos utilizando algoritmos de análisis o comparación de secuencias.

[0039] Según se utiliza en el presente documento, el «% de identidad», «porcentaje de identidad» o «PID» se refiere a la identidad de secuencias. El porcentaje de identidad se puede determinar utilizando técnicas convencionales conocidas en la técnica. Entre los algoritmos útiles se incluyen los algoritmos BLAST (*véanse,* Altschul *et al.*, J Mol Biol, 215:403-410, 1990; y Karlin y Altschul, Proc Natl Acad Sci USA, 90:5873-5787, 1993). El programa BLAST utiliza diversos parámetros de búsqueda, la mayoría de los cuales se establece como los valores por defecto. El algoritmo BLAST NCBI encuentra las secuencias más relevantes en términos de similitud biológica, pero no se recomienda para secuencias problema con menos de 20 residuos (Altschul *et al.*, Nucleic Acids Res, 25:3389-3402, 1997; y Schaffer *et al.*, Nucleic Acids Res, 29:2994-3005, 2001). Entre los ejemplos de parámetros BLAST por defecto para una búsqueda de secuencia de ácido nucleico se incluyen: Umbral de palabras cercanas = 11; Valor e de corte = 10; Matriz de puntuación = NUC.3.1 (coincidencia = 1,

incompatibilidad = -3); Apertura de hueco = 5; y Extensión de hueco = 2. Entre los ejemplos de parámetros BLAST por defecto para búsquedas de secuencias de ácidos nucleicos se incluyen: Tamaño de palabra = 3; Valor e de corte = 10; Matriz de puntuación = BLOSUM62; Apertura de hueco = 11; y Extensión de hueco = 1. Se determina un valor porcentual (%) de identidad de secuencia de aminoácidos mediante el número de residuos idénticos coincidentes dividido por el número total de residuos de la secuencia «de referencia», incluyendo cualquier hueco creado por el programa para un alineamiento óptimo/máximo. Los algoritmos BLAST se refieren a la secuencia «de referencia» como la secuencia «problema».

[0040] Tal como se utiliza en el presente documento, las «proteínas homólogas» o «proteasas homólogas» hacen referencia a las proteínas que presentan distinta similitud en su estructura primaria, secundaria y/o terciaria. La homología de proteínas se puede referir a la similitud en la secuencia de aminoácidos lineal cuando se alinean las proteínas. La búsqueda homóloga de secuencias de proteínas se puede llevar a cabo empleando BLASTP y PSI-BLAST de NCBI BLAST con el umbral (valor e de corte) en 0,001. (Altschul SF, Madde TL, Shaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. Gapped BLAST and PSI BLAST a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res 1997 Set 1;25(17):3389-402). Mediante el uso de esta información, se pueden agrupar secuencias de proteínas. Se puede construir un árbol filogenético utilizando las secuencias de aminoácidos. Las secuencias de aminoácidos se pueden introducir en un programa tal como el conjunto de programas Vector NTI Advance, y se puede crear un árbol guía utilizando el método de unión de vecinos (*neighbor joining*, NJ) (Saitou y Nei, Mol Biol Evol, 4:406-425, 1987). La construcción del árbol se puede calcular utilizando la corrección de Kimura para la distancia entre secuencias e ignorando las posiciones con huecos. Un programa como AlignX puede mostrar los valores calculados de distancia entre paréntesis tras el nombre de la molécula mostrado en el árbol filogenético.

[0041] El hecho de comprender la homología entre moléculas puede revelar la historia evolutiva de las moléculas, así como información acerca de su función; si una proteína secuenciada recientemente es homóloga a una proteína ya caracterizada, este hecho indica claramente la función bioquímica de la nueva proteína. La relación más elemental entre dos entidades es la homología; se dice que dos moléculas son homólogas si se han derivado de un ancestro común. Las moléculas homólogas, u homólogos, se pueden dividir en dos clases: parálogos y ortólogos. Los parálogos son homólogos presentes en una especie. Los parálogos difieren a menudo en sus funciones bioquímicas precisas. Los ortólogos son homólogos presentes en distintas especies y que poseen funciones idénticas o muy similares. Una superfamilia de proteínas es la agrupación (clado) más grande de proteínas para la cual se puede inferir una ascendencia común. Normalmente, esta ascendencia común se basa en el alineamiento de secuencias y en la similitud mecánica. Las superfamilias contienen normalmente varias familias de proteínas que muestran similitud de secuencias dentro de la familia. El término «clan de proteínas» se utiliza habitualmente para las superfamilias de proteasas basadas en el sistema de clasificación de proteasas MEROPS.

[0042] El algoritmo CLUSTAL W es otro ejemplo de un algoritmo de alineamiento de secuencias (véase, Thompson *et al.*, Nucleic Acids Res, 22:4673-4680, 1994). Los parámetros por defecto del algoritmo CLUSTAL W incluyen: Penalización por apertura de hueco = 10,0; Penalización por extensión de hueco = 0,05; Matriz de peso de proteínas = serie BLOSUM; Matriz de peso de ADN = IUB; % de secuencias divergentes de retraso = 40; Distancia de separación de hueco = 8; Peso de transiciones de ADN = 0,50; Listar residuos hidrofílicos = GPSNDQEKR; Usar matriz negativa = OFF; Alternar penalizaciones específicas por residuo = ON; Alternar penalizaciones hidrofílicas = ON; y Alternar penalización por separación de hueco = OFF. En los algoritmos de CLUSTAL, se incluyen deleciones que ocurren en cualquier terminal. Por ejemplo, una variante con una deleción de cinco aminoácidos en cualquier terminal (o en el polipéptido) de un polipéptido de 500 aminoácidos presentaría un porcentaje de identidad de secuencia del 99 % (495/500 residuos idénticos × 100) en relación con el polipéptido «de referencia». Dicha variante estaría abarcada por una variante que presenta «al menos un 99 % de identidad de secuencia» con el polipéptido.

[0043] Un ácido nucleico o polinucleótido está «aislado» cuando está al menos parcialmente o completamente separado de otros componentes, incluyendo, aunque sin carácter limitativo, otras proteínas, ácidos nucleicos, células, etc. Del mismo modo, un polipéptido, proteína o péptido está «aislado» cuando está al menos parcialmente o completamente separado de otros componentes, incluyendo, por ejemplo, aunque sin carácter limitativo, otras proteínas, ácidos nucleicos, células, etc. Desde el punto de vista de la molaridad, una especie aislada es más abundante que otras especies en una composición. Por ejemplo, una especie aislada puede comprender al menos aproximadamente un 60 %, aproximadamente un 65%, aproximadamente un 70 %, 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 % o aproximadamente un 100 % (desde el punto de vista de la molaridad) de todas las especies macromoleculares presentes. Preferiblemente, la especie de interés se purifica a su homogeneidad esencial (es decir, las especies contaminantes no pueden detectarse en la composición mediante métodos de detección convencionales). La pureza y la homogeneidad se pueden determinar utilizando un número de técnicas ampliamente conocidas en el ámbito de especialización, como la electroforesis en gel de agarosa o de poliacrilamida de una muestra de ácido nucleico o proteína, respectivamente, seguida de la visualización tras la

tinción. Si se desea, puede utilizarse una técnica de alta resolución, como cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés), o un medio similar, para la purificación del material.

[0044] El término «purificado(s)», aplicado a ácidos nucleicos o polipéptidos, denota por lo general un ácido nucleico o polipéptido que, fundamentalmente, está libre de otros componentes según lo determinado por técnicas analíticas conocidas en el ámbito de especialización (p. ej., un polipéptido o polinucleótido purificado forma una banda discreta en un gel de electroforesis, un eluato cromatográfico y/o un medio sometido a centrifugación en gradiente de densidad). Por ejemplo, un ácido nucleico o polipéptido que da lugar fundamentalmente a una banda en un gel de electroforesis está «purificado». Un ácido nucleico o polipéptido purificado es al menos aproximadamente un 50 % puro, normalmente al menos aproximadamente un 60 %, aproximadamente un 65 %, aproximadamente un 70%, 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 desde el punto de vista de la molaridad). En un sentido relacionado, una composición está enriquecida para una molécula cuando hay un incremento considerable en la concentración de la molécula después de aplicar una técnica de purificación o enriquecimiento. El término «enriquecido/a» se refiere a un compuesto, polipéptido, célula, ácido nucleico, aminoácido o a otro material o componente determinado que esté presente en una composición en una concentración relativa o absoluta que sea mayor que la de una composición inicial.

[0045] Según se utiliza en el presente documento, el término «ensayo funcional» se refiere a un ensayo que proporciona un indicio de la actividad de una proteína. En algunas formas de realización, el término se refiere a sistemas de ensayo en los que se analiza la capacidad de una proteína para funcionar en su rendimiento habitual. Por ejemplo, en el caso de una proteasa, un ensayo funcional implica determinar la efectividad de la proteasa para hidrolizar un sustrato proteínico.

[0046] El término «actividad de limpieza» se refiere a una eficacia de limpieza obtenida por un polipéptido de serina proteasa o proteasa de referencia en condiciones imperantes durante el proceso proteolítico, de hidrolización, de limpieza u otro proceso de la descripción. En algunas formas de realización, la eficacia de limpieza de un polipéptido de serina proteasa o proteasa de referencia se puede determinar utilizando diversos ensayos para limpiar una o varias manchas diversas sensibles a enzimas en un artículo o superficie (p. ej., una mancha de comida, hierba, sangre, tinta, leche, aceite y/o proteína de huevo). La eficacia de limpieza de una variante de proteasa o proteasa de referencia puede determinarse sometiendo la mancha del artículo o la superficie a condiciones de lavado estándar y evaluando la medida en la que se elimina la mancha utilizando varias metodologías cromatográficas, espectrofotométricas u otras metodologías cuantitativas. En la técnica se conocen ejemplos de métodos y ensayos de limpieza, e incluyen, aunque sin carácter limitativo, los descritos en el documento WO 99/34011 y en el documento de patente estadounidense 6,605,458, así como los métodos y ensayos de limpieza incluidos en los Ejemplos proporcionados más adelante.

[0047] El término «cantidad de limpieza efectiva» de un polipéptido de serina 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 las determina fácilmente 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 si se necesita una composición líquida o seca (por ejemplo, granulada, en pastilla, en barra), etc.

[0048] El término «material de limpieza adjunto» se refiere a cualquier material líquido, sólido o gaseoso incluido en la composición de limpieza que no sea un polipéptido de serina proteasa de la descripción. En algunas formas de realización, las composiciones de limpieza de la presente descripción incluyen uno o más materiales de limpieza adjuntos. Cada material de limpieza adjunto se selecciona normalmente dependiendo del tipo y la forma concretos de la composición de limpieza (p. ej., composición líquida, granulada, en polvo, en barra, en pasta, en espray, en pastilla, en gel, en espuma u otra composición). Preferiblemente, cada material de limpieza adjunto es compatible con la enzima de proteasa utilizada en la composición.

[0049] Las composiciones de limpieza y las formulaciones de limpieza incluyen cualquier composición que resulte adecuada para limpiar, blanquear, desinfectar y/o esterilizar cualquier objeto, artículo y/o superficie. Dichas composiciones y formulaciones incluyen, a modo de ejemplo y sin carácter limitativo, composiciones líquidas y/o sólidas, incluyendo composiciones de limpieza o detergentes (p. ej., composiciones detergentes para tejidos delicados y composiciones detergentes o de limpieza para ropa líquidas, en pastilla, en gel, en barra, granuladas y/o sólidas; composiciones y formulaciones de limpieza de superficies duras, tales como encimeras y ventanas de vidrio, madera, cerámica y metal; limpiadores de alfombras; limpiadores para hornos; ambientadores para tejidos; suavizantes para tejidos; y composiciones detergentes o de limpieza potenciadoras para la ropa y textiles, composiciones de limpieza aditivas para la ropa, y composiciones de limpieza de pretratado para la ropa; composiciones lavavajillas, incluyendo composiciones para el lavado de la vajilla de forma manual o a mano (p. ej., detergentes para lavavajillas «manuales» o «a mano») y composiciones de lavavajillas automático (p. ej.,

«detergentes para lavavajillas automáticos»). Se pueden utilizar también formatos unitarios monodosis en la presente invención, incluyendo, aunque sin carácter limitativo, comprimidos, pastillas, cápsulas de gel, u otras unidades monodosis, tales como polvos o líquidos premedidos.

[0050] Las composiciones de limpieza o formulaciones de limpieza incluyen, tal como se utilizan en el presente documento y a menos que se indique otra cosa, agentes de lavado potentes o multiusos en polvo o granulados, especialmente detergentes de limpieza; agentes de lavado multiusos en formato líquido, granulado, en gel, sólido, en pastilla, en pasta o monodosis, en concreto los tipos denominados detergentes líquidos potentes (HDL, por sus siglas en inglés) o detergentes secos potentes (HDD, por sus siglas en inglés); detergentes líquidos para tejidos delicados; agentes para lavavajillas manual o a mano, incluyendo los de tipo muy espumoso; agentes de lavado a mano o manuales, de lavavajillas automático o para el lavado de artículos de vajilla o artículos de mesa, incluyendo los diversos tipos en pastilla, en polvo, sólidos, granulados, líquidos, en gel o de enjuague para uso doméstico o institucional; agentes desinfectantes y de limpieza líquidos, incluidos los tipos para el lavado de manos antibacteriano, barras de limpieza, enjuagues bucales, productos para la limpieza de dentaduras, champús para automóviles, champús para alfombras, limpiadores de baño; champús para el pelo y/o enjuagues de pelo para humanos y otros animales; geles de ducha y baños de espuma y limpiadores de metales; así como productos auxiliares de limpieza, tales como aditivos blanqueadores y productos de tipo «antiadherencia de manchas» o de pretratamiento. En algunas formas de realización, las composiciones granuladas se encuentran en forma «compacta»; en algunas formas de realización, las composiciones líquidas se encuentran en forma «concentrada».

[0051] Tal como se utiliza en el presente documento, las «composiciones de limpieza de tejidos» incluyen composiciones detergentes para el lavado de ropa a mano y a máquina, incluidas composiciones aditivas para la ropa y composiciones adecuadas para su uso en el remojo y/o el pretratamiento de tejidos manchados (p. ej., ropa, ropa de hogar y otros materiales textiles).

[0052] Tal como se utiliza en el presente documento, las «composiciones de limpieza que no son para tejidos» incluyen composiciones para la limpieza de superficies no textiles (es decir, sin tejido), entre las que se incluyen, a modo de ejemplo y sin carácter limitativo, composiciones detergentes para lavavajillas automático, manual o a mano, composiciones de limpieza bucal, composiciones para la limpieza de dentaduras, composiciones para la limpieza de lentes de contacto, composiciones para el desbridamiento de heridas, y composiciones para el aseo personal.

[0053] Tal como se utiliza en el presente documento, el término «composición detergente» o «formulación detergente» se emplea en referencia a una composición pensada para su uso en un medio de lavado para la limpieza de objetos sucios o manchados, incluyendo artículos u objetos concretos con tejido o sin tejido. Dichas composiciones de la presente descripción no se limitan a ninguna composición o formulación detergente específica. De hecho, en algunas formas de realización, los detergentes de la descripción comprenden al menos un polipéptido de serina proteasa de la descripción y, además, uno o más tensioactivos, transferasa(s), enzimas hidrolíticas, óxidorreductasas, mejoradores (por ejemplo, una sal mejoradora), agentes blanqueadores, activadores del blanqueo, agentes azulados, colorantes fluorescentes, inhibidores de aglomeración, agentes enmascarantes, activadores enzimáticos, antioxidantes y/o solubilizadores. 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 descripción, tales como, a modo de ejemplo y sin carácter limitativo, composiciones de limpieza o composiciones detergentes, no contienen ningún fosfato (p. ej., sal de fosfato o mejorador de fosfato).

[0054] Tal como se entiende en el presente documento, el término «blanqueo» se refiere al tratamiento de un material (por ejemplo, tejido, ropa, pulpa, etc.) o superficie durante un periodo de tiempo suficiente y/o en unas condiciones de pH y/o 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, aunque sin carácter limitativo, por ejemplo, ClO_2, H_2O_2, perácidos, NO_2, etc.

[0055] Tal como se utiliza en el presente documento, la «eficacia de lavado» de una proteasa (p. ej., un polipéptido de serina proteasa de la descripción) se refiere a la contribución de un polipéptido de serina proteasa al lavado que otorga al detergente una eficacia de limpieza adicional en comparación con el detergente sin la adición del polipéptido de serina proteasa a la composición. La eficacia de lavado se compara en condiciones de lavado pertinentes. En algunos sistemas de prueba, otros factores relevantes, 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 se pueden controlar de tal forma que se imite(n) la(s) condición(es) típica(s) para su aplicación doméstica en un determinado sector del mercado (p. ej., limpieza de vajilla manual o a mano, limpieza de vajilla automática, limpieza de artículos de vajilla, limpieza de artículos de mesa, limpieza de tejidos, etc.).

[0056] El término «condiciones de lavado pertinentes» se utiliza en el presente documento para indicar las condiciones, en concreto la temperatura de lavado, el tiempo, el mecanismo de lavado, la concentración de espuma, el tipo de detergente y la dureza del agua, que se utilizan en el ámbito doméstico en un sector de mercado de lavado de vajilla a mano, lavado de vajilla automático o detergente para la ropa.

[0057] Tal como se utiliza en el presente documento, el término «desinfección» se refiere a la eliminación de contaminantes de las superficies, así como la inhibición o destrucción de microbios en las superficies de los artículos. No se pretende que la presente descripción se limite a ninguna superficie ni artículo en concreto ni a contaminante(s) o microbios que vayan a eliminarse.

[0058] La forma «compacta» de las composiciones de limpieza del presente documento se refleja de mejor forma con la densidad y, en lo que respecta a la composición, por la cantidad de sal de relleno inorgánica. Las sales de relleno inorgánicas son ingredientes convencionales de las composiciones detergentes en polvo. En composiciones detergentes convencionales, las sales de relleno se encuentran presentes en cantidades considerables, normalmente de aproximadamente un 17 % a aproximadamente un 35 % en peso de la composición total. En cambio, en composiciones compactas, la sal de relleno se encuentra presente en cantidades que no superan aproximadamente un 15 % de la composición total. En algunas formas de realización, la sal de relleno se encuentra presente en cantidades que no exceden aproximadamente un 10 % o, más preferiblemente, aproximadamente un 5 % en peso de la composición. En algunas formas de realización, las sales de relleno inorgánicas se seleccionan de las sales alcalinas y las sales metálicas alcalinotérreas de sulfatos y cloruros. En algunas formas de realización, la sal de relleno es sulfato de sodio.

II. Polipéptidos de serina proteasa

[0059] La presente descripción proporciona enzimas serina proteasas novedosas. Los polipéptidos de serina proteasa de la presente descripción incluyen polipéptidos aislados, recombinantes, considerablemente puros o de origen no natural. 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 para limpiar un artículo o una superficie que lo requiera.

[0060] En algunas formas de realización, la invención es un clado *B. akibai*/*clarkii* de subtilisinas. En otras formas de realización, la invención es un polipéptido recombinante de una subtilisina del clado *B. akibai*/*clarkii*, o un fragmento activo de esta, que comprende un motivo DRN. En algunas formas de realización, el motivo DRN es VKVLDRNGR[1]G, donde R^1 se selecciona de G o S (SEQ ID n.º 42). En otras formas de realización, el motivo DRN es VKVLDRNGGG (SEQ ID n.º 43). En otras formas de realización adicionales, el motivo DRN es VKVLDRNGSG (SEQ ID n.º 44). En otra forma de realización, el motivo DRN es D95R96N97 (SEQ ID n.º 45). En otra forma de realización adicional, el motivo DRN es V91K92V93L94D95R96N97G98G/S99G100 (SEQ ID n.º 46). En otra forma de realización adicional, el motivo DRN es V91K92V93L94D95R96N97G98G99G100 (SEQ ID n.º 47). En otra forma de realización, el motivo DRN es V91K92V93L94D95R96N97G98S99G100 (SEQ ID n.º 48). En otra forma de realización adicional, el motivo DRN se selecciona de VKVLDRNGR[1]G, donde R^1 se selecciona de entre G o S (SEQ ID n.º 42); VKVLDRNGGG (SEQ ID n.º 43); VKVLDRNGSG (SEQ n.º 44); D95R96N97 (SEQ ID n.º 45); V91K92V93L94D95R96N97G98G/S99G100 (SEQ ID n.º 46); V91K92V93L94D95R96N97G98G99G100 (SEQ ID n.º 47); y V91K92V93L94D95R96N97G98S99G100 (SEQ ID n.º 48). La numeración de secuencias expuesta en las SEQ ID n.º 45, 46, 47 y 48 se basa en la numeración de secuencias de la SEQ ID n.º 3 BspAI02518.

[0061] En algunas formas de realización, el polipéptido de la presente invención es un polipéptido que posee un grado específico de homología de secuencias de aminoácidos con los ejemplos de polipéptidos, por ejemplo, un 70 %, 72 %, 74 %, 76 %, 78 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID n.º 3, SEQ ID n.º 6 y comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º 42, 43, 44, 45, 46, 47 o 48. En otra forma de realización adicional, el polipéptido de la presente invención es un polipéptido que posee un grado específico de homología de secuencias de aminoácidos con los ejemplos de polipéptidos, por ejemplo, un 72 %, 74 %, 76 %, 78 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID n.º 3, SEQ ID n.º 6, SEQ ID n.º 11, SEQ ID n.º 14, SEQ ID n.º 17, SEQ ID n.º 20, SEQ ID n.º 23, SEQ ID n.º 26, SEQ ID n.º 29, SEQ ID n.º 32, SEQ ID n.º 35, SEQ ID n.º 38, SEQ ID n.º 41 o SEQ ID n.º 84 y comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID n.º 42, 43, 44, 45, 46, 47 o 48. La homología se puede determinar mediante el alineamiento de secuencias de aminoácidos, p. ej., utilizando un programa como BLAST, ALIGN o CLUSTAL, como se ha descrito en el presente documento. En algunas formas de realización, el polipéptido es una enzima aislada, recombinante, considerablemente pura o de origen no natural que presenta actividad de proteasa.

[0062] En otras formas de realización, el polipéptido de la presente invención, o un fragmento activo de este, es de una subtilisina del clado *B. akibai*/*clarkii*, donde el polipéptido o el fragmento activo de este posee actividad proteolítica.

[0063] En otra forma de realización, el polipéptido de la presente invención, o un fragmento activo de este, es de una subtilisina del clado *B. akibai*/*clarkii*, donde el polipéptido o el fragmento activo de este presenta actividad proteolítica y comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID n.º 42, 43, 44, 45, 46, 47 o 48.

[0064] De acuerdo con la presente invención, el polipéptido de la presente invención, o un fragmento activo de este, es de una subtilisina del clado *B. akibai*/*clarkii*, donde el polipéptido o el fragmento activo de este presenta actividad proteolítica y que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID n.º 42, 43, 44, 45, 46, 47 o 48,

y comprende, además, una secuencia de aminoácidos que presenta al menos: (i) un 72 % de identidad con una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º 11, 14, 17, 32, 35, 38, 41 u 84; (ii) un 72 % de identidad con una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º 11, 14 o 17; (iii) un 70 % de identidad con una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º 3, 6, 20, 23, 26, 29 o (iv) un 70 % de identidad con una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º 3, 6, 20, 23, 26, 29.

[0065] De acuerdo con la presente invención, el polipéptido de la presente invención, o un fragmento activo de este, presenta actividad proteolítica y comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º 42, 43, 44, 45, 46, 47 o 48, y comprende una secuencia de aminoácidos que posee al menos: (i) un 70 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º 3, SEQ ID n.º 6, SEQ ID n.º 20, SEQ ID n.º 23, SEQ ID n.º 26 o SEQ ID n.º 29; (ii) un 70 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º 3, SEQ ID n.º 6; (iii) un 72 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º 11, SEQ ID n.º 14, SEQ ID n.º 17, SEQ ID n.º 32, SEQ ID n.º 35, SEQ ID n.º 38, SEQ ID n.º 41 o SEQ ID n.º 84; (iv) un 72 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID n.º 11, SEQ ID n.º 14 o SEQ ID n.º 17; o (v) un 72 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º 32, SEQ ID n.º 35, SEQ ID n.º 38, SEQ ID n.º 41 o SEQ ID n.º 84.

[0066] De acuerdo con la presente invención, se proporciona una enzima polipeptídica de la presente invención que posee actividad de proteasa, tal como actividad de proteasa alcalina que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º 42, 43, 44, 45, 46, 47 o 48, y que comprende una secuencia de aminoácidos que difiere de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º 3, 6, 11, 14, 17, 20, 23, 26, 29, 32, 35, 38, 41 u 84 en no más de 50, no más de 40, no más de 30, no más de 25, no más de 20, no más de 15, no más de 10, no más de 9, no más de 8, no más de 7, no más de 6, no más de 5, no más de 4, no más de 3, no más de 2 o no más de 1 residuo(s) de aminoácidos cuando se alineen utilizando cualquiera de los métodos de alineamiento descritos anteriormente.

[0067] Como se ha indicado anteriormente, los polipéptidos de variantes enzimáticas de la invención presentan actividades enzimáticas (p. ej., actividades de proteasa) y, por lo tanto, resultan útiles en aplicaciones de limpieza, incluyendo, aunque sin carácter limitativo, métodos para limpiar artículos de vajilla, artículos de mesa, tejidos y artículos que posean superficies duras (p. ej., la superficie dura de una mesa, tablero, pared, mueble, suelo, techo, etc.). Algunos ejemplos de composiciones de limpieza que comprenden uno o más polipéptidos de variantes de enzima serina proteasa se describen más adelante. La actividad enzimática (p. ej., actividad enzimática de proteasa) de un polipéptido enzimático de la invención se puede determinar fácilmente utilizando procedimientos ampliamente conocidos por los expertos en la materia. Los ejemplos presentados a continuación describen métodos para evaluar la actividad enzimática y la eficacia de limpieza. La eficacia de las enzimas polipeptídicas de la invención para eliminar manchas (p. ej., una mancha de proteína, tal como sangre/leche/tinta o yema de huevo), limpiar superficies duras, o bien para lavar la ropa, artículo(s) de vajilla o de mesa, se puede determinar fácilmente utilizando procedimientos ampliamente conocidos en la técnica y/o utilizando procedimientos expuestos en los Ejemplos. En algunas formas de realización, la invención es un polipéptido recombinante o fragmento activo del mismo de la invención, donde el polipéptido posee actividad de proteasa en presencia de un tensioactivo. En algunas formas de realización, la actividad de proteasa comprende actividad de hidrólisis de caseína. En algunas formas de realización, la actividad de proteasa comprende actividad de hidrólisis de dimetilcaseína.

[0068] Los polipéptidos de serina proteasa de la presente invención pueden presentar actividad de proteasa en una amplia gama de condiciones de pH. En algunas formas de realización, los polipéptidos de serina proteasa presentan actividad de proteasa en un sustrato de azocaseína, tal como se demuestra en el Ejemplo 4. En algunas formas de realización, los polipéptidos de serina proteasa poseen actividad de proteasa con un pH de aproximadamente 4,0 a aproximadamente 12,0. En algunas formas de realización, los polipéptidos de serina proteasa poseen actividad de proteasa con un pH de aproximadamente 8,0 a aproximadamente 12,0. En algunas formas de realización, los polipéptidos de serina proteasa poseen al menos un 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o 90 % de actividad de proteasa máxima con un pH de aproximadamente 8,0 a aproximadamente 12,0. En algunas formas de realización, los polipéptidos de serina proteasa poseen actividad de proteasa con un pH mayor de 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10,0, 10,5, 11,0 u 11,5. En algunas formas de realización, los polipéptidos de serina proteasa poseen actividad de proteasa con un pH inferior a 12,0, 11,5, 11,0, 10,5, 10,0, 9,5, 9,0 u 8,5.

[0069] En algunas formas de realización, los polipéptidos de serina proteasa de la presente invención presentan actividad de proteasa en un rango de temperatura de aproximadamente 10 °C a aproximadamente 90 °C. En algunas formas de realización, los polipéptidos de serina proteasa de la presente invención presentan actividad de proteasa en un rango de temperatura de aproximadamente 50 °C a aproximadamente 75 °C. En algunas formas de realización, los polipéptidos de serina proteasa presentan al menos un 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o un 90 % de actividad de proteasa máxima con una temperatura de aproximadamente 50 °C a aproximadamente 75 °C. En algunas formas de realización, las serina proteasas poseen actividad con una temperatura superior a 50 °C, 55 °C, 60 °C, 65 °C o 70 °C. En algunas formas de realización, las serina proteasas presentan actividad con una temperatura inferior a 75 °C, 70 °C, 65 °C, 60 °C o 55 °C.

[0070] En algunas formas de realización, los polipéptidos de serina proteasa de la presente invención muestran eficacia de limpieza en una composición de limpieza. Las composiciones de limpieza suelen incluir ingredientes

perjudiciales para la estabilidad y la eficacia de las enzimas, lo cual deriva en que las composiciones de limpieza conformen un entorno hostil para que las enzimas, p. ej., serina proteasas, conserven su función. Por lo tanto, no resulta insignificante que una enzima se incorpore en una composición de limpieza y se espere una función enzimática (p. ej., actividad de serina proteasa, como ha demostrado la eficacia de limpieza). En algunas formas de realización, los polipéptidos de serina proteasa de la presente invención muestran eficacia de limpieza en composiciones detergentes para lavavajillas automático (ADW). En algunas formas de realización, la eficacia de limpieza en composiciones detergentes para lavavajillas automático (ADW) incluyen la limpieza de manchas de yema de huevo. En algunas formas de realización, los polipéptidos de serina proteasa de la presente invención muestran eficacia de limpieza en composiciones detergentes para ropa. En algunas formas de realización, la eficacia de limpieza en composiciones detergentes para ropa incluye la limpieza de manchas de sangre/leche/tinta. En cada una de las composiciones de limpieza, los polipéptidos de serina proteasa de la presente invención muestran eficacia de limpieza con o sin un componente de blanqueo.

[0071] Un polipéptido de la invención puede someterse a varios cambios, como a una o más inserciones, deleciones y/o sustituciones de aminoácidos, ya sean conservativas o no conservativas, incluso cuando dichos cambios no alteren de manera considerable la actividad enzimática del polipéptido. Del mismo modo, un ácido nucleico de la invención también puede someterse a diversos cambios, como a una o más sustituciones de uno o más nucleótidos en uno o varios codones, de forma que un codón concreto codifique el mismo aminoácido o uno distinto, dando como resultado bien una variación silenciosa (p. ej., cuando el aminoácido codificado no se vea alterado por la mutación del nucleótido) o 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 o uno o más truncamientos de uno o más ácidos nucleicos (o codones) en la secuencia. Muchos de estos cambios en la secuencia de ácido nucleico pueden no alterar de manera considerable la actividad enzimática de la enzima polipeptídica codificada resultante en comparación con la enzima polipeptídica codificada por la secuencia de ácido nucleico original. Una secuencia de ácido nucleico de la invención también se puede modificar para incluir uno o más codones que proporcionen una expresión óptima en un sistema de expresión (p. ej., sistema de expresión bacteriana), mientras que, si se desea, dichos uno o más codones todavía codifican el/los mismo(s) aminoácido(s).

[0072] En algunas formas de realización, la presente invención da a conocer un género de polipéptidos enzimáticos que posee la actividad enzimática deseada (p. ej., actividad enzimática de proteasa o actividad de eficacia de limpieza) que comprende secuencias que presentan las sustituciones de aminoácidos descritas en el presente documento y que también comprenden una o más sustituciones de aminoácidos adicionales, tales como sustituciones conservativas o no conservativas, donde el polipéptido exhibe, mantiene, o mantiene aproximadamente la actividad enzimática deseada (p. ej., actividad proteolítica, reflejada en la actividad o eficacia de limpieza de la enzima polipeptídica de la reivindicación 1). En algunas formas de realización, la actividad proteolítica se ve reflejada en la actividad o eficacia de limpieza de la enzima polipeptídica según la reivindicación 1. Las sustituciones de aminoácidos de acuerdo con la invención pueden incluir, aunque sin carácter limitativo, una o más sustituciones no conservativas de aminoácidos y/o una o más sustituciones conservativas de aminoácidos. Una sustitución de residuo de aminoácido conservativa conlleva normalmente el intercambio de un miembro incluido en una clase funcional de residuos de aminoácidos por un residuo que pertenezca a la misma clase funcional (los residuos de aminoácidos conservativos se consideran funcionalmente homólogos o se conservan calculando el porcentaje de homología funcional). Una sustitución de aminoácidos conservativa conlleva normalmente la sustitución de un aminoácido en una secuencia de aminoácidos con un aminoácido funcionalmente similar. Por ejemplo, la alanina, la glicina, la serina y la treonina son funcionalmente similares y, por consiguiente, pueden servir como sustituciones conservativas de aminoácidos entre sí. El ácido aspártico y el ácido glutámico pueden servir como sustituciones conservativas entre sí. La asparagina y la glutamina pueden servir como sustituciones conservativas entre sí. La arginina, la lisina y la histidina pueden servir como sustituciones conservativas entre sí. La isoleucina, la leucina, la metionina y la valina pueden servir como sustituciones conservativas entre sí. La fenilalanina, la tirosina y el triptófano pueden servir como sustituciones conservativas entre sí.

[0073] Pueden contemplarse otros grupos de sustituciones conservativas de aminoácidos. Por ejemplo, los aminoácidos se pueden agrupar según su función, estructura química o composición similar (p. ej., ácida, básica, alifática, aromática, azufrada). Por ejemplo, un grupo alifático puede comprender: glicina (G), alanina (A), valina (V), leucina (L), isoleucina (I). Otros grupos que contienen aminoácidos que se consideran sustituciones conservativas entre sí incluyen: aromáticos: fenilalanina (F), tirosina (Y), triptófano (W); azufrados: metionina (M), cisteína (C); básicos: arginina (R), lisina (K), histidina (H); ácidos: ácido aspártico (D), ácido glutámico (E); residuos sin carga no polares, cisteína (C), metionina (M) y prolina (P); residuos sin carga hidrofílicos: serina (S), treonina (T), asparagina (N) y glutamina (Q). Los expertos en la materia conocen grupos adicionales de aminoácidos, y se describen en varios libros de texto convencionales. El listado de una secuencia polipeptídica en el presente documento, junto con los anteriores grupos de sustituciones, proporciona una relación expresa de todas las secuencias polipeptídicas sustituidas de manera conservativa.

[0074] Existen más sustituciones conservativas incluidas en las clases de residuos de aminoácidos descritas anteriormente, que pueden resultar adecuadas de manera alternativa o adicional. Los grupos de conservación

para sustituciones que sean más conservativas incluyen: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, y asparagina-glutamina.

[0075] Las variaciones sustituidas de forma conservadora de una secuencia polipeptídica de la invención (p. ej., variantes de serina proteasas de la invención) incluyen sustituciones de un pequeño porcentaje, en ocasiones inferior a un 5 %, 4 %, 3 %, 2% o 1 %, o menos de 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 sustitución(es) de aminoácidos de los aminoácidos de la secuencia polipeptídica, con un aminoácido seleccionado de forma conservadora del mismo grupo de sustitución conservativa.

III. Ácidos nucleicos que codifican serina proteasas

[0076] La invención proporciona ácidos nucleicos aislados, de origen no natural o recombinantes, a los que se puede hacer referencia de forma colectiva como «ácidos nucleicos de la invención» o «polinucleótidos de la invención», que codifican polipéptidos de la invención. Los ácidos nucleicos de la invención, incluyendo todos los que se describen a continuación, son útiles en la producción recombinante (p. ej., expresión) de polipéptidos de la invención, normalmente a través de la expresión de un vector de expresión plasmídico que comprende una secuencia que codifica el polipéptido de interés o fragmento del mismo. Como se ha descrito anteriormente, los polipéptidos incluyen polipéptidos de serina proteasa que presentan 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., la superficie de un artículo) que necesite limpiarse.

[0077] En algunas formas de realización, el polinucleótido de la presente invención es un polinucleótido que presenta un grado específico de homología de ácido nucleico con el ejemplo de polinucleótido. En algunas formas de realización, el polinucleótido comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID n.º 1, SEQ ID n.º 4, SEQ ID n.º 9, SEQ ID n.º 12 y SEQ ID n.º 15. En otras formas de realización, el polinucleótido comprende una secuencia de ácido nucleico que posee al menos un 70, 72, 73, 74, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100 % de identidad con la SEQ ID n.º 1, 4, 18, 21, 24 o 27. En otras formas de realización, el polinucleótido de la presente invención puede presentar también una secuencia de ácido nucleico complementaria a una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID n.º 1, SEQ ID n.º 4, SEQ ID n.º 9, SEQ ID n.º 12 y SEQ ID n.º 15. En una forma de realización adicional, el polinucleótido de la presente invención puede presentar también una secuencia de ácido nucleico complementaria a la SEQ ID n.º 1, 4, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33, 36 o 39. En algunas formas de realización, un polinucleótido de la presente invención presenta una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que posee al menos un 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º 3, 6, 20, 23, 26 o 29, y comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º 42, 43, 44, 45, 46, 47 o 48. La homología se puede determinar mediante el alineamiento de secuencias de aminoácidos, p. ej., utilizando un programa como BLAST, ALIGN o CLUSTAL, según se ha descrito en el presente documento.

[0078] En una forma de realización adicional, el polinucleótido de la presente invención codifica una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º 42, 43, 44, 45, 46, 47 o 48 y, además, codifica una secuencia de aminoácidos que posee un 70 % de identidad con una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º 3, 6, 20, 23, 26 o 29. En otra forma de realización, el polinucleótido de la presente invención codifica una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º 42, 43, 44, 45, 46, 47 o 48 y, además, codifica una secuencia de aminoácidos que presenta un 70 % de identidad con una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º 3 o 6. De acuerdo con la presente invención, el polinucleótido de la presente invención codifica una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º 42, 43, 44, 45, 46, 47 o 48 y, además, codifica una secuencia de aminoácidos que posee un 72 % de identidad con una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º 11, 14, 17, 32, 35, 38 o 41. En otra forma de realización adicional, el polinucleótido de la presente invención codifica una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º 42, 43, 44, 45, 46, 47 o 48 y, además, codifica una secuencia de aminoácidos que posee un 72 % de identidad con una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º 11, 14 o 17.

[0079] En algunas formas de realización, la invención expone un ácido nucleico aislado, recombinante, considerablemente puro o de origen no natural que comprende una secuencia nucleotídica que codifica cualquier polipéptido (incluida cualquier proteína de fusión, etc.) de la invención tal como se ha descrito anteriormente en la sección titulada «Polipéptidos de la invención» y en cualquier otra parte del presente documento. En algunas formas de realización, la invención da a conocer un ácido nucleico derivado sintéticamente que comprende una secuencia nucleotídica que codifica cualquier polipéptido (incluida cualquier proteína de fusión, etc.) de la invención descrito en el presente documento. La invención da a conocer también 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 cualquier polipéptido de la invención descrito anteriormente y en cualquier otra parte del presente documento. La invención da a conocer también un ácido nucleico derivado sintéticamente que comprende una secuencia nucleotídica que codifica una combinación de dos o más de cualquier polipéptido de la invención descrito en el presente documento. La presente invención proporciona ácidos nucleicos que codifican un polipéptido de serina proteasa de la presente invención, donde el polipéptido de serina proteasa es una forma madura que posee actividad proteolítica. En algunas formas de realización, la serina proteasa (p. ej., BspAI02518) se expresa de manera recombinante con una secuencia propeptídica

homóloga (p. ej., propéptido BspAI02518). En otras formas de realización, la serina proteasa se expresa de manera recombinante con una secuencia propeptídica heteróloga (p. ej., secuencia propeptídica GG36 expuesta como:

AEEAKEKYLIGFNEQEAVSEFVEQVEANDEVAILSEEEEVEIELLHEFETIPVLSVELSPEDVD

ALELDPAISYIEEDAEVTTM SEQ ID n.º 82)).

[0080] Los ácidos nucleicos de la invención pueden generarse utilizando cualquier técnica adecuada de síntesis, manipulación y/o aislamiento, o combinaciones de las mismas. Por ejemplo, un polinucleótido de la invención puede producirse utilizando técnicas de síntesis de ácidos nucleicos convencionales, como técnicas de síntesis en fase sólida que son ampliamente conocidas por los expertos en la materia. En dichas técnicas, normalmente se sintetizan fragmentos de hasta 50 o más bases nucleotídicas, que después se unen (p. ej., mediante métodos de ligadura química o enzimática) para formar prácticamente cualquier secuencia de ácido nucleico continua que se desee. La síntesis de los ácidos nucleicos de la invención se puede facilitar también mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica, incluyendo, aunque sin carácter limitativo, la síntesis química que utiliza el método de fosforamidita tradicional (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 emplea normalmente en los métodos sintéticos automatizados. Los ácidos nucleicos de la invención también se pueden producir utilizando un sintetizador de ADN automático. Pueden adquirirse ácidos nucleicos personalizados a través de varias fuentes comerciales (p. ej., Midland Certified Reagent Company, Great American Gene Company, Operon Technologies Inc. y DNA2.0). En el ámbito de especialización 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]).

[0081] Tal como se ha indicado anteriormente, las técnicas de ADN recombinante útiles para la modificación de ácidos nucleicos resultan ampliamente conocidas en el ámbito de especialización. Por ejemplo, técnicas como la digestión con endonucleasas de restricción, la ligadura, la transcripción inversa y la producción de ADNc, así como la reacción en cadena de la polimerasa (p. ej., PCR) resultan conocidas y las utilizan ampliamente los expertos en la materia. Los nucleótidos de la invención también se pueden obtener cribando bibliotecas de ADNc utilizando una o más sondas de oligonucleótidos que se puedan hibridar con polinucleótidos que codifiquen uno o más polipéptido(s) de serina proteasa de la invención, o que puedan amplificarlos mediante PCR. Los procedimientos para cribar y aislar clones de ADNc y los procedimientos de amplificación mediante PCR resultan conocidos para los expertos en la materia y se describen en referencias generales conocidas por los expertos en la materia. Algunos ácidos nucleicos de la invención se pueden obtener modificando la estructura principal de un polinucleótido de origen natural (p. ej., que codifique una enzima o proteasa original) mediante, por ejemplo, un procedimiento de mutagénesis conocido (p. ej., mutagénesis dirigida, mutagénesis de saturación de sitio y recombinación *in vitro*). En la técnica se conoce diversos métodos que resultan adecuados para generar polinucleótidos modificados de la invención que codifiquen polipéptidos de serina proteasa de la invención, entre los que se incluyen, a modo de ejemplo y sin carácter limitativo, mutagénesis de saturación de sitio, mutagénesis de barrido, mutagénesis insercional, mutagénesis de deleción, mutagénesis aleatoria, mutagénesis dirigida y evolución dirigida, así como otros muchos enfoques recombinatorios.

IV. Vectores, células huésped y métodos para producir serina proteasas

[0082] La presente invención da a conocer vectores que comprenden al menos un polinucleótido de serina proteasa de la invención descrito en el presente documento (p. ej., un polinucleótido que codifica un polipéptido de serina proteasa de la invención descrito en el presente documento), casetes de expresión o vectores de expresión 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, 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.

[0083] En algunas formas de realización, la invención proporciona 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 dichas células recombinantes se transforman o transfectan con dicho al menos un vector, aunque existen otros métodos disponibles que se conocen en la técnica. Dichas células se denominan normalmente células huésped. Algunas de dichas células comprenden células bacterianas, entre las que se incluyen, entre otras, las células de *Bacillus* sp., tales como las células de *B. subtilis.* La invención también proporciona células recombinantes (p. ej., células huésped recombinantes) que comprenden al menos un polipéptido de serina proteasa de la invención.

[0084] En algunas formas de realización, la invención proporciona 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 un polipéptido de serina proteasa

de la invención se encuentra ligada de forma operativa a uno o más segmento(s) de ácido nucleico necesario(s) para una expresión génica eficaz (p. ej., un promotor ligado de forma operativa al polinucleótido de la invención que codifica un polipéptido de serina proteasa de la invención). Un vector puede incluir un terminador de la transcripción y/o un gen de selección, como un gen de resistencia a los antibióticos, que permita el mantenimiento continuo en el cultivo de células huésped infectadas con plásmidos mediante su cultivo en medios que contengan antimicrobianos.

[0085] Un vector de expresión se 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, pC194, pJH101, pE194, pHP13 (véase Harwood y Cutting [eds.], Capítulo 3, Molecular Biological Methods for Bacillus, John Wiley & Sons [1990]; entre los plásmidos de replicación adecuados para *B. subtilis* se incluyen los que se listan en la p. 92), véase también Perego, Integrational Vectors for Genetic Manipulations in *B. subtilis,* en Sonenshein *et al.*, [eds.] B. subtilis and Other Gram-Positive Bacteria: Biochemistry, Physiology and Molecular Genetics, American Society for Microbiology, Washington, D.C. [1993], pp. 615-624), y p2JM103BBI.

[0086] Para la expresión y la producción de una proteína de interés (p. ej., polipéptido de serina proteasa) en una célula, al menos un vector de expresión que comprende al menos una copia de un polinucleótido que codifica el polipéptido de serina proteasa, y que, en algunos casos, comprende múltiples copias, se transforma en la célula en condiciones adecuadas para la expresión de la serina proteasa. En algunas formas de realización de la presente invención, una secuencia polinucleotídica que codifica el polipéptido de serina proteasa (así como otras secuencias incluidas en el vector) se integra en el genoma de la célula huésped, mientras que, en otras formas de realización, un vector plasmídico que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica el polipéptido de serina proteasa permanece como un elemento extracromosómico autónomo en el interior de la célula. La invención proporciona tanto elementos de ácido nucleico extracromosómico como secuencias nucleotídicas entrantes que están integradas en el genoma de la célula huésped. Los vectores descritos en el presente documento resultan útiles para la producción de los polipéptidos de serina proteasa de la invención. En algunas formas de realización, un constructo polinucleotídico que codifica el polipéptido de serina proteasa se encuentra presente en un vector de integración que posibilita la integración y, opcionalmente, la amplificación del polinucleótido que codifica el polipéptido de serina proteasa en el cromosoma huésped. Los ejemplos de sitios de integración resultan ampliamente conocidos para los expertos en la materia. En algunas formas de realización, la transcripción de un polinucleótido que codifica un polipéptido de serina proteasa de la invención la lleva a cabo un promotor que es el promotor natural para la proteasa precursora seleccionada. En otras formas de realización, el promotor es heterólogo a la proteasa precursora, pero funcional en la célula huésped. En concreto, entre los ejemplos de promotores adecuados para su uso en células huésped 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 (BAN) de *B. amyloliquefaciens*, el gen de proteasa alcalina de *B. subtilis*, el gen de proteasa alcalina de *B. clausii*, el gen de xilosidasa de *B. pumilis*, el cryIIIA de *B. thuringiensis* y el gen de alfa-amilasa de *B. licheniformis*. Entre los promotores adicionales se incluyen, entre otros, el promotor A4, así como los promotores PR o PL de fago lambda, y los promotores lac, trp o tac de *E. coli.*

[0087] Los polipéptidos de serina proteasa de la presente invención se pueden producir en células huésped de cualquier microorganismo adecuado, incluidos hongos y bacterias. En algunas formas de realización, los polipéptidos de serina proteasa de la presente invención se pueden producir en bacterias grampositivas. En algunas formas de realización, las células huésped son de *Bacillus* spp., *Streptomyces* spp., *Escherichia* spp., *Aspergillus* spp., *Trichoderma* spp., *Pseudomonas* spp., *Corynebacterium* spp., *Saccharomyces* spp. o *Pichia* spp. En algunas formas de realización, los polipéptidos de serina proteasa los producen células huésped de *Bacillus* sp. Entre los ejemplos de células huésped de *Bacillus* sp. que se pueden utilizar en la producción de los polipéptidos de serina 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 del género *Bacillus*. En algunas formas de realización, las células huésped de *B. subtilis* se utilizan para la producción de polipéptidos de serina proteasa. En las patentes estadounidenses con número 5,264,366 y 4,760,025 (RE 34,606) se describen varias cepas huésped de *Bacillus* que pueden utilizarse para producir polipéptido de serina proteasa de la invención, aunque se pueden utilizar otras cepas adecuadas.

[0088] Varias cepas bacterianas que se pueden utilizar para producir polipéptidos de serina proteasa de la invención incluyen cepas de *Bacillus* sp. no recombinantes (esto es, naturales), así como variantes de cepas de origen natural y/o cepas recombinantes. En algunas formas de realización, la cepa huésped es una cepa recombinante, donde un polinucleótido que codifica un polipéptido de interés se ha introducido en el huésped. En algunas formas de realización, la cepa huésped es una cepa huésped de *B. subtilis* y, en concreto, una cepa huésped de *B. subtilis* recombinante. Se conocen numerosas cepas de *B. subtilis*, entre las que se incluyen, a modo de ejemplo y sin carácter limitativo, las cepas 1A6 (ATCC 39085), 168 (1A01), SB19, W23, Ts85, B637, PB1753 a 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,

los documentos de patente estadounidense 4,450,235 y 4,302,544 y EP 0134048). El uso de *B. subtilis* como células huésped de expresión resulta muy conocido en la técnica (véase, 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]).

[0089] En algunas formas de realización, la célula huésped 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. En algunas formas de realización, la mutación se produce en un gen degU y, en algunas formas de realización, 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]). En algunas formas de realización, el huésped de *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 una mutación en el gen oppA se utilizará en algunas formas de realización de la cepa de *Bacillus* modificada de la invención. En algunas formas de realización, estas mutaciones ocurren de forma independiente, mientras que, en otras formas de realización, se dan combinaciones de mutaciones. En algunas formas de realización, una cepa de célula huésped de *Bacillus* modificada que se pueda utilizar para producir un polipéptido de serina proteasa de la invención es una cepa huésped de *Bacillus* que ya incluye una mutación en uno o más de los genes anteriormente mencionados. Además, se pueden utilizar células huésped de *Bacillus* sp. que comprendan mutación(es) y/o deleciones de genes de proteasa endógenos. En algunas formas de realización, la célula huésped de *Bacillus* comprende una deleción de los genes aprE y nprE. En otras formas de realización, la célula huésped de *Bacillus* sp. comprende una deleción de 5 genes de proteasa, mientras que, en otras formas de realización, la célula huésped de *Bacillus* sp. comprende una deleción de 9 genes de proteasa (véase, p. ej., el documento de patente estadounidense Appl. Pub. n.º 2005/0202535).

[0090] Las células huésped se transforman con al menos un ácido nucleico que codifica al menos un polipéptido de serina proteasa de la invención utilizando cualquier método adecuado conocido en la técnica. Se conocen métodos para introducir un ácido nucleico (p. ej., ADN) en células de *Bacillus* o células de *E. coli* utilizando vectores o constructos de ADN plasmídico y transformando dichos vectores o constructos de ADN plasmídico en dichas células. En algunas formas de realización, los plásmidos se aíslan posteriormente de células de *E. coli* y se transforman en células de *Bacillus*. No obstante, no es fundamental utilizar microorganismos de intervención como *E. coli* y, en algunas formas de realización, un vector o constructo de ADN se introduce directamente en un huésped de *Bacillus*.

[0091] Los expertos en la materia conocen métodos adecuados para introducir secuencias de ácido nucleico de la invención en células de *Bacillus* (véase, 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, dichos métodos, como la transformación, incluyendo la transformación y la transfección de protoplastos, la transducción y la fusión de protoplastos, resultan ampliamente conocidos y adecuados para su utilización en la presente invención. Los métodos que se conocen en la técnica para transformar células de *Bacillus* incluyen métodos tales como la transformación de rescate de marcador plasmídico, que implica la absorción de un plásmido donador por parte de células competentes que portan un plásmido residente parcialmente homólogo (véase, 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 «auxiliar» residente en un proceso que imita la transformación cromosómica.

[0092] Además de los métodos utilizados normalmente, en algunas formas de realización, las células huésped se transforman directamente con un vector o constructo de ADN que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido de serina proteasa de la invención (esto es, no se utiliza una célula intermedia para amplificar ni para procesar de otro modo el vector o constructo de ADN antes de su introducción en la célula huésped). La introducción del vector o constructo de ADN de la invención en la célula huésped incluye aquellos métodos físicos y químicos que se sepa en la técnica que introducen una secuencia de ácido nucleico (p. ej., secuencia de ADN) en una célula huésped sin su inserción en el genoma huésped. Dichos métodos incluyen, sin carácter limitativo, precipitación con cloruro de calcio, electroporación, ADN desnudo, liposomas y similares. En formas de realización adicionales, el vector o los constructos de ADN se cotransforman con un plásmido sin insertarse en el plásmido. En otras formas de realización, se deleciona un marcador selectivo de la cepa de *Bacillus* modificada mediante métodos conocidos en la técnica (véase Stahl *et al.*, J. Bacteriol. 158:411-418 [1984]; y Palmeros *et al.*, Gene 247:255 -264 [2000]).

[0093] En algunas formas de realización, las células transformadas de la presente invención se cultivan en medios nutritivos convencionales. Las condiciones de cultivo específicas adecuadas, como la temperatura, el pH y similares, resultan conocidas para los expertos en la materia y están bien descritas en la literatura científica. En algunas formas de realización, la invención proporciona un cultivo (p. ej., cultivo celular) que comprende al menos un polipéptido de serina proteasa o al menos un ácido nucleico de la invención.

[0094] En algunas formas de realización, las células huésped transformadas con al menos una secuencia polinucleotídica que codifica al menos un polipéptido de serina proteasa de la invención se cultivan en un medio nutritivo adecuado en condiciones que permiten la expresión de la proteasa presente, tras lo cual se recupera la proteasa resultante del cultivo. En algunas formas de realización, la proteasa producida por las células se recupera del medio de cultivo mediante procesos convencionales, incluyendo, a modo de ejemplo y sin carácter limitativo, la separación de las células huésped del medio mediante centrifugación o filtración, la precipitación de los componentes proteínicos del sobrenadante o el filtrado por medio de una sal (p. ej., sulfato de amonio), purificación cromatográfica (p. ej., intercambio de iones, filtración en gel, afinidad, etc.).

[0095] En algunas formas de realización, un polipéptido de serina proteasa producida por una célula huésped recombinante se secreta 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. Un vector o constructo de ADN que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica un polipéptido de serina proteasa puede comprender, además, una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio que facilita la purificación para facilitar la purificación del polipéptido de serina proteasa (véase, p. ej., Kroll *et al.*, DNA Cell Biol. 12:441-53 [1993]). Dichos dominios que facilitan la purificación 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 en inmunoglobulina inmovilizada, y el dominio utilizado en el sistema de purificación por afinidad/extensión FLAGS. La inclusión de una secuencia conectora escindible como Factor XA o enteroquinasa (por ejemplo, secuencias disponibles de Invitrogen, San Diego, California) entre el dominio de purificación y la proteína heteróloga también se puede utilizar para facilitar la purificación.

[0096] Los ensayos para detectar y medir la actividad enzimática de una enzima, como un polipéptido de serina proteasa de la invención, resultan ampliamente conocidos. También resultan ampliamente conocidos para los expertos en la materia diversos ensayos para detectar y medir la actividad de proteasas (p. ej., los polipéptidos de serina proteasa de la invención). En concreto, se dispone de ensayos para medir la actividad de proteasa que se basan en la liberación de péptidos de caseína o hemoglobina solubles en ácido, medida como absorbancia a 280 nm o de forma colorimétrica utilizando el método de Folin. 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). Otros ejemplos de ensayos incluyen, sin carácter limitativo, el ensayo con succinil-Ala-Ala-Pro-Phe-para nitroanilida (suc-AAPF-pNA) y el ensayo con sal de sodio de sulfonato de 2,4,6-trinitrobenceno (ensayo TNBS). Existen numerosas referencias adicionales conocidas por los expertos en la materia que proporcionan 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]).

[0097] Se pueden utilizar diversos métodos para determinar el nivel de producción de una proteasa madura (p. ej., polipéptidos de serina proteasa madura de la presente invención) en una célula huésped. Dichos métodos incluyen, sin carácter limitativo, por ejemplo, métodos que utilizan anticuerpos policlonales o bien monoclonales específicos para la proteasa. Entre los ejemplos de métodos se incluyen, aunque sin carácter limitativo, los ensayos de inmunoabsorción ligados a enzimas (ELISA), los radioinmunoensayos (RIA), los inmunoensayos fluorescentes (FIA) y la clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS). Estos y otros ensayos se conocen en la técnica (véase, p. ej., Maddox *et al.*, J. Exp. Med. 158:1211 [1983]).

[0098] En algunas otras formas de realización, la invención ofrece métodos para elaborar o producir un polipéptido de serina proteasa madura de la invención. Un polipéptido de serina proteasa madura no incluye un péptido señal ni una secuencia propeptídica. Algunos métodos comprenden la elaboración o producción de un polipéptido de serina proteasa de la invención en una célula huésped bacteriana recombinante, como, por ejemplo, una célula de *Bacillus* sp. (p. ej., una célula de *B. subtilis*). En algunas formas de realización, la invención proporciona un método para producir un polipéptido de serina proteasa de la invención, comprendiendo el método el cultivo de una célula huésped recombinante que comprende un vector de expresión recombinante que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido de serina proteasa de la invención en condiciones propicias para la producción del polipéptido de serina proteasa. Algunos de dichos métodos comprenden, además, la recuperación del polipéptido de serina proteasa del cultivo.

[0099] En algunas formas de realización, la invención proporciona métodos para producir un polipéptido de serina proteasa de la invención, comprendiendo los métodos: (a) introducir un vector de expresión recombinante que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido de serina 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 el polipéptido de serina proteasa codificado por el vector de expresión. Algunos de dichos métodos comprenden, además: (c) aislar el polipéptido de serina proteasa de las células o del medio de cultivo.

V. Composiciones que comprenden serina proteasas

A. Productos para el cuidado del hogar y de tejidos

[0100] A no ser que se indique otra cosa, todos los niveles de componentes o de composiciones que se proporcionan en el presente documento se elaboran en referencia al nivel activo de ese componente o composición, y no incluyen impurezas, como, por ejemplo, subproductos o disolventes residuales, que pueden estar presentes en fuentes disponibles en el mercado. Los pesos de los componentes enzimáticos se basan en la proteína activa total. Todos los porcentajes y proporciones se calculan en peso a no ser que se indique de otro modo. Todos los porcentajes y proporciones se calculan en función de la composición total a no ser que se indique de otro modo. Las composiciones de la invención incluyen composiciones de limpieza, tales como composiciones detergentes. En los ejemplos de composiciones detergentes, los niveles enzimáticos se expresan en enzima pura en peso de la composición total y, a no ser que se especifique lo contrario, los ingredientes del detergente se expresan en peso de las composiciones totales.

[0101] A pesar de que no son fundamentales para los propósitos de la presente invención, los adjuntos ilustrados con carácter no limitativo en lo sucesivo resultan adecuados para su utilización en las composiciones de limpieza instantánea. En algunas formas de realización, estos adjuntos se incorporan, por ejemplo, para potenciar la eficacia de limpieza o para contribuir a la misma, para el tratamiento del sustrato que se vaya a limpiar o para modificar la apariencia de la composición de limpieza, como es el caso de los perfumes, los colorantes, los tintes o similares. Se entiende que dichos adjuntos son adicionales a los polipéptidos de serina proteasa de la presente invención. La naturaleza concreta de estos componentes adicionales, así como los niveles de incorporación de los mismos, dependerá de la forma física de la composición y de la naturaleza de la operación de limpieza para la cual se vaya a utilizar. Entre los materiales adjuntos adecuados se incluyen, aunque sin carácter limitativo, catalizadores de blanqueo, otras enzimas, sistemas estabilizadores de enzimas, quelantes, abrillantadores ópticos, polímeros de liberación de suciedad, agentes de transferencia de tintes, dispersantes, supresores de jabonaduras, tintes, perfumes, colorantes, sales de relleno, fotoactivadores, fluorescentes, acondicionadores de tejidos, tensioactivos hidrolizables, conservantes, antioxidantes, agentes contra el encogimiento, agentes contra la formación de arrugas, germicidas, fungicidas, motas de color, agentes para el cuidado de la plata, contra la pérdida de lustre y/o contra la corrosión, fuentes de alcalinidad, agentes solubilizantes, portadores, coadyuvantes de elaboración, pigmentos y agentes de control del pH, tensioactivos, mejoradores, agentes quelantes, agentes inhibidores de la transferencia de tintes, coadyuvantes de deposición, dispersantes, enzimas adicionales y estabilizadores de enzimas, materiales catalíticos, activadores de blanqueo, potenciadores de blanqueo, peróxido de hidrógeno, fuentes de peróxido de hidrógeno, perácidos preformados, agentes dispersantes poliméricos, agentes de eliminación de la suciedad de arcilla/antirredeposición, abrillantadores, supresores de jabonaduras, tintes, perfumes, agentes elastificantes de la estructura, suavizantes de tejidos, portadores, hidrótopos, coadyuvantes de elaboración y/o pigmentos. Además de la descripción que se muestra más adelante, también se encuentran ejemplos adecuados de dichos otros adjuntos y niveles de uso en las patentes estadounidenses n.os 5,576,282, 6,306,812, 6,326,348, 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. En las formas de realización en las que los materiales adjuntos de limpieza no son compatibles con los polipéptidos de serina proteasa de la presente invención en las composiciones de limpieza, se utilizan métodos adecuados para mantener separados los materiales de limpieza adjuntos y la(s) proteasa(s) (es decir, que no estén en contacto entre sí) hasta que la combinación de los dos componentes sea apropiada. Dichos métodos de separación incluyen cualquier método adecuado conocido en la técnica (p. ej., cápsulas, encapsulación, comprimidos, separación física, etc.). Los ingredientes adjuntos mencionados anteriormente pueden constituir el resto de las composiciones de limpieza de la presente invención.

[0102] Las composiciones de limpieza de la presente invención se emplean ventajosamente, por ejemplo, en aplicaciones de lavado de ropa, aplicaciones de limpieza de superficies duras, aplicaciones lavavajillas, incluyendo de lavado de vajilla automático y manual, así como aplicaciones cosméticas, como de limpieza de dentaduras postizas, dientes, cabello y piel. Las enzimas de la presente invención resultan adecuadas también para su uso en aplicaciones de limpieza de lentes de contacto y desbridamiento de heridas. Además, a causa de las ventajas únicas del aumento de eficacia en soluciones de temperaturas inferiores, las enzimas de la presente invención resultan adecuadas idealmente para aplicaciones de lavado de ropa. Asimismo, las enzimas de la presente invención se utilizan en composiciones granuladas y líquidas.

[0103] Los polipéptidos de serina proteasa de la presente invención también se utilizan en productos aditivos de limpieza. En algunas formas de realización, se pueden utilizar aplicaciones de limpieza de solución a baja temperatura. En algunas formas de realización, la presente invención proporciona productos aditivos de limpieza que incluyen al menos una enzima de la presente invención que resulta adecuada idealmente para su inclusión en un proceso de lavado cuando se desee una eficacia de blanqueo adicional. Dichos casos incluyen, aunque sin carácter limitativo, aplicaciones de limpieza de solución a baja temperatura. En algunas formas de realización, el producto aditivo está en su forma más simple, una o más proteasas. En algunas formas de realización, el aditivo se envasa en forma galénica para su adición en un proceso de limpieza. En algunas formas de realización, el aditivo se envasa en forma galénica para su adición en un proceso de limpieza en el que se emplee una fuente de peroxígeno y se desee un aumento de la eficacia de blanqueo. Cualquier unidad monodosis adecuada se puede utilizar con la presente invención, incluyendo, aunque sin carácter limitativo, pastillas, comprimidos,

cápsulas u otras unidades monodosis, como polvos o líquidos ya medidos. En algunas formas de realización, se incluye(n) un(os) material(es) de relleno(s) y/o portador(es) para aumentar el volumen de dichas composiciones. Entre los materiales de relleno o portadores adecuados se incluyen, aunque sin carácter limitativo, diversas sales de sulfato, carbonato y silicato, así como talco, arcilla y similares. Entre los materiales de relleno o portadores adecuados para composiciones líquidas se incluyen, aunque sin carácter limitativo, agua o alcoholes primarios y secundarios de bajo peso molecular, incluyendo polioles y dioles. Entre los ejemplos de dichos alcoholes se incluyen, aunque sin carácter limitativo, metanol, etanol, propanol e isopropanol. En algunas formas de realización, las composiciones contienen de aproximadamente un 5 % a aproximadamente un 90 % de dichos materiales. Los rellenos ácidos se utilizan para reducir el pH. Como alternativa, en algunas formas de realización, el aditivo de limpieza incluye ingredientes adjuntos, como se describe de forma más completa más adelante.

[0104] Las presentes composiciones de limpieza y aditivos de limpieza precisan una cantidad efectiva de al menos uno de los polipéptidos de serina proteasa expuestos en la invención, solo o combinado con otras proteasas y/o enzimas adicionales. El nivel necesario de enzima se logra mediante la adición de uno o más polipéptidos de serina proteasa de la presente invención. Normalmente, las presentes composiciones de limpieza comprenden al menos aproximadamente un 0,0001 de porcentaje en peso, de aproximadamente un 0,0001 a aproximadamente 10, de aproximadamente un 0,001 a aproximadamente 1, o de aproximadamente un 0,01 a aproximadamente un 0,1 de porcentaje en peso de al menos uno de los polipéptidos de serina proteasa de la presente invención.

[0105] Las composiciones de limpieza del presente documento se formulan normalmente de modo que, durante su uso en operaciones de limpieza acuosas, el agua de lavado presentará un pH de aproximadamente 4,0 a aproximadamente 11,5, o incluso de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 11,5 o incluso de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 8,0, o incluso de aproximadamente 7,5 a aproximadamente 10,5. Las formulaciones de producto líquido se formulan normalmente para presentar un pH de aproximadamente 3,0 a aproximadamente 9,0, o incluso de aproximadamente 3 a aproximadamente 5. Los productos de lavado para la ropa granulados se formulan normalmente para presentar un pH de aproximadamente 9 a aproximadamente 11. En algunas formas de realización, las composiciones de limpieza de la presente invención se pueden formular para presentar un pH alcalino en condiciones de lavado tal como un pH de aproximadamente 8,0 a aproximadamente 12,0, o de aproximadamente 8,5 a aproximadamente 11,0, o de aproximadamente 9,0 a aproximadamente 11,0. En algunas formas de realización, las composiciones de limpieza de la presente invención se pueden formular para presentar un pH neutro en condiciones de lavado tal como un pH de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 8,0, o de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 8,0, o de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 8,0, o de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 7,5. En algunas formas de realización, se pueden medir las condiciones de pH neutro cuando la composición de limpieza se disuelva 1:100 (peso:peso) en agua desionizada a 20 °C, medida utilizando un medidor de pH convencional. Las técnicas para controlar el pH en los niveles de uso recomendados incluyen el uso de tampones, álcalis, ácidos, etc., y resultan muy conocidas para los expertos en la materia.

[0106] En algunas formas de realización, cuando el/los polipéptido(s) de serina proteasa se emplea(n) en una composición granulada o líquida, se desea que el polipéptido de serina proteasa se encuentre en forma de partícula encapsulada para proteger al polipéptido de serina proteasa frente a otros componentes de la composición granulada durante su almacenamiento. Además, la encapsulación es también un medio para controlar la disponibilidad del polipéptido de serina proteasa durante el proceso de limpieza. En algunas formas de realización, la encapsulación potencia la eficacia del/de los polipéptido(s) de serina proteasa y/o enzimas adicionales. En este sentido, los polipéptidos de serina proteasa de la presente invención se encapsulan con cualquier material de encapsulación adecuado que se conozca en la técnica. En algunas formas de realización, el material de encapsulación normalmente encapsula al menos parte del/de los polipéptido(s) de serina proteasa de la presente invención. Normalmente, el material de encapsulación es hidrosoluble y/o dispersable en agua. En algunas formas de realización, el material de encapsulación posee una temperatura de transición vítrea (Tg) de 0 °C o superior. La temperatura de transición vítrea se describe con mayor detalle en el documento WO 97/11151. El material de encapsulación se suele seleccionar de entre el grupo que consiste en carbohidratos, gomas naturales o sintéticas, quitina, quitosano, celulosa y derivados celulósicos, silicatos, fosfatos, boratos, alcohol de polivinilo, polietilenglicol, ceras de parafina y combinaciones de estos. Cuando el material de encapsulación 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 encapsulación es un almidón (véanse, p. ej., EP 0 922 499; US 4,977,252; US 5,354,559 y US 5,935,826). En algunas formas de realización, el material de encapsulación 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).

[0107] Existen varias condiciones de lavado, entre las que se incluyen formulaciones detergentes, volúmenes de agua de lavado, temperaturas del agua de lavado y extensiones de tiempo de lavado variables, a las que se exponen las proteasas empleadas en el lavado. Un sistema de baja concentración de detergente incluye

detergentes en los que menos de aproximadamente 800 ppm de los componentes detergentes se encuentran presentes en el agua de lavado. Una concentración de detergente media incluye detergentes en los que entre aproximadamente 800 ppm y aproximadamente 2000 ppm de los componentes detergentes están presentes en el agua de lavado. Un sistema de alta concentración de detergente incluye detergentes en los que más de aproximadamente 2000 ppm de los componentes detergentes se encuentran presentes en el agua de lavado. En algunas formas de realización, el «lavado en agua fría» de la presente invención utiliza «detergente para agua fría» adecuado para un lavado 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 cualquier otra combinación comprendida en el rango de aproximadamente 15 °C a aproximadamente 35 °C, y todos los rangos que se encuentren entre 10 °C y 40 °C.

[0108] Distintas zonas geográficas presentan normalmente distintas durezas del agua. La dureza del agua se suele describir en términos de granos por galón de Ca^{2+}/Mg^{2+} mezclados. La dureza es una medida de la cantidad de calcio (Ca^{2+}) y magnesio (Mg^{2+}) en el agua. La mayoría del agua en Estados Unidos es dura, aunque el grado de dureza varía. El agua que es de moderadamente dura (60-120 ppm) a dura (121-181 ppm) presenta de 60 a 181 partes por millón.

Tabla I. Dureza del 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

[0109] Por consiguiente, en algunas formas de realización, la presente invención proporciona polipéptidos de serina proteasa que muestran una eficacia de lavado sorprendente 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, los polipéptidos de serina proteasa de la presente invención son comparables en cuanto a eficacia de lavado a otros polipéptidos de serina proteasa. En algunas formas de realización de la presente invención, los polipéptidos de serina proteasa proporcionados en el presente documento muestran una mejor estabilidad oxidativa, una estabilidad térmica potenciada, capacidades de limpieza mejoradas en varias condiciones y/o una mayor estabilidad quelante. Además, los polipéptidos de serina proteasa de la presente invención se utilizan en composiciones de limpieza que no incluyen detergentes, de nuevo por sí solos o combinados con mejoradores y estabilizadores.

[0110] En algunas formas de realización de la presente invención, las composiciones de limpieza comprenden al menos un polipéptido de serina proteasa de la presente invención a un nivel de aproximadamente un 0,00001 % hasta aproximadamente un 10 % en peso de la composición, comprendiendo el resto (p. ej., de aproximadamente un 99,999 % a aproximadamente un 90,0 %) materiales de limpieza adjuntos 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 un polipéptido de serina 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, 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) de materiales de limpieza adjuntos.

[0111] En algunas formas de realización, las composiciones de limpieza de la presente invención comprenden una o varias enzimas de detergente adicionales que proporcionan beneficios en cuanto a la eficacia de limpieza y/o al cuidado de tejidos y/o al lavado de vajilla. Entre los ejemplos de enzimas adecuadas se incluyen, aunque sin carácter limitativo, aciltransferasas, alfa-amilasas, beta-amilasas, alfa-galactosidasas, arabinosidasas, arilesterasas, beta-galactosidasas, carragenasas, catalasas, celobiohidrolasas, celulasas, condroitinasas, cutinasas, endo-beta-1,4-glucanasas, endo-beta-mananasas, esterasas, exomananasas, galactanasas, glucoamilasas, hemicelulasas, hialuronidasas, queratinasas, lacasas, lactasas, ligninasas, lipasas, lipoxigenasas, mananasas, oxidasas, pectato liasas, pectina acetilesterasas, pectinasas, pentosanasas, peroxidasas, fenoloxidasas, fosfatasas, fosfolipasas, fitasas, poligalacturonasas, proteasas, pululanasas, reductasas, ramnogalacturonasas, beta-glucanasas, tanasas, transglutaminasas, xilano acetilesterasas, xilanasas,

xiloglucanasas y xilosidasas, o cualquier combinación o mezcla de las mismas. En algunas formas de realización, se utiliza una combinación de enzimas (es decir, un «cóctel») que comprende enzimas aplicables convencionales como proteasa, lipasa, cutinasa y/o celulasa junto con amilasa.

[0112] Además de los polipéptidos de serina proteasa expuestos 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 modificados química o genéticamente. 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 las subtilisinas, especialmente las derivadas de *Bacillus* (p. ej., subtilisina, *lentus*, *amyloliquefaciens*, subtilisina Carlsberg, subtilisina 309, subtilisina 147 y subtilisina 168). Otros ejemplos 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, la 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 disponibles comercialmente que se pueden utilizar en la presente invención incluyen, aunque sin carácter limitativo, MAXATASE®, MAXACAL™, MAXAPEM™, OPTICLEAN®, OPTIMASE®, PROPERASE®, PURAFECT®, PURAFECT® OXP, PURAMAX™, EXCELLASE™, proteasas PREFERENZ™ (p. ej., P100, P110, P280), proteasas EFFECTENZ™ (p. ej., P1000, P1050, P2000), proteasas EXCELLENZ™ (p. ej., P1000), ULTIMASE® 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. alkalophilus*; Kao Corp., Tokio, Japón). Se describen diversas proteasas en los documentos WO95/23221, WO 92/21760, WO 09/149200, WO 09/149144, WO 09/149145, WO 11/072099, WO 10/056640, WO 10/056653, WO 11/140364, WO 12/151534, publicación de patente estadounidense n.º 2008/0090747, y en los documentos de patente estadounidense n.º 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, 6,482,628, 8,530,219, y en otras varias patentes. En algunas formas de realización adicionales, se pueden utilizar metaloproteasas en la presente invención, incluyendo, aunque sin carácter limitativo, las metaloproteasas descritas en los documentos WO1999014341, WO1999033960, WO1999014342, WO1999034003, WO2007044993, WO2009058303, WO2009058661, WO2014194032, WO2014194034 y WO2014194054. Entre los ejemplos de metaloproteasas se incluye nprE, la forma recombinante de metaloproteasa neutra expresada en *B. subtilis* (véase, p. ej., WO 07/044993), y PMN, la metaloproteasa neutra purificada de *B. amyloliquefacients*.

[0113] Además, se puede utilizar cualquier lipasa adecuada en la presente invención. Entre las lipasas adecuadas se incluyen, aunque sin carácter limitativo, las de origen bacteriano o fúngico. Los mutantes modificados genéticamente o químicamente están abarcados en la presente invención. Entre los ejemplos de lipasas útiles se incluye la lipasa de *Humicola lanuginosa* (véase, p. ej., EP 258 068 y EP 305 216), la lipasa de *Rhizomucor miehei* (véase, p. ej., EP 238 023), la 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), las lipasas de *Pseudomonas*, tales como la lipasa de *P. alcaligenes* y la lipasa de *P. pseudoalcaligenes* (véase, p. ej., EP 218 272), la lipasa de *P. cepacia* (véase, p. ej., EP 331 376), la lipasa de *P. stutzeri* (véase, p. ej., GB 1,372,034), la lipasa de *P. fluorescens*, la lipasa de *Bacillus* (p. ej., la lipasa de *B. subtilis* [Dartois *et al*., Biochem. Biophys. Acta 1131:253-260 [1993]); la lipasa de *B. stearothermophilus* [véase, p. ej., JP 64/744992]; y la lipasa de *B. pumilus* [véase, p. ej., WO 91/16422]).

[0114] Asimismo, se puede utilizar un número de lipasas clonadas en algunas formas de realización de la presente invención, incluyendo, aunque sin carácter limitativo, la lipasa de *Penicillium camembertii* (véase Yamaguchi *et al*., Gene 103:61-67 [1991]), la lipasa de *Geotricum candidum* (véase Schimada *et al*., J. Biochem., 106:383-388 [1989]), y diversas lipasas de *Rhizopus,* tales como la 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 la lipasa de *R. oryzae*.

[0115] Otros tipos de enzimas polipeptídicas lipasas, tales como las cutinasas, se pueden utilizar en algunas formas de realización de la presente invención, incluyendo, aunque sin carácter limitativo, la cutinasa derivada de *Pseudomonas mendocina* (véase WO 88/09367), y la cutinasa derivada de *Fusarium solani pisi* (véase WO 90/09446).

[0116] Entre las lipasas adicionales adecuadas se incluyen lipasas como M1 LIPASE™, LUMA FAST™ y LIPOMAX™ (Genencor); LIPEX®, LIPOLASE® y LIPOLASE® ULTRA (Novozymes); y LIPASE P™ «Amano» (Amano Pharmaceutical Co. Ltd., Japón).

[0117] En algunas formas de realización de la presente invención, las composiciones de limpieza de la presente invención comprenden además lipasas a un nivel de aproximadamente un 0,00001 % a aproximadamente un 10 % de lipasa adicional en peso de la composición, y el resto de materiales de limpieza adjuntos en peso de la composición. En otras formas de realización de la presente invención, las composiciones de limpieza de la presente invención también comprenden lipasas 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 % de lipasa en peso de la composición.

[0118] En algunas formas de realización de la presente invención, se puede utilizar cualquier amilasa adecuada en la presente invención. En algunas formas de realización, se puede utilizar también cualquier amilasa (por ejemplo, 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. Se incluyen mutantes genética o químicamente modificados en algunas formas de realización. Entre las amilasas que se pueden utilizar en la presente invención se incluyen, aunque sin carácter limitativo, las α-amilasas obtenidas de *B. licheniformis* (véase, p. ej., el documento GB 1,296,839). Las amilasas adicionales adecuadas incluyen las que se encuentran en los documentos WO9510603, WO9526397, WO9623874, WO9623873, WO9741213, WO9919467, WO0060060, WO0029560, WO9923211, WO9946399, WO0060058, WO0060059, WO9942567, WO0114532, WO02092797, WO0166712, WO0188107, WO0196537, WO0210355, WO9402597, WO0231124, WO9943793, WO9943794, WO2004113551, WO2005001064, WO2005003311, WO0164852, WO2006063594, WO2006066594, WO2006066596, WO2006012899, WO2008092919, WO2008000825, WO2005018336, WO2005066338, WO2009140504, WO2005019443, WO2010091221, WO2010088447, WO0134784, WO2006012902, WO2006031554, WO2006136161, WO2008101894, WO2010059413, WO2011098531, WO2011080352, WO2011080353, WO2011080354, WO2011082425, WO2011082429, WO2011076123, WO2011087836, WO2011076897, WO94183314, WO9535382, WO9909183, WO9826078, WO9902702, WO9743424, WO9929876, WO9100353, WO9605295, WO9630481, WO9710342, WO2008088493, WO2009149419, WO2009061381, WO2009100102, WO2010104675, WO2010117511, y WO2010115021. Entre las amilasas disponibles en el mercado que se pueden utilizar en la presente invención se incluyen, sin carácter limitativo, DURAMYL®, TERMAMYL®, FUNGAMYL®, STAINZYME®, STAINZYME PLUS®, STAINZYME ULTRA® y BAN™ (Novozymes), así como POWERASE™, RAPIDASE® y MAXAMYL® P (Genencor).

[0119] En algunas formas de realización de la presente invención, las composiciones de limpieza de la presente invención comprenden, además, amilasas a un nivel de aproximadamente un 0,00001 % a 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 también comprenden amilasas 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 % de amilasa en peso de la composición.

[0120] En algunas formas de realización adicionales, 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, aquellas de origen bacteriano o fúngico. Se incluyen mutantes química o genéticamente modificados en algunas formas de realización. Las celulasas adecuadas 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 beneficios de cuidado del color (véase, p. ej., el documento EP 0 495 257). Entre las celulasas disponibles en el mercado que se pueden utilizar en la presente se incluyen, aunque sin carácter limitativo, CELLUZYME®, CAREZYME® (Novozymes), REVITALENZ™ 100 (Danisco US Inc) y KAC-500(B)™ (Kao Corporation). En algunas formas de realización, las celulasas se incorporan como partes o fragmentos de celulasas maduras naturales o variantes de celulasas, donde se deleciona una parte del N-terminal (véase, p. ej., la patente estadounidense n.º 5,874,276). Entre las celulasas adicionales adecuadas se incluyen las que se indican en los documentos WO2005054475, WO2005056787, la patente estadounidense n.º 7,449,318 y la patente estadounidense 7,833,773. En algunas formas de realización, las composiciones de limpieza de la presente invención comprenden, además, celulasas a un nivel de aproximadamente un 0,00001 % a aproximadamente un 10 % de celulasa adicional en peso de la composición, y el resto de materiales de limpieza adjuntos en peso de la composición. En algunas otras formas de realización de la presente invención, las composiciones de limpieza de la presente invención también comprenden celulasas 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 % de celulasa en peso de la composición.

[0121] 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. Se incluyen mutantes genética o químicamente modificados en algunas formas de realización. 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). Entre las mananasas disponibles comercialmente que se pueden utilizar en la presente invención se incluyen, aunque sin carácter limitativo, MANNASTAR®, PURABRITE™ y MANNAWAY®. En algunas formas de realización, las composiciones de limpieza de la presente invención comprenden, además, mananasas a un nivel de aproximadamente un 0,00001 % a aproximadamente un 10 % de mananasa adicional en peso de la composición, y el resto de materiales de limpieza adjuntos en peso de la composición. En algunas formas de realización de la presente invención, las composiciones de limpieza de la presente invención también

comprenden mananasas 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 % de mananasa en peso de la composición.

[0122] 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 lavan juntos en una solución de lavado), preferiblemente junto con un agente potenciador (véanse, p. ej., los documentos 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. Se incluyen mutantes química o genéticamente modificados en algunas formas de realización. En algunas formas de realización, las composiciones de limpieza de la presente invención comprenden, además, enzimas oxidasas y/o peroxidasas a un nivel de aproximadamente un 0,00001 % a aproximadamente un 10 % de oxidasa y/o peroxidasa adicional en peso de la composición, y el resto de materiales de limpieza adjuntos en peso de la composición. En algunas otras formas de realización de la presente invención, las composiciones de limpieza de la presente invención también comprenden enzimas oxidasas y/o peroxidasas 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 % de enzimas oxidasas y/o peroxidasas en peso de la composición.

[0123] En algunas formas de realización, se utilizan enzimas adicionales, incluyendo, aunque sin carácter limitativo, perhidrolasas (véase, p. ej., WO2005/056782, WO2007106293, WO2008063400, WO2008106214 y WO2008106215). Además, en algunas formas de realización, el presente documento abarca mezclas de las enzimas mencionadas anteriormente, en concreto una o más proteasas, amilasas, lipasas, mananasas, y/o al menos una celulasa adicional. De hecho, se contempla que se podrán utilizar varias mezclas de estas enzimas en la presente invención. También se contempla que los niveles variables del/de los polipéptido(s) de serina proteasa y una o más enzimas adicionales pueden variar de forma independiente hasta aproximadamente un 10 %, constituyendo el resto de la composición de limpieza materiales adjuntos de limpieza. La selección específica de materiales adjuntos de limpieza se lleva a cabo fácilmente al considerar la superficie, el artículo o el tejido que se vaya a limpiar, y la forma deseada de la composición para las condiciones de limpieza durante su uso (p. ej., mediante el uso del detergente de lavado).

[0124] En algunas formas de realización, se incluye una cantidad efectiva de uno o más polipéptido(s) de serina proteasa proporcionada en el presente documento en composiciones útiles para limpiar varias superficies que necesiten una eliminación de manchas proteicas. Dichas composiciones de limpieza incluyen composiciones de limpieza para aplicaciones tales como la limpieza de superficies duras, tejidos y vajilla. De hecho, en algunas formas de realización, la presente invención proporciona composiciones de limpieza de tejidos, mientras que, en otras formas de realización, la presente invención proporciona composiciones de limpieza que no son para tejidos. Principalmente, la presente invención proporciona también composiciones de limpieza adecuadas para el cuidado personal, incluyendo el cuidado bucal (que incluye dentífricos, pastas de dientes, enjuagues bucales, etc., así como composiciones para la limpieza de dentaduras postizas), y composiciones de limpieza para el cabello y la piel. Se pretende que la presente invención abarque composiciones detergentes en cualquier forma (esto es, líquidas, granuladas, en barra, semisólidas, en gel, en emulsiones, en pastillas, en cápsulas, etc.).

[0125] A modo de ejemplo, varias composiciones de limpieza donde se utilizan los polipéptidos de serina proteasa de la presente invención se describen con más detalle más adelante. En algunas formas de realización en las que las composiciones de limpieza de la presente invención están formuladas 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 varios materiales adjuntos de limpieza seleccionados preferiblemente de entre compuestos poliméricos orgánicos, agentes blanqueantes, enzimas adicionales, supresores de jabonaduras, 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 también contienen agentes suavizantes (esto es, como materiales de limpieza adjuntos adicionales). Las composiciones de la presente invención también utilizan productos detergentes aditivos en forma líquida o sólida. Dichos productos aditivos tienen por objeto complementar y/o potenciar la eficacia de las composiciones detergentes convencionales y se pueden añadir en cualquier fase del proceso de limpieza. En algunas formas de realización, la densidad de las composiciones detergentes para ropa varía desde aproximadamente 400 hasta aproximadamente 1200 g/litro, mientras que, en otras formas de realización, varía desde aproximadamente 500 hasta aproximadamente 950 g/litro de composición medida a 20 °C.

[0126] En formas de realización formuladas como composiciones para su uso en métodos de lavado de vajilla 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 poliméricos orgánicos,

agentes potenciadores de jabonaduras, iones metálicos del grupo II, disolventes, hidrótropos y enzimas adicionales.

[0127] En algunas formas de realización, varias composiciones de limpieza, tales como las que se proporcionan en la patente estadounidense n.º 6,605,458, se pueden utilizar con los polipéptidos de serina proteasa de la presente invención. Por consiguiente, en algunas formas de realización, las composiciones que comprenden al menos un polipéptido de serina 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 color; en otras formas de realización, la composición es una composición granulada de limpieza para tejidos que proporciona suavidad a través de la capacidad de lavado; en formas de realización adicionales, la composición es una composición de limpieza líquida y concentrada para tejidos. En algunas formas de realización, las composiciones que comprenden al menos un polipéptido de serina proteasa de la presente invención son composiciones de limpieza para tejidos como las que se describen en las patentes estadounidenses n.º 6,610,642 y 6,376,450. Asimismo, los polipéptidos de serina proteasa de la presente invención se pueden utilizar en composiciones detergentes granuladas para ropa, de utilidad concreta con las condiciones de lavado de Europa o Japón (véase, p. ej., la patente estadounidense n.º 6,610,642).

[0128] En algunas formas de realización alternativas, la presente invención da a conocer composiciones de limpieza para superficies duras que comprenden al menos un polipéptido de serina proteasa proporcionado en el presente documento. Así, en algunas formas de realización, las composiciones que comprenden al menos un polipéptido de serina proteasa de la presente invención son una composición de limpieza de superficies duras como las descritas en las patentes estadounidenses n.º 6,610,642, 6,376,450 y 6,376,450.

[0129] En otras formas de realización adicionales, la presente invención proporciona composiciones lavavajillas que comprenden al menos un polipéptido de serina proteasa expuesto en el presente documento. Así, en algunas formas de realización, las composiciones que comprenden al menos un polipéptido de serina proteasa de la presente invención son una composición de limpieza de superficies duras, tales como las de las patentes estadounidenses n.º 6,610,642 y 6,376,450. En algunas otras formas de realización adicionales, la presente invención da a conocer composiciones lavavajillas que comprenden al menos un polipéptido de serina proteasa expuesto en el presente documento. En algunas otras formas de realización, las composiciones que comprenden al menos un polipéptido de serina proteasa de la presente invención comprenden composiciones de cuidado bucal, tales como las que se describen en las patentes estadounidenses n.º 6,376,450 y 6,376,450. Las formulaciones y descripciones de los compuestos y materiales de limpieza adjuntos contenidos en las patentes estadounidenses mencionadas anteriormente n.º 6,376,450, 6,605,458, 6,605,458, y 6,610,642 se pueden utilizar con los polipéptidos de serina proteasa expuestos en el presente documento.

[0130] Las composiciones de limpieza de la presente invención se formulan en cualquier forma adecuada y se preparan mediante cualquier proceso elegido por el creador de la fórmula (véanse, p. ej., las patentes estadounidenses n.º 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). Cuando se desee una composición de limpieza con un pH bajo, el pH de dicha composición se ajustará mediante la adición de un material como monoetanolamina o un material ácido como HCl. En algunas formas de realización, las composiciones de limpieza de acuerdo con la presente invención comprenden una partícula acidificante o un mejorador aminocarboxílico. Entre los ejemplos de un mejorador aminocarboxílico se incluyen ácidos aminocarboxílicos, sales y derivados de los mismos. En alguna forma de realización, el mejorador aminocarboxílico es un mejorador aminopolicarboxílico, tal como ácido glicina-N,N-diacético o derivado de la fórmula general MOOC-CHR-N $(CH_2COOM)_2$ donde R es alquilo C_{1-12} y M es metal alcalino. En algunas formas de realización, el mejorador aminocarboxílico puede ser ácido metilglicina diacético (MGDA), GLDA (ácido glutámico-N,N-diacético), ácido iminodisuccínico (IDS), carboximetilinulina y sales y derivados de estos, ácido aspártico-N-ácido monoacético (ASMA), ácido aspártico-N,N-ácido diacético (ASDA), ácido aspártico-N-ácido monopropiónico (ASMP), ácido iminodisuccínico (IDA), ácido N-(2-sulfometil) aspártico (SMAS), ácido N-(2-sulfoetil) aspártico (SEAS), ácido N-(2-sulfometil)glutámico (SMGL), ácido N-(2-sulfoetil) glutámico (SEGL), IDS (ácido iminodiacético) y sales y derivados de los mismos, tales como ácido N-metiliminodiacético (MIDA), ácido alfa-alanina-N,N-diacético (alfa-ALDA), ácido serina-N,N-diacético (SEDA), ácido isoserina-N,N-diacético (ISDA), ácido fenilalanina-N,N-diacético (PHDA), ácido antranílico-N,N-ácido diacético (ANDA), ácido sulfanílico-N,N-ácido diacético (SLDA), taurina-N,N-ácido diacético (TUDA) y ácido sulfometil-N,N-diacético (SMDA) y sales de metales alcalinos y derivados de estos. En algunas formas de realización, la partícula acidificante posee un tamaño geométrico medio de partícula de aproximadamente 400 µ a aproximadamente 1200 µ y una densidad aparente de al menos 550 g/l. En algunas formas de realización, la partícula acidifcante comprende al menos aproximadamente un 5 % del mejorador.

[0131] En algunas formas de realización, la partícula acidificante puede comprender cualquier ácido, incluyendo ácidos orgánicos y ácidos minerales. Los ácidos orgánicos pueden poseer uno o dos carboxilos y, en algunos casos, hasta 15 carbonos, especialmente hasta 10 carbonos, tales como ácido fórmico, acético, propiónico, cáprico, oxálico, succínico, adípico, maleico, fumárico, sebácico, málico, láctico, glicólico, tartárico y glioxílico. En algunas formas de realización, el ácido es ácido cítrico. Los ácidos minerales incluyen ácido clorhídrico y

sulfúrico. En algunos casos, la partícula acidificante de la invención es una partícula muy activa que comprende un nivel elevado de mejorador aminocarboxílico. Se ha descubierto que el ácido sulfúrico contribuye además a la estabilidad de la partícula final.

[0132] En algunas formas de realización, las composiciones de limpieza de acuerdo con 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 anfolíticos, tensioactivos zwitteriónicos, tensioactivos no iónicos semipolares y mezclas de los mismos. En algunas formas de realización, el tensioactivo está presente a un nivel de aproximadamente un 0,1 % a aproximadamente un 60 %, mientras que, en formas de realización alternativas, el nivel es de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 50 %, mientras que, en otras formas de realización adicionales, el nivel es de aproximadamente un 5 % a aproximadamente un 40 % en peso de la composición de limpieza.

[0133] En algunas formas de realización, las composiciones de limpieza de la presente invención comprenden uno o varios mejoradores o sistemas mejoradores de detergentes. 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, las sales de metales alcalinos, amonio y alcanolamonio de polifosfatos, silicatos de metales alcalinos, carbonatos de metales alcalinotérreos y alcalinos, aluminosilicatos, compuestos de policarboxilato, hidroxipolicarboxilatos de éter, copolímeros de anhídrido maleico con etileno o vinilmetiléter, ácido 1,3,5-trihidroxi benceno-2, 4, 6-trisulfónico y ácido carboximetiloxisuccínico, las diversas sales de metales alcalinos, de amonio y de amonio sustituido de ácidos poliacéticos, como el ácido tetraacético de etilendiamina y el ácido nitrilotriacético, así como policarboxilatos, tales como el ácido melítico, ácido succínico, ácido cítrico, ácido oxidisuccínico, ácido polimaleico, ácido de benceno 1,3,5-tricarboxílico, ácido carboximetiloxisuccínico y sales solubles de los mismos. De hecho, se contempla que se podrá utilizar cualquier mejorador adecuado en diversas formas de realización de la presente invención.

[0134] En algunas formas de realización, los mejoradores forman complejos hidrosolubles de iones de dureza (p. ej., mejoradores secuestrantes), tales como citratos y polifosfatos (p. ej., tripolifosfato de sodio y tripolifosfato de sodio hexahidratado, tripolifosfato de potasio, y tripolifosfato con mezcla de sodio y potasio, etc.). Se contempla que se podrá utilizar cualquier mejorador adecuado en la presente invención, incluyendo los que se conocen en la técnica (véase, p. ej., EP 2 100 949).

[0135] En algunas formas de realización, los mejoradores para su uso en el presente documento incluyen mejoradores de fosfato y mejoradores sin fosfato. En algunas formas de realización, el mejorador es un mejorador de fosfato. En algunas formas de realización, el mejorador es un mejorador sin fosfato. En caso de que estén presentes, los mejoradores se utilizan en un nivel de aproximadamente un 0,1 % a un 80 %, o de aproximadamente un 5 a un 60 %, o de un 10 a un 50 % en peso de la composición. En algunas formas de realización, el producto comprende una mezcla de mejoradores con fosfato y sin fosfato. Entre los mejoradores con fosfato adecuados se incluyen monofosfatos, difosfatos, tripolifosfatos o polifosfatos oligoméricos, incluyendo las sales de metales alcalinos de estos compuestos, que incluyen las sales de sodio. En algunas formas de realización, un mejorador puede ser tripolifosfato de sodio (STPP). Asimismo, la composición puede comprender carbonato y/o citrato, preferiblemente citrato que ayude a lograr una composición de pH neutro de la invención. Otros mejoradores sin fosfato adecuados incluyen homopolímeros y copolímeros de ácidos policarboxílicos y sus sales parcial o completamente neutralizadas, ácidos policarboxílicos monoméricos y ácidos hidroxicarboxílicos y sus sales. En algunas formas de realización, las sales de los compuestos mencionados anteriormente incluyen las sales de amonio y/o de metales alcalinos, esto es, las sales de litio, sodio y potasio, incluyendo las sales de sodio. Entre los ácidos policarboxílicos adecuados se incluyen ácidos acíclicos, alicíclicos, heterocíclicos y aromáticos carboxílicos, donde, en algunas formas de realización, pueden contener al menos dos grupos carboxilo que, en cada caso, estén separados entre sí mediante, en algunos casos, no más de dos átomos de carbono.

[0136] 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, los agentes quelantes de cobre, hierro y/o manganeso y mezclas de los mismos. En formas de realización en las que se utiliza 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 en cuestión.

[0137] En algunas otras formas de realización adicionales, las composiciones de limpieza expuestas en el presente documento contienen al menos un coadyuvante de deposición. Los coadyuvantes de deposición adecuados incluyen, aunque sin carácter limitativo, polietilenglicol, polipropilenglicol, policarboxilato, polímeros de liberación de suciedad como el ácido politereftálico, arcillas como caolinita, montmorillonita, atapulgita, illita, bentonita, halloysita y mezclas de estas.

[0138] Como se indica en el presente documento, en algunas formas de realización, los agentes de antirredeposición se pueden utilizar en algunas formas de realización de la presente invención. En algunas

formas de realización, se utilizan tensioactivos no iónicos. Por ejemplo, en formas de realización de lavado de vajilla automático, se pueden utilizar tensioactivos no iónicos para fines de modificación de superficies, en concreto para el laminado, para evitar la formación de películas y manchas y para mejorar el brillo. Estos tensioactivos no iónicos también se utilizan para prevenir la redeposición de suciedad. En algunas formas de realización, el agente de antirredeposición es un tensioactivo no iónico según se conoce en la técnica (véase, p. ej., EP 2 100 949). En algunas formas de realización, el tensioactivo no iónico pueden ser tensioactivos no iónicos etoxilados, alcoholes poli(oxialquilados) con recubrimiento epoxi y tensioactivos de óxido de amina.

[0139] En algunas formas de realización, las composiciones de limpieza de la presente invención incluyen uno o más agentes inhibidores de transferencia de tintes. Los agentes inhibidores de transferencia de tintes poliméricos adecuados incluyen, sin carácter limitativo, polímeros de polivinilpirrolidona, polímeros de N-óxido de poliamina, copolímeros de N-vinilpirrolidona y N-vinilimidazol, poliviniloxazolidonas y polivinilimidazoles o mezclas de los mismos. En formas de realización en las que se utilice 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.

[0140] En algunas formas de realización, se incluyen silicatos en las composiciones de la presente invención. En algunas de dichas formas de realización, se utilizan 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 de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 20 %. En algunas formas de realización, los silicatos están presentes a un nivel de aproximadamente un 5 % a aproximadamente un 15 % en peso de la composición.

[0141] En algunas otras formas de realización adicionales, las composiciones de limpieza de la presente invención también contienen dispersantes. Los materiales orgánicos hidrosolubles adecuados incluyen, sin carácter limitativo, los ácidos homopoliméricos o copoliméricos o sus sales, en los que el ácido policarboxílico comprende al menos dos radicales carboxilo separados entre sí por no más de dos átomos de carbono.

[0142] En algunas otras formas de realización, las enzimas utilizadas en las composiciones de limpieza se estabilizan mediante cualquier técnica adecuada. En algunas formas de realización, las enzimas empleadas en el presente documento se estabilizan mediante la presencia de fuentes solubles en agua de iones calcio y/o magnesio en las composiciones finalizadas que aportan dichos iones a las enzimas. En algunas formas de realización, los estabilizadores de enzimas incluyen oligosacáridos, polisacáridos y sales inorgánicas de metales divalentes, incluidos metales alcalinotérreos, tales como sales de calcio, como formiato de calcio. Se contempla que se utilizarán diversas técnicas para la estabilización enzimática en la presente invención. Por ejemplo, en algunas formas de realización, las enzimas empleadas en el presente documento se estabilizan mediante la presencia de fuentes hidrosolubles de iones zinc (II), calcio (II) y/o magnesio (II) en las composiciones acabadas que aportan dichos iones a las enzimas, así como otros iones metálicos (por ejemplo, bario (II), escandio (II), hierro (II), manganeso (II), aluminio (III), estaño (II), cobalto (II), cobre (II), níquel (II) y oxovanadio (IV). Los cloruros y sulfatos también se utilizan 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 utilizan los inhibidores reversibles de proteasas, como los compuestos que contienen boro (p. ej., borato, ácido 4-formil fenil borónico) y/o se puede utilizar un aldehído tripeptídico para mejorar además la estabilidad, según se prefiera.

[0143] En algunas formas de realización, se incluyen blanqueadores, activadores de blanqueo y/o catalizadores de blanqueo en las composiciones de la presente invención. En algunas formas de realización, las composiciones de limpieza de la presente invención comprenden compuesto(s) blanqueador(es) orgánico(s) y/o inorgánico(s). Entre los blanqueadores inorgánicos se incluyen, sin carácter limitativo, las sales perhidratadas (p. ej., sales de perborato, percarbonato, perfosfato, persulfato y persilicato). En algunas formas de realización, las sales perhidratadas inorgánicas son sales de metales alcalinos. En algunas formas de realización, se incluyen sales perhidratadas inorgánicas como sólido cristalino, sin protección adicional, aunque, en algunas otras 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).

[0144] En algunas formas de realización, se utilizan activadores de blanqueo en las composiciones de la presente invención. Los activadores de blanqueo son normalmente precursores de perácidos orgánicos que potencian la acción blanqueante durante la limpieza con temperaturas de 60 °C e inferiores. Entre los activadores de blanqueo adecuados para su uso según el presente documento se incluyen compuestos que, en condiciones de perhidrólisis, proporcionan ácidos peroxicarboxílicos alifáticos que poseen preferiblemente de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 átomos de carbono, en concreto de aproximadamente 2 a aproximadamente 4 átomos de carbono y/u, opcionalmente, ácido perbenzoico sustituido. En la técnica se conocen activadores de blanqueo adicionales y se pueden utilizar en la presente invención (véase, p. ej., EP 2 100 949).

[0145] Además, en algunas formas de realización, y según se describe además 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, son de utilidad el triazaciclononano de manganeso y otros complejos

relacionados, así como complejos de cobalto, cobre, manganeso y hierro. Se pueden utilizar catalizadores de blanqueo adicionales (véanse, p. ej., US 4,246,612, 5,227,084, 4,810410, WO 99/06521 y EP 2 100 949).

[0146] En algunas formas de realización, las composiciones de limpieza de la presente invención contienen uno o más complejos metálicos catalíticos. En algunas formas de realización, se utiliza un catalizador de blanqueo que contiene metal. En algunas formas de realización, el catalizador de blanqueo metálico comprende un sistema catalizador que comprende un catión de metal de transición de actividad catalítica de blanqueo definida (por ejemplo, cationes de cobre, hierro, titanio, rutenio, wolframio, molibdeno o manganeso), un catión de metal auxiliar que presenta una actividad catalítica de blanqueo mínima o nula (p. ej., cationes de zinc o de aluminio) y un secuestrante que presenta unas constantes de estabilidad definidas para los cationes metálicos catalíticos y auxiliares, en concreto ácido etilendiaminotetraacético, ácido etilendiaminotetra (metilenfosfónico) y sales hidrosolubles de los mismos (véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 4,430,243). En algunas formas de realización, las composiciones de limpieza de la presente invención se catalizan por medio de un compuesto de manganeso. Dichos compuestos y niveles de uso resultan ampliamente conocidos en la técnica (véase, p. ej., la patente estadounidense n.º 5,576,282). En formas de realización adicionales, los catalizadores blanqueantes de cobalto se utilizan en las composiciones de limpieza de la presente invención. En la técnica, se conocen diversos catalizadores blanqueantes de cobalto (véanse, p. ej., las patentes estadounidenses n.º 5,597,936 y 5,595,967), y se preparan fácilmente mediante procedimientos conocidos.

[0147] En algunas formas de realización adicionales, las composiciones de limpieza de la presente invención incluyen un complejo de metal de transición de un ligando macropolicíclico rígido (MRL). A modo práctico, y no a modo limitativo, en algunas formas de realización, las composiciones y procesos de limpieza proporcionados en la presente invención se ajustan para proporcionar del orden de al menos una parte por cien millones de la especie de MRL activa en el medio de lavado acuoso y, en algunas formas de realización, proporcionan de aproximadamente 0,005 ppm a 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 agua de lavado.

[0148] En algunas formas de realización, los metales de transición en el catalizador de blanqueo instantáneo de metal de transición incluyen, aunque sin carácter limitativo, el manganeso, el hierro y el cromo. Los MRL también incluyen, sin carácter limitativo, ligandos ultrarrígidos especiales que están entrecruzados (p. ej., 5,12-dietil-1,5,8,12-tetraazabiciclo[6.6.2]hexadecano). Los MRL adecuados de metales de transición se preparan fácilmente mediante procedimientos conocidos (véanse, p. ej., WO 2000/32601 y el documento de patente estadounidense n.º 6,225,464).

[0149] En algunas formas de realización, las composiciones de limpieza de la presente invención comprenden agentes para el cuidado de metales. Los agentes para el cuidado de metales se pueden utilizar para prevenir y/o reducir la pérdida de lustre, la corrosión y/o la oxidación de metales, incluidos el aluminio, el acero inoxidable y metales no ferrosos (p. ej., plata y cobre). Entre los agentes adecuados para el cuidado de metales se incluyen los descritos en EP 2 100 949, WO 9426860 y WO 94/26859. En algunas formas de realización, el agente para el cuidado de metales es una sal de zinc. En algunas formas de realización adicionales, 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 para el cuidado de metales.

[0150] En algunas formas de realización, la composición de limpieza es una composición líquida de alta densidad (HDL) que presenta un polipéptido de variante de serina proteasa. El detergente para ropa líquido HDL puede comprender un tensioactivo detersivo (10 % - 40 % peso/peso), incluidos un tensioactivo detersivo aniónico (seleccionado de entre un grupo de cadena lineal o ramificada o aleatoria, alquilsulfatos sustituidos o no sustituidos, alquilsulfonatos, sulfato alcoxilado de alquilo, fosfatos de alquilo, fosfonatos de alquilo, carboxilatos de alquilo, y/o mezclas de estos); y, opcionalmente, un tensioactivo no iónico (seleccionado de un grupo de cadena lineal o ramificada o aleatoria, alcohol alcoxilado de alquilo sustituido o no sustituido, por ejemplo un alcohol etoxilado de alquilo C_8-C_{18} y/o alcoxilatos de alquilfenol C_6-C_{12}), donde, opcionalmente, la relación de peso entre tensioactivo detersivo aniónico (con un índice hidrofílico (HIc) de entre 6,0 y 9) y tensioactivo detersivo no iónico es mayor que 1:1. Entre los tensioactivos detersivos adecuados se incluyen también tensioactivos detersivos catiónicos (seleccionados de un grupo de compuestos de alquilpiridinio, compuestos cuaternarios de alquilamonio, compuestos cuaternarios de alquilfosfonio, compuestos ternarios de alquilsulfonio, y/o mezclas de estos); tensioactivos detersivos zwitteriónicos y/o anfóteros (seleccionados de un grupo de sulfobetaínas de alcanolamina); tensioactivos anfolíticos; tensioactivos semipolares no iónicos y mezclas de estos.

[0151] Opcionalmente, la composición puede comprender un polímero potenciador de la tensioactividad que consista en polímeros desengrasantes alcoxilados anfifílicos (seleccionados de un grupo de polímeros alcoxilados que poseen propiedades hidrofílicas e hidrofóbicas ramificadas, como polialquileniminas alcoxiladas en el intervalo de 0,05 % en peso - 10 % en peso) y/o polímeros de injerto aleatorio (que normalmente comprenden una cadena principal hidrofílica que comprende monómeros seleccionados del grupo que consiste en: ácidos carboxílicos insaturados C_1-C_6, éteres, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres, unidades de azúcar, unidades alcoxi, anhídrido maleico, polialcoholes saturados como glicerol, y mezclas de los mismos; y cadena(s)

lateral(es) hidrofóbica(s) seleccionada(s) del grupo que consiste en: grupo alquilo C_4-C_{25}, polipropileno, polibutileno, éster de vinilo de un ácido monocarboxílico C_1-C_6 saturado, éster alquilo C_1-C_6 de ácido acrílico o metacrílico, y mezclas de los mismos.

[0152] La composición puede comprender polímeros adicionales, como polímeros de liberación de suciedad (incluidos poliésteres con extremos rematados aniónicamente, por ejemplo SRP1, polímeros que comprenden al menos una unidad monomérica seleccionada de entre sacárido, ácido dicarboxílico, poliol y combinaciones de estos, en configuración aleatoria o en bloque, polímeros a base de tereftalato de etileno y copolímeros de los mismos en una configuración aleatoria o en bloque, por ejemplo Repel-o-tex SF, SF-2 y SRP6, Texcare SRA100, SRA300, SRN100, SRN170, SRN240, SRN300 y SRN325, Marloquest SL), polímeros de antirredeposición (de un 0,1 % en peso a un 10 % en peso, incluidos polímeros de carboxilato, tales como polímeros que comprenden al menos un monómero seleccionado de entre ácido acrílico, ácido maleico (o anhídrido maleico), ácido fumárico, ácido itacónico, ácido aconítico, ácido mesacónico, ácido citracónico, ácido metilmalónico, y cualquier mezcla de los mismos, homopolímero de vinilpirrolidona, y/o polietilenglicol, peso molecular en el intervalo de 500 a 100 000 Da); polímero celulósico (incluidos aquellos seleccionados de entre alquilcelulosa, alquil alcoxialquilcelulosa, carboxialquilcelulosa, alquil carboxialquilcelulosa, ejemplos de las cuales incluyen carboximetilcelulosa, metilcelulosa, metilhidroxietilcelulosa, metilcarboximetilcelulosa, y mezclas de las mismas) y carboxilato polimérico (como copolímero aleatorio de maleato/acrilato u homopolímero de poliacrilato).

[0153] La composición puede comprender, además, ácido graso saturado o insaturado, preferiblemente ácido graso C_{12}-C_{24} saturado o insaturado (de un 0 % en peso a un 10 % en peso); coadyuvantes de deposición (ejemplos de los cuales incluyen polisacáridos, preferiblemente polímeros celulósicos, haluros de poli dialil dimetil amonio (DADMAC), y copolímeros de DAD MAC con vinilpirrolidona, acrilamidas, imidazoles, haluros de imidazolinio, y mezclas de los mismos, en configuración aleatoria o en bloque, goma guar catiónica, celulosa catiónica, tal como hidroxietilcelulosa catiónica, almidón catiónico, poliacrilamidas catiónicas, y mezclas de estos.

[0154] La composición puede comprender también agentes inhibidores de transferencia de tintes, ejemplos de los cuales incluyen ftalocianina de manganeso, peroxidasas, polímeros de polivinilpirrolidona, polímeros N-óxido de poliamina, copolímeros de N-vinilpirrolidona y N-vinilimidazol, poliviniloxazolidonas y polivinilimidazoles y/o mezclas de los mismos; agentes quelantes, entre los ejemplos de los cuales se incluye el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido dietilentriaminopentametilenfosfónico (DTPMP), ácido hidroxietano difosfónico (HEDP), ácido etilendiamino N,N'-disuccínico (EDDS), ácido metilglicindiacético (MGDA), ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA), ácido propilendiaminotetraacético (PDT A), 2-hidroxipiridina-N-óxido (HPNO), o ácido metilglicindiacético (MGDA), ácido glutámico N,N-ácido diacético (sal tetrasódica de ácido glutámico N,N-ácido dicarboximetil (GLDA), ácido nitrilotriacético (NTA), ácido 4,5-dihidroxi-m-bencenodisulfónico, ácido cítrico y cualquier sal de los mismos, ácido N-hidroxietiletilendiaminotriacético (HEDTA), ácido trietilentetraminohexaacético (TTHA), ácido N-hidroxietiliminodiacético (HEIDA), dihidroxietilglicina (DHEG), ácido etilendiaminotetrapropiónico (EDTP) y derivados de los mismos.

[0155] Opcionalmente, la composición puede incluir enzimas (por lo general, de aproximadamente un 0,01 % en peso de enzima activa a un 0,5 % en peso de enzima activa), seleccionadas de entre proteasas, amilasas, lipasas, celulasas, colina oxidasas, peroxidasas/oxidasas, pectato liasas, mananasas, cutinasas, lacasas, fosfolipasas, lisofosfolipasas, aciltransferasas, perhidrolasas, arilesterasas y cualquier mezcla de las mismas. La composición puede comprender un estabilizador de enzimas (ejemplos de los cuales incluyen polioles como propilenglicol o glicerol, azúcar o azúcar alcohólico, ácido láctico, inhibidor reversible de proteasas, ácido bórico, o un derivado de ácido bórico, p. ej., un éster de borato aromático, o un derivado de ácido fenilborónico, como el ácido 4-formilfenil borónico).

[0156] La composición puede comprender, además, supresores de jabonaduras a base de silicona o de ácido graso; tintes matizadores, cationes de calcio y de magnesio, ingredientes de señalización visual, antiespumante (de un 0,001 % en peso a aproximadamente un 4,0 % en peso) y/o estructurante/espesante (de un 0,01 % en peso a un 5 % en peso, seleccionado del grupo que consiste en diglicéridos y triglicéridos, diestearato de etilenglicol, celulosa microcristalina, materiales a base de celulosa, celulosa microfibrilada, biopolímeros, goma xantana, goma gellan y mezclas de los mismos).

[0157] La composición se puede encontrar en cualquier forma líquida, por ejemplo, una forma líquida o en gel, o cualquier combinación de las mismas.

[0158] En algunas formas de realización, las composiciones de limpieza de la presente invención se proporcionan en formato monodosis, lo que incluye pastillas, cápsulas, sobres, bolsitas y bolsitas con múltiples compartimentos. En algunas formas de realización, el formato monodosis está diseñado para ofrecer una liberación controlada de los ingredientes que se encuentran en el interior de una bolsita con múltiples compartimentos (u otro formato monodosis). Los formatos monodosis y de liberación controlada adecuados se conocen en la técnica (véase, p. ej., los documentos EP 2 100 949, WO 02/102955, la patente estadounidense n.º 4,765,916 y 4,972,017, y el documento WO 04/111178 para materiales adecuados para su uso en formatos monodosis y de liberación controlada). En algunas formas de realización, el formato monodosis se proporciona en pastillas envueltas con una película hidrosoluble o en bolsitas solubles en agua. Se ofrecen diversos formatos monodosis conocidos en la técnica en los documentos EP 2 100 947 y WO2013/165725.

[0159] En algunas formas de realización, la composición de limpieza es una composición en polvo de alta densidad (HDD, por sus siglas en inglés) que presenta una proteasa polipeptídica de variante de serina proteasa. El detergente para ropa en polvo HDD puede comprender un tensioactivo detersivo, incluidos tensioactivos detersivos aniónicos (p. ej., de cadena lineal o ramificada o aleatoria, sulfatos de alquilo sustituidos o no sustituidos, alquilsulfonatos, sulfato de alquilo alcoxilado, alquilfosfatos, alquilfosfonatos, alquilcarboxilatos y/o mezclas de los mismos), tensioactivo detersivo no iónico (seleccionado de un grupo de cadena lineal o ramificada o aleatoria, alquil etoxilatos C_8-C_{18} sustituidos o no sustituidos, y/o alcoxilatos de alquilfenol C_6-C_{12}), tensioactivos detersivos catiónicos (p. ej., compuestos de alquil piridinio, compuestos de alquilamonio cuaternario, compuestos de alquilfosfonio cuaternario, compuestos de alquilsulfonio ternario, y mezclas de estos), tensioactivos detersivos zwitteriónicos y/o anfóteros (p. ej., sulfobetaínas de alcanolamina), tensioactivos anfolíticos, tensioactivos semipolares no iónicos, y mezclas de estos; mejoradores (mejoradores sin fosfato [por ejemplo, mejoradores de zeolita, ejemplos de los cuales incluyen zeolita A, zeolita X, zeolita P y zeolita MAP en el intervalo de un 0 % en peso a menos de un 10 % en peso], mejoradores de fosfato (p. ej., tripolifosfato de sodio en el intervalo de un 0 % en peso a menos de un 10 % en peso), ácido cítrico, sales de citrato y ácido nitrilotriacético o sal del mismo en el intervalo de menos de un 15 % en peso, sal de silicato (p. ej., silicato de sodio o de potasio o metasilicato de sodio en el intervalo de un 0 % en peso a menos de un 10 % en peso, o silicato estratificado (SKS-6)); sal de carbonato (p. ej., carbonato de sodio y/o bicarbonato de sodio en el intervalo de un 0 % en peso a menos de un 10 % en peso); y agentes de blanqueo (incluidos fotoblanqueadores (p. ej., ftalocianinas de zinc sulfonadas, ftalocianinas de aluminio sulfonadas, tintes de xanteno, y mezclas de estos), activadores de blanqueo hidrofóbicos o hidrofílicos (incluidos, p. ej., dodecanoil oxibenceno sulfonato, decanoil oxibenceno sulfonato, ácido decanoil oxibenzoico o sus sales, 3,5,5-trimetilhexano oxibenceno sulfonato, tetraacetiletilendiamina-TAED, y nonanoiloxibenceno sulfonato-NOBS, *quats* de nitrilo, y mezclas de estos), fuentes de peróxido de hidrógeno (p. ej., sales inorgánicas de perhidrato, ejemplos de las cuales incluyen sal de sodio monohidratada o tetrahidratada de perborato, percarbonato, persulfato, perfosfato, o persilicato), perácidos preformados hidrofílicos y/o hidrofóbicos (p. ej., ácidos y sales percarboxílicos, ácidos y sales percarbónicos, ácidos y sales perimídicos, ácidos y sales peroximonosulfúricos, y mezclas de estos), y/o catalizadores de blanqueo (p. ej., potenciadores del blanqueo de imina (entre los ejemplos de los cuales se incluyen cationes y poliiones de iminio), zwitteriones de iminio, aminas modificadas, óxidos de aminas modificadas, N-sulfonil iminas, N-fosfonil iminas, N-acil iminas, dióxidos de tiadiazol, perfluoroiminas, cetonas de azúcar cíclico, y mezclas de estos, y catalizadores de blanqueo que contienen metal (p. ej., cationes de cobre, hierro, titanio, rutenio, wolframio, molibdeno o manganeso, así como cationes de un metal auxiliar como zinc o aluminio y un secuestrante como ácido etilendiaminotetraacético, etilendiaminotetra (ácido metilenfosfónico), y sales hidrosolubles de estos.

[0160] Preferiblemente, la composición incluye enzimas, por ejemplo, proteasas, amilasas, lipasas, celulasas, colina oxidasas, peroxidasas/oxidasas, pectato liasas, mananasas, cutinasas, lacasas, fosfolipasas, lisofosfolipasas, aciltransferasa, perhidrolasa, arilesterasa, y cualquier mezcla de estas.

[0161] La composición puede comprender, además, ingredientes de detergente adicionales, incluidas microcápsulas de perfume, composición de perfume encapsulada de almidón, agentes matificantes, polímeros adicionales que incluyen polímeros de integridad de tejidos y catiónicos, ingredientes bloqueadores de tintes, agentes suavizantes de tejidos, abrillantadores (por ejemplo, abrillantadores fluorescentes C.I.), agentes floculantes, agentes quelantes, poliaminas alcoxiladas, coadyuvantes de deposición de tejidos y/o ciclodextrina.

[0162] En algunas formas de realización, la composición de limpieza es una composición detergente para lavavajillas automático (ADW) que posee una serina proteasa de la presente invención. La composición detergente ADW puede comprender dos o más tensioactivos no iónicos seleccionados de un grupo de tensioactivos etoxilados no iónicos, tensioactivos de alcohol alcoxilados, alcoholes poli(oxialquilados) cubiertos de epoxi, o tensioactivos de óxido de amina presentes en cantidades de 0 a 10 % en peso; mejoradores en el intervalo de 5-60 % que comprenden mejoradores de fosfato (monofosfatos, difosfatos, tripolifosfatos o polifosfatos oligoméricos), tripolifosfatos de sodio-STPP preferidos o bien mejoradores sin fosfato [compuestos a base de aminoácidos, ejemplos de los cuales incluyen MGDA (ácido metilglicindiacético) y sales y derivados de este, GLDA (ácido glutámico-N,N-diacético) y sales y derivados de este, IDS (ácido iminodisuccínico) y sales y derivados de este, carboximetilinulina y sales y derivados de esta y mezclas de los mismos, ácido nitrilotriacético (NTA), ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA), ácido B-alaninodiacético (B-ADA) y sus sales], homopolímeros y copolímeros de ácidos policarboxílicos y sus sales parcial o completamente neutralizadas, ácidos policarboxílicos monoméricos y ácidos hidroxicarboxílicos y sus sales en el intervalo de 0,5 % a 50 % en peso; polímeros sulfonados/carboxilados (que proporcionan estabilidad dimensional al producto) en el intervalo de aproximadamente un 0,1 % a aproximadamente un 50 % en peso; coadyuvantes de secado en el intervalo de aproximadamente un 0,1 % a aproximadamente un 10 % en peso (seleccionados de entre poliésteres, especialmente poliésteres aniónicos, opcionalmente, junto con otros monómeros con entre 3 y 6 funcionalidades propicias para la policondensación, en concreto, funcionalidades de ácido, alcohol o éster, compuestos o compuestos precursores de policarbonato-poliorganosiloxano, poliuretano-poliorganosiloxano y/o poliurea-poliorganosiloxano de los mismos del tipo urea y carbonato cíclico reactivo); silicatos en el intervalo de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 20 % en peso (silicatos de sodio o potasio, por ejemplo, disilicato de sodio, metasilicato de sodio y filosilicatos cristalinos); blanqueador inorgánico (por ejemplo, sales de

perhidrato, como sales de perborato, percarbonato, perfosfato, persulfato y persilicato) y orgánico (p. ej., peroxiácidos orgánicos, incluidos diacil y tetraacilperóxidos, especialmente ácido diperoxidodecanodioico, ácido diperoxitetradecanodioico y ácido diperoxihexadecanodioico); activadores de blanqueo (precursores orgánicos de perácido en el intervalo de aproximadamente un 0,1 % a aproximadamente un 10 % en peso); catalizadores de blanqueo (seleccionados de entre triazaciclononano de manganeso y complejos relacionados, Co, Cu, Mn y Fe bispiridilamina y complejos relacionados, y acetato de pentamina de cobalto(III) y complejos relacionados); agentes de cuidado de metales en el intervalo de aproximadamente un 0,1 % a un 5 % en peso (seleccionados de entre benzatriazoles, sales y complejos de metales, y/o silicatos); enzimas en el intervalo de aproximadamente 0,01 a 5,0 mg de enzima activa por gramo de composición detergente para lavavajillas automático (aciltransferasas, alfa-amilasas, beta-amilasas, alfa-galactosidasas, arabinosidasas, arilesterasas, beta-galactosidasas, carragenasas, catalasas, celobiohidrolasas, celulasas, condroitinasas, cutinasas, endo-beta-1,4-glucanasas, endo-beta-mananasas, esterasas, exomananasas, galactanasas, glucoamilasas, hemicelulasas, hialuronidasas, queratinasas, lacasas, lactasas, ligninasas, lipasas, lipoxigenasas, mananasas, oxidasas, pectato liasas, pectina acetilesterasas, pectinasas, pentosanasas, peroxidasas, fenoloxidasas, fosfatasas, fosfolipasas, fitasas, poligalacturonasas, proteasas, pululanasas, reductasas, ramnogalacturonasas, beta-glucanasas, tanasas, transglutaminasas, xilano acetilesterasas, xilanasas, xiloglucanasas, xilosidasas, y cualquier mezcla de las mismas); y componentes estabilizadores de enzimas (seleccionados de entre oligosacáridos, polisacáridos, y sales inorgánicas de metales divalentes).

[0163] En algunas formas de realización, la composición de limpieza no contiene borato. En algunas formas de realización, la composición de limpieza no contiene fosfato. En algunas formas de realización, la composición de limpieza puede presentar menos de 10 ppm, o menos de 5 ppm o menos de 1 ppm de boratos y/o fosfatos en la composición.

[0164] Entre las formulaciones detergentes representativas que incluyen ventajosamente un polipéptido de serina proteasa de la presente invención se incluyen las formulaciones detergentes que se indican en WO2013063460, páginas 78-152, y, en concreto, las tablas de las páginas 94 a 152. Las serina proteasas se incorporan normalmente en la composición detergente a un nivel de un 0,00001 % a un 10 % de proteína enzimática en peso de la composición. En algunas formas de realización, la composición detergente comprende más de un 0,0001 %, 0,001 %, 0,01 % o 0,1 % de la serina proteasa en peso de la composición. En algunas formas de realización, la composición detergente comprende menos de un 1 %, 0,1 %, 0,01 % o 0,001 % de la serina proteasa en peso de la composición.

B. Procesamiento textil

[0165] Asimismo, se dan a conocer composiciones y métodos para tratar tejidos (p. ej., para el desencolado textil) utilizando un polipéptido de serina proteasa de la presente invención. En la técnica se conocen métodos de tratamiento de tejidos (véase, p. ej., la patente estadounidense n.º 6,077,316). Por ejemplo, se puede mejorar el tacto y el aspecto de un tejido mediante un método que comprende poner en contacto el tejido con una serina proteasa en una solución. El tejido se puede tratar con la solución bajo presión.

[0166] Se puede aplicar una serina proteasa de la presente invención durante o después de la fabricación de un tejido textil, o durante la etapa de desencolado, o una o más etapas adicionales de procesamiento de tejidos. Durante la fabricación de tejidos textiles, los hilos se exponen a una tensión mecánica considerable. Previamente a la fabricación de tejidos en telares mecánicos, se recubren a menudo hilos de urdimbre con almidón para encolado o derivados de almidón para aumentar su fuerza tensil y para prevenir su rotura. Se puede aplicar una serina proteasa de la presente invención durante o después de la fabricación de tejidos para eliminar el almidón para encolado o los derivados de almidón. Tras la fabricación de tejidos, se puede utilizar la serina proteasa para eliminar el recubrimiento de encolado antes del procesamiento posterior del tejido para asegurar un resultado homogéneo y resistente al lavado.

[0167] Se puede utilizar una serina proteasa de la presente invención sola o con otros reactivos químicos de desencolado y/o enzimas de desencolado para desencolar tejidos, incluidos tejidos que contienen algodón, como aditivos de detergente, p. ej., en composiciones acuosas. También se puede utilizar una amilasa en composiciones y métodos para producir un aspecto de lavado a la piedra en prendas y tejidos vaqueros tintados de azul. Para la fabricación de prendas de vestir, el tejido se puede cortar y coser en ropa o prendas que, a continuación, se acaban. En concreto, para la fabricación de pantalones vaqueros, se han desarrollado distintos métodos de acabado enzimático. El acabado de prendas vaqueras comienza normalmente con una etapa de desencolado enzimático, durante la cual se someten las prendas a la acción de enzimas proteolíticas para proporcionar suavidad al tejido y para hacer que el algodón sea más accesible para las posteriores etapas de acabado enzimático. Se puede utilizar la serina proteasa en métodos de acabado para prendas vaqueras (p. ej., un «proceso de lavado biológico» o «*biostoning*»), de desencolado enzimático y aporte de suavidad al tejido, y/o de procesos de acabado.

C. Procesamiento de cuero y plumaje

[0168] Los polipéptidos de serina proteasa descritos en el presente documento se pueden utilizar también en la eliminación de proteínas de animales con la ayuda de enzimas y en su posterior degradación o eliminación, tales

como plumaje, piel, pelo, cuero y demás. En algunos casos, la inmersión del cadáver del animal en una solución que comprende un polipéptido de serina proteasa de la presente invención puede funcionar para proteger la piel del daño en comparación con la inmersión tradicional en agua hirviendo o el proceso de desplume. En una forma de realización, se pueden rociar las plumas con un polipéptido aislado de serina proteasa de la presente invención en condiciones adecuadas para digerir o iniciar la degradación del plumaje. En algunas formas de realización, se puede utilizar una serina proteasa de la presente invención, según se ha indicado anteriormente, junto con un agente oxidante.

[0169] En algunas formas de realización, la eliminación del aceite o la grasa asociada a las plumas naturales se facilita utilizando un polipéptido de serina proteasa de la presente invención. En algunas formas de realización, los polipéptidos de serina proteasa se utilizan en composiciones para limpiar las plumas, así como para desinfectar y deshidratar parcialmente las fibras. En otras formas de realización adicionales, los polipéptidos de serina proteasa expuestos se pueden utilizar para recuperar proteínas del plumaje. En algunas otras formas de realización, se aplican los polipéptidos de serina proteasa en una solución de lavado junto con el 95 % de etanol u otro disolvente orgánico polar con o sin un tensioactivo a aproximadamente un 0,5 % (v/v).

D. Aplicaciones de pienso para animales

[0170] En un aspecto adicional de la invención, los polipéptidos de serina proteasa de la presente invención se pueden utilizar como componente de una composición de pienso para animales, aditivo de pienso para animales y/o alimento para mascotas que comprende una serina proteasa y variantes de esta. La presente invención se refiere además a un método para preparar dicha composición de pienso para animales, composición de aditivo de pienso para animales y/o alimento para mascotas que comprende mezclar el polipéptido de serina proteasa con uno o más ingredientes de pienso para animales y/o ingredientes de aditivos de pienso para animales y/o ingredientes de alimento para mascotas. Asimismo, la presente invención se refiere al uso del polipéptido de serina proteasa en la preparación de una composición de pienso para animales y/o una composición de aditivo de pienso para animales y/o alimento para mascotas.

[0171] El término «animal» incluye todos los animales rumiantes y no rumiantes. En una forma de realización concreta, el animal es un animal no rumiante, como un caballo, y un animal monogástrico. Entre los ejemplos de animales monogástricos se incluyen, sin carácter limitativo, cerdos, como lechones, cerdos en crecimiento, cerdas; aves, como pavos, patos, pollos, pollos de engorde, gallinas ponedoras; peces, como salmón, trucha, tilapia, siluros y carpas; y crustáceos, como gambas y camarones. En otra forma de realización, el animal es un animal rumiante, incluyendo, sin carácter limitativo, bovinos, terneros jóvenes, cabras, ovejas, jirafas, bisontes, alces, uapitíes, yaks, búfalos de agua, ciervos, camellos, alpacas, llamas, antílopes, berrendos y nilgós.

[0172] En el presente contexto, se pretende que el término «alimento para mascotas» haga referencia a un alimento para un animal doméstico como, entre otros, perros, gatos, jerbos, hámsteres, chinchillas, ratas de compañía, cobayas; aves mascotas, como canarios, periquitos y loros; reptiles mascotas, como tortugas, lagartos y serpientes; y mascotas acuáticas, como peces tropicales y ranas.

[0173] Los términos «composición de pienso para animales», «piensos» y «forraje» se utilizan indistintamente y pueden comprender uno o más materiales para piensos seleccionados del grupo que comprende a) cereales, como granos pequeños (p. ej., trigo, cebada, centeno, avena y combinaciones de los mismos) y/o granos grandes, como maíz o sorgo; b) productos derivados de cereales, como la harina de gluten de maíz, granos secos de destilería con solubles (DDGS) (especialmente granos secos de destilería con solubles a base de maíz (cDDGS), salvado de trigo, harinillas de trigo, harina baja de trigo, salvado de arroz, cascarilla de arroz, cascarilla de avena, almendra de palma y pulpa de cítrico; c) proteína obtenida a partir de fuentes tales como soja, girasol, cacahuete, altramuz, guisantes, habas, algodón, colza, harina de pescado, proteína plasmática seca, harina de huesos y carne, proteína de patata, suero de leche, copra, sésamo; d) aceites y grasas obtenidas a partir de fuentes vegetales y animales; e) minerales y vitaminas.

E. Blanqueamiento de pasta de papel

[0174] Los polipéptidos de proteasa descritos en el presente documento se pueden utilizar además en el blanqueamiento de pastas de papel mediante enzimas, tales como pastas químicas, pastas semiquímicas, pastas *kraft*, pastas mecánicas o pastas preparadas mediante el método de sulfitos. En términos generales, las pastas de papel se incuban con un polipéptido de proteasa de la presente invención en condiciones adecuadas para el blanqueamiento de la pasta de papel.

[0175] En algunas formas de realización, las pastas son pastas sin cloro blanqueadas con oxígeno, ozono, peróxido o peroxiácidos. En algunas formas de realización, los polipéptidos de proteasa se utilizan en el blanqueamiento mediante enzimas de pastas producidas mediante métodos de fabricación de papel modificados o continuos que presentan un bajo contenido en lignina. En algunas otras formas de realización, los polipéptidos de proteasa se aplican solos o, preferiblemente, combinados con enzimas xilanasa y/o endoglucanasa y/o alfa-galactosidasa y/o celobiohidrolasa.

F. Degradación de proteínas

[0176] Los polipéptidos de proteasa descritos en el presente documento se pueden utilizar, además, en la eliminación enzimática de proteínas de animales y en su posterior degradación o desecho, tales como plumas, piel, pelo, cuero y demás. En algunos casos, la inmersión del cadáver del animal en una solución que comprende un polipéptido de proteasa de la presente invención puede funcionar para proteger la piel frente al daño en comparación con la inmersión tradicional en agua hirviendo o el proceso de desplume. En una forma de realización, se pueden rociar las plumas con un polipéptido aislado de proteasa de la presente invención en condiciones adecuadas para digerir o iniciar la degradación del plumaje. En algunas formas de realización, se puede utilizar una proteasa de la presente invención, según se ha indicado anteriormente, junto con un agente oxidante.

[0177] En algunas formas de realización, la eliminación del aceite o grasa asociada a las plumas naturales se facilita mediante el uso de un polipéptido de proteasa de la presente invención. En algunas formas de realización, los polipéptidos de proteasa se utilizan en composiciones para limpiar las plumas, así como para desinfectar y deshidratar parcialmente las fibras. En algunas otras formas de realización, los polipéptidos de proteasa se aplican en una solución de lavado junto con un 95 % de etanol u otro disolvente orgánico polar con o sin un tensioactivo a aproximadamente un 0,5 % (v/v). En otras formas de realización adicionales, los polipéptidos de proteasa dados a conocer se pueden utilizar para recuperar proteínas del plumaje. Los polipéptidos de proteasa dados a conocer se pueden utilizar solos o combinados en métodos adecuados proteolíticos y de procesamiento de plumas, como los expuestos en los documentos PCT/EP2013/065362, PCT/EP2013/065363 y PCT/EP2013/065364. En algunas formas de realización, la proteína recuperada se puede utilizar posteriormente en piensos para animales o para peces.

G. Desbridamiento de tejidos

[0178] Los polipéptidos de proteasa descritos en el presente documento se pueden utilizar además en el desbridamiento de tejidos mediante enzimas. Este hecho implica la eliminación de tejido muerto o dañado; por ejemplo, su eliminación de heridas para ayudar a la curación.

H. Cultivo de tejidos

[0179] Los polipéptidos de proteasa descritos en el presente documento se pueden utilizar también en el cultivo de tejidos. En concreto, se pueden utilizar proteasas de la presente invención para suspender o volver a suspender células adheridas a una pared de cultivo celular, por ejemplo, durante el proceso de recolección de células. Se pueden utilizar proteasas de la presente invención para escindir los enlaces de las proteínas entre las células cultivadas y la placa, permitiendo que las células se suspendan en la solución.

I. Aplicaciones alimentarias

[0180] Los polipéptidos de proteasa descritos en el presente documento se pueden utilizar también como aditivo alimentario, coadyuvante digestivo o coadyuvante para el procesamiento de alimentos.

EJEMPLOS

[0181] Los siguientes ejemplos se proporcionan para mostrar e ilustrar ciertas formas de realización y aspectos preferidos de la presente memoria, y no se han de interpretar como limitativos.

[0182] En la exposición experimental que se indica a continuación, se aplican las siguientes abreviaturas: ADW (lavavajillas automático); BMI (sangre/leche/tinta); BSA (albúmina sérica bovina); CAPS (ácido N-ciclohexil-3-aminopropanosulfónico); CHES (ácido N-ciclohexil-2-aminoetanosulfónico); DMC (dimetilcaseína); HDD (en polvo/seco concentrado); HDL (líquido concentrado); HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico); MTP (microplaca); ND (no realizado); OD (densidad óptica); PCR (reacción en cadena de la polimerasa); ppm (partes por millón); QS (cantidad suficiente); rpm (revoluciones por minuto); AAPF (succinil-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilida); TNBSA (ácido 2,4,6-trinitrobenceno sulfónico); v/v (volumen/volumen); p/v (peso/volumen).

EJEMPLO 1

Clonación de las serina proteasas BspAI02518 y BspU02193 de *Bacillus* sp.

Serina proteasa BspAI02518

[0183] La cepa C-M2-3 de *B. akibai* (catálogo de cultivos de DuPont) se seleccionó como una posible fuente de enzimas útiles para diversas aplicaciones industriales. El genoma completo de la cepa C-M2-3 de *Bacillus* sp. se secuenció utilizando la secuenciación de ILLUMINA® mediante tecnología de síntesis. La secuenciación del genoma y la recopilación de datos de la secuencia se llevó a cabo a través de BaseClear (Leiden, Países Bajos). Los cóntigos se anotaron mediante BioXpr (Namur, Bélgica). Uno de los genes identificados de este modo en C-M-2-3 de *B. akibai* codifica una serina proteasa que mostró homología con serina proteasas de otras bacterias.

[0184] La secuencia de nucleótidos de *BspAI02518n* se expone como la SEQ ID n.º 1:

ATGAAAATGAAATGGTCACGTTTACTTTTAACTCTAGTTCTCGTATTCAGTTTTGTATTCCCAT
CTATGACAAGTGCAAACTCAGCTGTAGAAAAAGAGGACTATCTGATCGGTTTTAAGCAGAAAGG
GAATGTTAGTGCACAAGTTGTGAATATGAGTGGAGGAGAAGTCGTCCATGAATATGAACATATG
CCAGTCTTGCACGTTAAATTACCTCCACAAGCTGCTAAAGCTTTAGAAAAGAACCGAAATATTG
AATACATCGAAAAAGATGAAAAAGTCCAAGCAACAGCACAATCGACACCTTGGGGGATTTCACG
TATTAATGCTCCTGCTGTTCACTCGACTGGTAATTTTGGACAAGGTGTCCGAGTTGCCGTTTTA
GATAGTGGAGTTGCTTCTCATGAAGACTTACGGATTGCTGGGGGAGTGAGCTTTGTCGCTTCAG
AACCTAGTTATCAAGATTATAATGGTCACGGAACACATGTTGCTGGAACCATTGCTGGTTTAAA
TAATAGTGTTGGGGTCCTTGGTGTAGCTCCATCTGTCCAATTATATGCGGTTAAGGTGTTGGAT
CGTAATGGCGGGGGAAATCATAGTGACATTGCTAGAGGAATTGAGTGGTCAGTTAATAATGGTA
TGCATGTGGTGAATATGAGTTTAGGTGGACCAACAGGGTCAACCACTCTTCAACGAGCAGCGGA
TAATGCTTATAATAGAGGAGTTCTTTTAATTGCTGCGGCTGGTAACACGGGAACTAGTGGAGTT
AGCTTCCCTGCGCGTTACAGCTCAGTAATGGCAGTAGCCGCAACAGATTCTAATAATAACCGTG
CTTCATTTTCAACTTATGGATCACAAATTGAAATTTCAGCACCTGGAGTTGGCATTAATAGCAC
GTATCCAACGAATGGTTATTCAAGTTTAAATGGAACATCAATGGCTTCACCTCATGTCGCTGGT
GTAGCGGCCCTAGTGAAGGCGAGATATCCAAGTGCGACGAATGCTCAGATTAGACAACATCTTC
GTAGCACTTCTACGTATCTAGGAAACTCAACTTACTATGGTAGTGGTCTAGTTGATGCACAGCG
TGCAACTAAC.

[0185] La secuencia de aminoácidos de la preproenzima codificada por *BspAI02518n* se expone como la SEQ ID n.º 2:

MKMKWSRLLLTLVLVFSFVFPSMTSA*NSAVEKEDYLIGFKQKGNVSAQVVNMSGGEVVHEYEHM*
*PVLHVKLPPQAAKALEKNRNIEYIEKDEKVQAT*AQSTPWGISRINAPAVHSTGNFGQGVRVAVL
DSGVASHEDLRIAGGVSFVASEPSYQDYNGHGTHVAGTIAGLNNSVGVLGVAPSVQLYAVKVLD
RNGGGNHSDIARGIEWSVNNGMHVVNMSLGGPTGSTTLQRAADNAYNRGVLLIAAAGNTGTSGV
SFPARYSSVMAVAATDSNNNRASFSTYGSQIEISAPGVGINSTYPTNGYSSLNGTSMASPHVAG
VAALVKARYPSATNAQIRQHLRSTSTYLGNSTYYGSGLVDAQRATN.

[0186] En el N-terminal, la preproenzima presenta un péptido señal con una longitud prevista de 26 aminoácidos (***en negrita y cursiva*** en la SEQ ID n.º 2) según lo determinado mediante el empleo de SignalP-NN (Emanuelsson *et al.*, Nature Protocols, 2:953-971, 2007). La presencia de una secuencia de péptido señal indica que esta serina proteasa es una enzima secretada. Al igual que otras serina proteasas, la enzima presenta una prosecuencia con una longitud prevista de 71 aminoácidos (*en cursiva* en la SEQ ID n.º 2). La predicción de la prosecuencia se basó en el conocimiento de la unión promadura en serina proteasas homólogas, tales como la proteasa BPN' (Wells *et al.*, Nucleic Acids Res, 11:7911-25, 1983) y PB92 (van der Laan *et al.*, Appl Environ Microbiol, 57:901-909, 1991).

[0187] La secuencia de aminoácidos de la enzima madura totalmente procesada, BspAI02518 (269 aminoácidos), se representa en la SEQ ID n.º 3:

AQSTPWGISRINAPAVHSTGNFGQGVRVAVLDSGVASHEDLRIAGGVSFVASEPSYQDYNGHGT
HVAGTIAGLNNSVGVLGVAPSVQLYAVKVLDRNGGGNHSDIARGIEWSVNNGMHVVNMSLGGPT
GSTTLQRAADNAYNRGVLLIAAAGNTGTSGVSFPARYSSVMAVAATDSNNNRASFSTYGSQIEI
SAPGVGINSTYPTNGYSSLNGTSMASPHVAGVAALVKARYPSATNAQIRQHLRSTSTYLGNSTY
YGSGLVDAQRATN.

Serina proteasa BspU02193

[0188] La cepa GICC 2089392 de *B. akibai* (catálogo de cultivos de DuPont) se seleccionó como una posible fuente de enzimas útiles para diversas aplicaciones industriales. El genoma completo de la cepa GICC 2089392 de *Bacillus* sp. se secuenció utilizando la secuenciación de ILLUMINA® mediante tecnología de síntesis. La secuenciación del genoma y la recopilación de datos de la secuencia se llevó a cabo a través de BaseClear (Leiden, Países Bajos). Los cóntigos se anotaron mediante BioXpr (Namur, Bélgica). Uno de los genes identificados de este modo en GICC 2089392 de *B. akibai* codifica serina proteasa que mostró homología con serina proteasas de otras bacterias.

[0189] La secuencia de nucleótidos de *BspU02193n* se representa en la SEQ ID n.º 4:

ATGAGTAAAATGAAGTTTACTAGTTTGTTGTTAGGGTTGGTTGTGGCGTTTGTCTTTGTCTTCT
CGACTCTGTCAGTCAGTGCGAATGGAAAAGGTGCTGAGCGTCTTGATTATTTAGTTGGGTTTAA
AGAGAAGCCGAATGCACAAGTGATGGCGCAGTCTGGTGGCGAGGTGGTTCATGAGTTTGAATAT
ATGAATGTCGTTCATATGAAACTTCCAGAGCAAGCAGCAAAAGCTCTTGAGAAGAACCCGAACA
TTGCGTTTGTTGAGCGTGATGAGAAGGTCGAAGCGACTCAAACGGTTCCTTGGGGAATCAATCA
TGTGAAAGCTCCGACTGTTCATAACTGGGGCAATGTTGGAACGGGCGTGAAGGTGGCGGTGCTT
GATACAGGAATCGCGTCTCACCCGGATTTACGTGTGTCTGGTGGAGCGAGCTTCATTCCATCTG
AGCCTACGATTCAAGATTTCAACGGACACGGAACGCATGTGGCGGGGACAGTCGCTGCGTTAAA
TAATAGCATTGGTGTGCTTGGTGTCGCGCCGAATGTTCAATTATATGGTGTAAAGGTTTTAGAT
CGTAACGGTGGCGGATCTCATAGTGCGATTGCTCAAGGGATTGAGTGGTCGATTTCAAATGGGA
TGGATGTTGTGAATATGAGTTTAGGTGGAGCGACTAGTTCAACGGCGTTAAGCCAAGCGGTAGC
GAATGCGAGTAACCGCGGGATTTTATTAATTGCGGCGTCTGGTAACACAGGGCGCGCGGGCATT
CAGTTCCCTGCTCGTTATAGCCAAGTGATGGCTGTTGGAGCGGTCGATCAGAACAACCGTCTGG
CTTCATTCTCAACATTTGGAAACGAGCAAGAAATTGTGGCTCCCGGTGTAGGTATTCAGAGCAC
ATACTTAAACAACGGATATTCTTCATTAAACGGTACATCAATGGCTGCTCCTCACGTGGCAGGT
GTCGCGGCACTTGTGATGAGCGAGTACCCATGGGCAACAGCACCTCAAGTACGCGGACGTCTAA
ATGATACAGCCATTCCACTAGGTAACGCGTATTACTTCGGGAACGGATTGGTGGACGCTTCAAG
AGCCGCGTAT.

[0190] La secuencia de aminoácidos de la preproenzima codificada por BspU02193n se expone como la SEQ ID n.º 5:

MSKMKFTSLLLGLVVAFVFVFSTLSVSA*NGKGAERLDYLVGFKEKPNAQVMAQSGGEVVHEFEY*
*MNVVHMKLPEQAAKALEKNPNIAFVERDEKVEA*TQTVPWGINHVKAPTVHNWGNVGTGVKVAVL
DTGIASHPDLRVSGGASFIPSEPTIQDFNGHGTHVAGTVAALNNSIGVLGVAPNVQLYGVKVLD
RNGGGSHSAIAQGIEWSISNGMDVVNMSLGGATSSTALSQAVANASNRGILLIAASGNTGRAGI
QFPARYSQVMAVGAVDQNNRLASFSTFGNEQEIVAPGVGIQSTYLNNGYSSLNGTSMAAPHVAG
VAALVMSEYPWATAPQVRGRLNDTAIPLGNAYYFGNGLVDASRAAY.

[0191] En el N-terminal, la preproenzima presenta un péptido señal con una longitud prevista de 28 aminoácidos (***en negrita y cursiva*** en la SEQ ID n.º 5) según lo determinado mediante el uso de SignalP-NN (Emanuelsson *et al.*, Nature Protocols, 2:953-971, 2007). La presencia de una secuencia de péptido señal indica que esta serina proteasa es una enzima secretada. Al igual que otras serina proteasas, la enzima presenta una prosecuencia con una longitud prevista de 69 aminoácidos (*en cursiva* en la SEQ ID n.º 5). La predicción de la prosecuencia se basó en el conocimiento de la unión promadura en serina proteasas homólogas, tales como la proteasa BPN' (Wells *et al.*, Nucleic Acids Res, 11:7911-25, 1983) y PB92 (van der Laan *et al.*, Appl Environ Microbiol, 57:901-909, 1991).

[0192] La secuencia de aminoácidos de la enzima madura totalmente procesada, BspU02193 (269 aminoácidos), se expone en la SEQ ID n.º 6:

TQTVPWGINHVKAPTVHNWGNVGTGVKVAVLDTGIASHPDLRVSGGASFIPSEPTIQDFNGHGT
HVAGTVAALNNSIGVLGVAPNVQLYGVKVLDRNGGGSHSAIAQGIEWSISNGMDVVNMSLGGAT
SSTALSQAVANASNRGILLIAASGNTGRAGIQFPARYSQVMAVGAVDQNNRLASFSTFGNEQEI
VAPGVGIQSTYLNNGYSSLNGTSMAAPHVAGVAALVMSEYPWATAPQVRGRLNDTAIPLGNAYY
FGNGLVDASRAAY.

EJEMPLO 2

Expresión heteróloga de BspAI02518 y BspU02193

[0193] La proteasa BspAI02518 se produjo en *B. subtilis* utilizando un casete de expresión consistente en el promotor *aprE* de *B. subtilis*, la secuencia de péptido señal *aprE* de *B. subtilis,* la secuencia propeptídica de la proteasa nativa BspAI02518, la secuencia de la proteasa madura BspAI02518 y un terminador BPN'. El casete de expresión BspAI02518 se clonó en el vector transportador de replicación pHYT y se transformó en una cepa adecuada de *B. subtilis*. El vector pHYT derivó de pHY300PLK (Takara) mediante la adición de un terminador tras el gen de resistencia a la tetraciclina utilizando los sitios *Bst*EII y *Eco*RI (secuencia terminadora: GGTTACCTTG AATGTATATA AACATTCTCA AAGGGATTTC TAATAAAAAA CGCTCGGTTG CCGCCGGGCG TTTTTTATGC ATCGATGGAA TTC expuesta como la SEQ ID n.º 7). Se eliminó también el sitio *Hin*dIII en pHY300PLK utilizando un conector clonado en los sitios *Bam*HI y *Hind*III (secuencia conectora: GGATCCTGAC TGCCTGAGCT T expuesta como la SEQ ID n.º 8). En la figura 1 se muestra un mapa del vector pHYT para la expresión de la proteasa BspAI02518 (pHYT- BspAI02518).

[0194] Para producir BspAI02518, se cultivó un transformante de *B. subtilis* que contenía pHYT-BspAI02518 en tubos Falcon de 15 ml durante 16 horas en TBS (caldo) que contenía 12,5 ppm de tetraciclina. Se añadieron 300 µl de este precultivo en un matraz de 500 ml lleno con 30 ml de medio de cultivo complementado con 25 ppm de tetraciclina. El medio de cultivo era un medio semidefinido enriquecido basado en tampón MOP, con urea como fuente principal de nitrógeno, glucosa como fuente principal de carbono, y complementado con un 1 % de soitona para un cultivo celular sólido. Los matraces se incubaron durante 2 días a 32 °C con un mezclado rotatorio constante a 180 rpm. Los cultivos se recolectaron mediante centrifugación a 14 500 rpm durante 20 min en tubos cónicos.

[0195] La proteasa BspU02193 se produjo en *B. subtilis* utilizando un casete de expresión consistente en el promotor *aprE* de *B. subtilis*, la secuencia de péptido señal *aprE* de *B. subtilis*, el propéptido de proteasa nativa BspU02193, la proteasa madura BspU02193 y un terminador BPN'. El casete de expresión BspU02193 se clonó en un vector transportador de replicación a base de pBN (Babe' *et al.*, Biotechnol Appl Biochem, 27:117-124, 1998) y se transformó en una cepa adecuada de *B. subtilis*. En la figura 2 se muestra un mapa del vector pBN para la expresión de la proteasa BspU02193 (pBN- BspU02193).

[0196] Para producir BspU02193, se cultivó un transformante de *B. subtilis* que contenía pBN- BspU02193 en tubos Falcon de 15 ml durante 16 horas en TBS (caldo) que contenía 10 ppm de neomicina. Se añadieron 300 µl de este precultivo en un matraz de 500 ml lleno con 30 ml de medio de cultivo complementado con 10 ppm de neomicina. El medio de cultivo era un medio semidefinido enriquecido a base de tampón MOP, con urea como fuente principal de nitrógeno, glucosa como fuente principal de carbono, y complementado con un 1 % de soitona para un cultivo celular sólido. Los matraces se incubaron durante 2 días a 32 °C con un mezclado rotatorio constante a 180 rpm. Los cultivos se recolectaron mediante centrifugación a 14 500 rpm durante 20 min en tubos cónicos.

[0197] La proteína se cuantificó mediante el método del criterio de generación de imágenes sin manchas (*stain-free Imager Criterion*). Este método se basa en la utilización de geles PAGE prefabricados sin manchas, donde la intensidad de cada banda depende de la cantidad de residuos de triptófano presentes en la proteína de interés. Los geles para PAGE prefabricados CRITERION™ TGX (Tris-Glicina ampliada) STAIN-FREE™ incluyen compuestos trihalo únicos. Este hecho permite una rápida detección fluorescente de proteínas con el sistema de imágenes Gel Doc™ EZ. Los compuestos trihalo reaccionan con residuos de triptófano en una reacción inducida por UV para producir fluorescencia, que se puede detectar fácilmente a través del generador de imágenes Gel Doc EZ en los geles. Los reactivos utilizados en el ensayo incluyen: el tampón de muestra concentrado (10X) de Laemmli (Kem-En-Tec, Catálogo n.º 42556); geles prefabricados sin manchas criterio TGX de 18 o bien de 26 pocillos (Bio-Rad, catálogo n.˚ 567-8124 y 567-8125, respectivamente); y marcadores proteicos «estándares de proteínas y procesión (Precision Plus Protein Standards)» (Bio-Rad, catálogo n.º 161- 0363). El ensayo se llevó a cabo del modo siguiente: se añadieron 25 µl de muestra de proteína y 25 µl de 0,5M HCl en una placa de PCR de 96 pocillos sobre hielo para desactivar la proteasa y para prevenir la autohidrólisis. Se añadieron 50 µl de la mezcla de proteína ácida a 50 µl de tampón de muestra que contenía 0,385 mg de DTT en la placa de PCR de

96 pocillos. La placa se selló con una película de microsellado «B» de Bio-Rad y se colocó en una máquina de PCR para calentarse a 70 °C durante 10 min. A continuación, la cámara se llenó con tampón de migración, y se ajustó el casete del gel. Posteriormente, cada hueco se cargó con 20 µl de cada muestra junto con marcadores. La electroforesis se inició a 200 V durante 55 min. Tras la electroforesis, el gel se transfirió a un generador de imágenes, y se utilizó el *software* Image Lab para calcular la intensidad de cada banda. Al conocer la cantidad de proteína y el contenido de triptófano de la muestra estándar, se puede trazar una curva de calibración. La cantidad de muestra experimental se determinó extrapolando la intensidad de la banda y los valores de triptófano a la concentración de proteínas. El método de cuantificación de proteínas se empleó para preparar muestras de las proteasas BspAI02518 y BspU02193 para su uso en los ensayos descritos en posteriores ejemplos.

[0198] Se analizaron muestras de proteasas BspAI02518 y BspU2193 aisladas mediante LC-MS/MS según se describe a continuación. Para preparar la confirmación de secuencia, incluyendo una determinación del N-terminal y del C-terminal, se sometió una muestra de proteasa BspAI02518 y de proteasa BspU2193 a una serie de tratamientos químicos en un filtro de centrifugación de 10 kDa. Las muestras se desnaturalizaron y se redujeron/alquilataron mediante urea y DTT/tratamiento con yodoacetamida. Se llevó a cabo una etapa de guanidinación para convertir lisinas en homoargininas para proteger las cadenas laterales de la lisina frente a la acetilación. La reacción de acetilación mediante el uso de sulfo-NHS-acetato (sulfosuccinimidil acetato) modifica únicamente el residuo N-terminal de la proteína. A continuación, las muestras se mezclaron con un tampón que contenía 40 v/v % de agua ^{18}O:60 v/v % de agua ^{16}O y las enzimas proteolíticas utilizadas para la digestión de proteínas. Los péptidos resultantes contendrán mezclas de ^{18}O y ^{16}O, excepto el terminal carboxilo, que conservará el ^{16}O nativo, como se podrá observar en el patrón isotrópico de los péptidos. El péptido, que procede del N-terminal de la proteína, se observará como el único péptido acetilado. Los péptidos resultantes se separaron y se analizaron utilizando un sistema nano-LC y, posteriormente, una espectrometría de masas de alta resolución LTQ Orbitrap (Thermo Fisher). Las secuencias de aminoácidos se dedujeron de los espectros de fragmento MS/MS de los péptidos. En base a este análisis, se confirmó que el N-terminal de la proteína aislada comenzaba con A en la posición 1 de la secuencia madura prevista. Se determinó que la secuencia de la proteína madura correspondía a la secuencia listada en la SEQ ID n.º 3, que consta de 269 aminoácidos. En base a este análisis, se confirmó que el N-terminal de la proteína aislada BspU2193 comenzaba con Q en la posición 2 de la secuencia madura prevista listada en la SEQ ID n.º 84.

[0199] La secuencia de aminoácidos de la enzima madura procesada, BspU2193, que se purificó y se utilizó para una posterior caracterización (268 aminoácidos), se expone como la SEQ ID n.º 84.

QTVPWGINHVKAPTVHNWGNVGTGVKVAVLDTGIASHPDLRVSGGASFIPSEPTIQDFNGHGTH
VAGTVAALNNSIGVLGVAPNVQLYGVKVLDRNGGGSHSAIAQGIEWSISNGMDVVNMSLGGATS
STALSQAVANASNRGILLIAASGNTGRAGIQFPARYSQVMAVGAVDQNNRLASFSTFGNEQEIV
APGVGIQSTYLNNGYSSLNGTSMAAPHVAGVAALVMSEYPWATAPQVRGRLNDTAIPLGNAYYF
GNGLVDASRAAY.

EJEMPLO 3

Actividad de proteasa de BspAI02518 y BspU02193

[0200] Las actividades de proteasa de BspAI02518 y BspU02193 se analizaron midiendo la hidrólisis de un sustrato de dimetilcaseína (DMC). Las soluciones de reactivos utilizadas para el ensayo DMC fueron: 2,5 % p/v de DMC (Sigma C-9801) en 100 mM de tampón carbonato de sodio, pH 9,5, 0,075 % de TNBSA (Thermo Scientific) en el Reactivo A. Reactivo A: 45,4 g de $Na_2B_4O_7.10H_20$ (Merck) en 15 ml de NaOH 4 N para alcanzar un volumen final de 1000 ml en agua desionizada. Los sobrenadantes de proteasa se diluyeron en solución de dilución: 10 mM de NaCl, 0,1 mM de $CaCl_2$, 0,005 % de Tween-80 hasta la concentración deseada para lograr una respuesta lineal durante la hidrólisis a lo largo de 5 min. Se llenó una microplaca (MTP) de 96 pocillos con 95 µl de sustrato DMC y, a continuación, se añadieron 5 µl de sobrenadante de proteasa diluido. Posteriormente, se añadieron 100 µl de TNBSA en el Reactivo A mezclando lentamente. Se midió la actividad a 405 nm durante 5 min utilizando un lector de placas SpectraMax en modo cinético a temperatura ambiente. La absorbancia de un blanco que no contenía proteasa se sustrajo de cada lectura de muestra. La actividad se expresó como mOD/min. La curva de actividad de proteasa para BspAI02518 se muestra en la figura 3, y la curva de actividad de proteasa para BspU02193 se muestra en la figura 4. Se descubrió que la actividad específica de la proteasa BspAI02518 en el ensayo DMC era de 46 mOD/min/ppm (donde ppm es la concentración final de proteasa en el ensayo). Se descubrió que la actividad específica de la proteasa BspU02193 en el ensayo DMC era de 123 mOD/min/ppm. Se descubrió que las actividades específicas de las proteasas GG36 y BPN' eran, respectivamente, de 54 y 23 mOD/min/ppm con las mismas condiciones de ensayo.

EJEMPLO 4

Perfiles de pH de BspAI02518 y BspU02193

[0201] La dependencia del pH de las actividades proteolíticas de BspAI02518 y BspU02193 se estudió utilizando un sustrato de azocaseína en un tampón de 50 mM de acetato/Bis-Tris/HEPES/CHES que incluía 50 mM de $CaCl_2$. El efecto del pH entre 4 y 12 se midió en incrementos de 1 unidad de pH. Se añadió un comprimido Protaxyme AK (Megazyme, Irlanda) en un tubo de ensayo de cristal, junto con 1,9 ml de tampón apropiado, y a continuación se hidrató suavemente a 40 °C durante 5 min en un baño de agua con temperatura controlada ajustado con un agitador magnético. Se añadió una muestra de 100 µl de proteasa recién preparada (diluida en agua desionizada hasta una concentración apropiada para el ensayo) a un sustrato prehidratado, y la reacción se llevó a cabo a 40 °C durante 10 min. Para detener la reacción, se añadieron 10 ml de un tampón Tris con 2 % p/v y pH 12, y la solución se filtró inmediatamente a través de un filtro Whatman n.º 1. Se recogió el sobrenadante y se midió la absorbancia a 590 nm para el sobrenadante con el fin de cuantificar el producto de la reacción. La absorbancia de un control solo con tampón se sustrajo de cada lectura de muestra, y los valores resultantes se convirtieron a porcentajes de actividad relativa, definiendo la actividad en el pH óptimo como el 100 %. Se determinó que BspAI02518 mantenía ≤50 % de actividad en todo el rango de pH de 7,5-12, y se determinó que BspU02193 mantenía ≤50 % de actividad en todo el rango de pH de 9-12, con las condiciones de este ensayo.

EJEMPLO 5

Perfiles de temperatura de BspAI02518 y BspU02193

[0202] La dependencia de la temperatura de las actividades proteolíticas de BspAI02518 y BspU02193 se midió utilizando un sustrato de azocaseína en un tampón de 50 mM de acetato/Bis-Tris/HEPES/CHES que incluía 50 mM de $CaCl_2$ con pH 9. La actividad se midió en temperaturas comprendidas entre 30 °C y 80 °C en incrementos de 10 °C. Se añadió un comprimido Protaxyme AK (Megazyme, Irlanda) en un tubo de ensayo de cristal junto con 1,9 ml de un tampón apropiado y, a continuación, se hidrató suavemente a temperaturas establecidas durante 5 min en un baño de agua con temperatura controlada ajustado con un agitador magnético. Se añadió una muestra de 100 µl de proteasa recién preparada (diluida en agua desionizada hasta una concentración apropiada para el ensayo) a un sustrato prehidratado, y la reacción se llevó a cabo a 40 °C durante 10 min. Para terminar la reacción, se añadieron 10 ml de un tampón Tris con 2 % p/ y pH 12, y la solución se filtró inmediatamente a través de un filtro Whatman n.º 1. Se recogió el sobrenadante y se midió la absorbancia a 590 nm para este sobrenadante con el fin de cuantificar el producto de la reacción. La absorbancia de un control solo con tampón se sustrajo de cada lectura de muestra, y los valores resultantes se convirtieron a porcentajes de actividad relativa, definiendo la actividad en la temperatura óptima como 100 %. Se determinó que BspAI02518 conservaba ≤50 % de actividad en todo el rango de temperatura de 30-65 °C, y se determinó que BspU02193 conservaba ≤50 % de actividad en todo el rango de temperatura de 60-80 °C, en las condiciones de este ensayo.

EJEMPLO 6

Eficacia de limpieza de BspAI02518 y BspU02193

[0203] La eficacia de limpieza de BspAI02518 y BspU02103 se analizó en micromuestras BMI (sangre/leche/tinta sobre algodón) (EMPA-116, Center for Testmaterials, Países Bajos) para aplicaciones a base de ropa, y sobre micromuestras de yema de huevo (yema de huevo sobre tejido poliacrílico, envejecido y teñido con tinte negro de carbón) (PAS-38, Center for Testmaterials, Países Bajos) para aplicaciones a base de vajilla. Las microplacas (Corning 3641) que contenían muestras ya perforadas (para ajustarse a la microplaca) se enjuagaron y se llenaron con detergente antes de la adición de enzimas. Los detergentes comerciales se inactivaron con calor para eliminar la actividad enzimática existente, y se dosificaron según lo descrito en la tabla 6-1.

[0204] Los detergentes para ropa líquidos concentrados (HDL) se inactivaron mediante calor a 95 °C durante 4 horas en un baño de agua. Los detergentes para ropa secos concentrados (HDD) se inactivaron preparando una solución al 10 % p/v y calentándola a 95 °C durante 4 horas. Tras calentar tanto el detergente HDD como el detergente HDL durante 4 horas, se determinó que no existía actividad de proteasa.

[0205] Tras inactivar las proteasas de detergentes existentes, se analizó la actividad de las proteasas del ensayo utilizando un sustrato suc-AAPF-pNA (AAPF). Las soluciones de los reactivos utilizadas para el ensayo de hidrólisis AAPF fueron: 100 mM de Tris/HCl, pH 8,6, que contenía TWEEN®-80 al 0,005 % (tampón de dilución Tris); 100 mM de tampón Tris, pH 8,6, que contenía 10 mM de $CaCl_2$ y TWEEN®-80 al 0,005 % (tampón Tris/Ca); y 160 mM de suc-AAPF-pNA en DMSO (solución madre suc-AAPF-pNA) (Sigma: S-7388). Para preparar una solución de trabajo de sustrato, se añadió 1 ml de solución madre suc-AAPF-pNA a 100 ml de tampón Tris/Ca y se mezcló bien. Se añadió una muestra de enzima a la microplaca (Greiner 781101) que contenía 1 mg/ de solución de trabajo suc-AAPF-pNA y se analizó su actividad a 405 nm durante 3 min utilizando un lector SpectraMax en modo cinético a temperatura ambiente. La actividad de proteasa se expresó como $mOD \cdot min^{-1}$.

[0206] Las soluciones de lavado con las concentraciones finales de lavado del detergente (g/l) descritas en la tabla 6-1 se constituyeron y utilizaron en el ensayo de eficacia de limpieza.

Tabla 6-1. Condiciones del detergente para los ensayos de eficacia de limpieza

Detergente*	Tipo	Conc. de lavado del detergente (g/l)	Conc. de dureza (ppm)	Tampón	pH
OMO color	HDD	5,3	250	2 mM de $NaCO_3$	10,6
Kirkland Ultra	HDD	1,09	150	2 mM de $NaCO_3$	10,6
OMO K & K	HDL	2,8	250	5 mM de HEPES Na	8,2
Kirkland Ultra	HDL	0,71	150	5 mM de HEPES Na	8,2
GSM-B 10.5	ADW	3	374	no tamponado	-10,5
GSM-B 9	ADW	3	374	1 M de citrato no tamponado para ajustar el pH	9
*Fuentes de detergente: Los HDD y HDL de Kirkland Ultra (Sun Products) se adquirieron en un supermercado local de Estados Unidos en 2012. El HDD de OMO color y el OMO Klein & Krachtig (Unilever) se adquirieron en supermercados locales de Países Bajos en 2013. El GSM-B se adquirió a través de WFK Testgewebe GmbH (Alemania).					

Tabla 6-2. Ingredientes del detergente ADW sin fosfato con pH 10,5 GSM-B

Componente	% en peso
Citrato de sodio dihidratado	30,0
Sal de sodio de copolímero de ácido maleico/ácido acrílico (SOKALAN® CP5; BASF)	12,0
Perborato de sodio monohidratado	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 llegar a 100

[0207] Se añadieron alícuotas de enzima a una microplaca llena con detergente hasta alcanzar un volumen final de 200 µl con una concentración de enzimas final de 0,04 a 10 ppm para un ensayo de lavado de ropa. Los ensayos de lavado de ropa con detergentes HDL o HDD se llevaron a cabo a 25 °C durante 15 min, mientras que los ensayos de lavado de vajilla automático (ADW) se llevaron a cabo a 40 °C durante 30 min.

[0208] Tras la incubación, se transfirieron 100 µl de sobrenadante a una microplaca nueva (Costar 9017) y se leyó la absorbancia a 600 nm, en el caso de las muestras EMPA-116, o a 405 nm, en el caso de las muestras PAS-38, empleando el lector de placas SpectraMax. Se sustrajo la absorbancia de un control solo con tampón y los valores de OD resultantes a 600 nm (para detergentes HDL y HDD) y a 405 nm (para detergentes ADW) se representaron en función de la concentración de proteasa. Los datos se ajustaron utilizando la ecuación de Langmuir. La eficacia de limpieza de BspAI02518 en diversos detergentes se muestra en la figura 5A-5C, mientras que la eficacia de limpieza de BspU02193 en diversos detergentes se muestra en la figura 6A-B.

EJEMPLO 7

Identificación de proteasas homólogas

[0209] Las secuencias de aminoácidos de las formas maduras de BspAI02518 (SEQ ID n.º 3) y BspU02193 (SEQ ID n.º 6) se sometieron a una búsqueda de BLAST (Altschul *et al.*, Nucleic Acids Res, 25:3389-402, 1997)

en la base de datos de proteínas no redundante del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*, Centro Nacional para la Información Biotecnológica). Se ejecutó una búsqueda similar en la base de datos de patentes Genome Quest con parámetros de búsqueda configurados en valores por defecto utilizando SEQ ID n.º 3 y SEQ ID n.º 6, respectivamente, como secuencias problema. Los subconjuntos de los resultados de búsqueda se muestran en las tablas 7-1 y 7-2 para BspAI02518, y en las tablas 7-3 y 7-4 para BspU02193. El porcentaje de identidad (PID) para ambos conjuntos de búsqueda se definió como el número de residuos idénticos dividido por el número de residuos alineados en el alineamiento de pares. La columna denominada «Longitud de secuencia» hace referencia a la longitud (en aminoácidos) de las secuencias de proteínas asociadas a los n.os de acceso listados, mientras que la columna denominada «Longitud de alineamiento» hace referencia a la longitud (en aminoácidos) de la secuencia de proteínas alineada que se utiliza para el cálculo del PID.

Tabla 7-1. Porcentaje de identidad (PID) compartido por BspAI02518 con entradas en la base de datos de proteínas no redundante del NCBI

N.º de acceso	PID	Organismo	Longitud de secuencia	Longitud de alineamiento
BAA05540	68	AprM de *Bacillus* sp.	361	268
BAB04574	68	*C-125* de *B. halodurans*	361	268
ABI26631	68	*B. clausii*	361	268
ADD64465	67	*JB99 de Bacillus* sp.	361	268
ADC49870	67	*OF4* de *B. pseudofirmus*	374	271
BAA06157	64	*B.* sp. *Sendai* [G-825-6 de *Bacillus* sp.]	382	267
BAD63300	64	*KSM-K16* de *B. clausii*	380	268
AAA22212	63	*B. alcalophilus*	380	268
P29600	63	*B. lentus*	269	268
BAA25184	62	AprN de *Bacillus* sp.	379	267
AFK08970	62	*B. lehensis*	378	267
AAA87324	61	*B. subtilis*	378	267
BAD11988.2	60	*KSM-LD1* de *Bacillus* sp.; tipo SA	376	273
AAC43580	60	SprC de *Bacillus* sp.	378	273
YP_003972439	60	*B. atrophaeus*	382	273
BAD21128.1	60	*KSM-LD1* de *Bacillus* sp.; tipo SB	377	274
AAC43581	59	SprD de *Bacillus* sp.	379	274
WP_007497196	59	LAMA 585 de *B. stratosphericus*	383	275
CAJ70731	58	*B. licheniformis*	379	272
ADN04910	58	*B. circulans*	275	275
AFP23380	58	*B. lehensis*	276	275

N.º de acceso	PID	Organismo	Longitud de secuencia	Longitud de alineamiento
ADK11996	58	*B. pumulis*	383	275
WP_010333625	58	*B. mojavensis*	381	273
CAA74536	58	*Cepa 168 de B. subtilis*	381	273
CAA24990	57	*B. amyloliquefaciens*	376	273
ABY25856	57	*Geobacillus stearothermophilus*	382	273
AGC81872	57	*B. methylotrophicus*	382	273
WP_010329279	57	*B. vallismortis*	381	273
BAN09118	57	*B. subtilis*	381	273
WP_006636716	55	*B. sonorensis*	378	272

Tabla 7-2. Porcentaje de identidad (PID) compartido por BspAI02518 con entradas en la base de datos Genome Quest

Patente - SEQ	PID	Organismo	Longitud de secuencia	Longitud de alineamiento
US20110045572-0011	68,5	*B. lentus*	268	267
WO9100345-0009	68,5	*Sintético*	268	267
WO2009087508-0006	68,3	*B. halodurans*	301	268
CN101270347-0003	68,3	*B. clausii*	360	268
JP1994078778	68,3	*B18-1* de *Bacillus* sp.	361	268
DE102009027540	68,3	*Bacillus* sp.	269	268
DE102009027540	68,3	*Bacillus* sp.	269	268
JP1998066576-0001	67,9	*B. subtilis*	374	271
US20110028378-0002	67,8	*Bacillus* sp.	268	267
US7449187-0009	67,8	*Bacillus* sp.	272	270
US20030049619-0008	67,7	*Bacillus* sp.	375	272
US20040063155-0001	67,5	*B. lentus*	361	268
JP2011155932	67,5	*B. halodurans*	361	268
JP2011155932	67,5	*FA30-01* de *B. pseudofirmus*	374	271
JP2011155932	67,5	*NKS-21* de *Bacillus* sp.	374	271

Patente - SEQ	PID	Organismo	Longitud de secuencia	Longitud de alineamiento
US6908991-0002	67,4	*Bacillus* sp.	268	267
WO2012151480	64,6	*B. lentus*	269	268
DE10064983	64,6	*B. alcalophilus*	269	268
WO2010123754-0050	64,6	*B. clausii*	269	268
JP2012135214-0006	64,6	*KSM-K16* de *B. clausii*	269	268
US20130071910-0007	64,6	*B. lentus*	269	268
JP2008022828	64,6	*KSM-K16* de *B. clausii*	355	268
US20050009167-0002	64,6	*DSM 14390* de *Bacillus* sp.	380	268
EP0415296	64,2	*B. alcalophilus*	269	268
WO9402618	64,2	*B. novalis*	269	268
WO2012151480	63,8	*B. lentus*	269	268
WO9402618	63,8	*B. novalis*	269	268
EP2100948	63,8	PB92 de *B. alcalophilus*	269	268
WO9402618	63,4	*B. novalis*	269	268

Tabla 7-3. Porcentaje de identidad (PID) compartido por BspU02193 con entradas en la base de datos de proteínas no redundante del NCBI

N.º de acceso	PID	Organismo	Longitud de secuencia	Longitud de alineamiento
ERN52602	66	*DSM21297* de *B. marmarensis*	374	271
ADC49870	65	*OF4* de *B. pseudofirmus*	374	271
BAB04574	64	*C-125* de *B. halodurans*	361	267
ABI26631	64	*B. clausii*	361	267
ADD64465	64	*JB99* de *Bacillus* sp.	361	267
BAA05540	64	AprM de *Bacillus* sp.	361	267
BAA25184	62	AprN de *Bacillus* sp.	379	266
AFK08970	62	*B. lehensis*	378	266
BAD63300	61	*KSM-K16* de *B. clausii*	380	266
AAA22212	61	*B. alcalophilus*	380	266

N.º de acceso	PID	Organismo	Longitud de secuencia	Longitud de alineamiento
AAA87324	61	*B. subtilis*	378	266
AAC43580	61	SprC de *Bacillus* sp.	378	272
AGS78407	60	*B. gibsonii*	375	266
P29600	60	*B. lentus*	269	266
BAA06157	59	*B.* sp. *Sendai* [G-825-6 de *Bacillus* sp.]	382	267
BAD11988.2	59	*KSM-LD1* de *Bacillus* sp.; tipo SA	376	273
YP_003972439	59	*B. atrophaeus*	382	273
BAD21128.1	59	*KSM-LD1* de *Bacillus* sp.; tipo SB	377	274
CAJ70731	59	*B. licheniformis*	379	272
WP_007497196	59	LAMA 585 de *B. stratosphericus*	383	275
AAC43581	58	SprD de *Bacillus* sp.	379	273
WP_006636716	58	*B. sonorensis*	378	272
AFP23380	57	*B. lehensis*	276	273
ADK11996	57	*B. pumulis*	383	273
WP_010329279	57	*B. vallismortis*	381	273
ADN04910	56	*B. circulans*	275	273
WP_010333625	56	*B. mojavensis*	381	273
CAA74536	56	*Cepa 168 de B. subtilis*	381	273
BAN09118	56	*B. subtilis*	381	273
CAA24990	55	*B. amyloliquefaciens*	376	273
ABY25856	54	*Geobacillus stearothermophilus*	382	273
AGC81872	54	*B. methylotrophicus*	382	273

Tabla 7-4. Porcentaje de identidad (PID) compartido por BspU02193 con entradas en la base de datos Genome Quest

Patente - SEQ	PID	Organismo	Longitud de secuencia	Longitud de alineamiento
US20030049619-0008	65,8	*Bacillus* sp.	375	272
JP2011155932-0012	66,1	*FA30-01* de *B. pseudofirmus*	374	271

Patente - SEQ	PID	Organismo	Longitud de secuencia	Longitud de alineamiento
US7449187-0009	65,7	*Bacillus* sp.	272	271
JP1998066577-0001	65,7	*B. subtilis*	374	271
JP2011155932	65,7	*NKS-21* de *Bacillus* sp.	374	271
DE102009027540	65,2	*Bacillus* sp.	269	267
US20110045572-0048	65,0	*Bacillus*	268	266
DE102009027540	64,8	*Bacillus* sp.	269	267
CN101270347-0003	64,8	*B. clausii*	360	267
JP1994078778	64,8	*B18-1* de *Bacillus* sp.	361	267
JP2011155932	64,4	*B. halodurans*	361	267
US20040063155-0001	64,0	*B. lentus*	361	267
US20090099056-0002	64,3	*Bacillus*	268	266
US20050003504-0003	64,3	*DSM 14391* de *B. gibsonii*	269	266
WO2012119955-0006	63,5	*Bacillus* sp.	269	266
US7569226-0002	62,4	*DSM 14392* de *Bacillus* sp.	374	266
US7642080-0002	62,4	*Cepa Zi344* de *Bacillus* sp.	381	266
EP0516200	61,8	*Sintético*	270	267
WO9402618	61,7	*B. novalis*	269	266
EP2100948	61,7	*PB92* de *B. alcalophilus*	269	266
US8460893-0043	61,7	*KSM-K16* de *B. clausii*	380	266
WO2012151534	61,3	*B. lentus*	269	266
US20130123162	60,9	*B. lentus*	269	266

[0210] La secuencia de aminoácidos de las formas maduras de la proteasa BspAI02518 (SEQ ID n.º 3) o BspU02193 (SEQ ID n.º 6) se alineó con las secuencias de aminoácidos de varias proteasas listadas en las tablas 7-1 a 7-4 utilizando el *software* CLUSTALW (Thompson *et al.*, Nucleic Acids Research, 22:4673-4680, 1994) con los parámetros por defecto. La figura 7A-F muestra el alineamiento múltiple de secuencias con CLUSTAL W (1.83).

[0211] Se construyó un árbol filogenético para secuencias de aminoácidos de las formas maduras de la proteasa BspAI02518 (SEQ ID n.º 3) y BspU02193 (SEQ ID n.º 6) utilizando las secuencias de aminoácidos de varias proteasas listadas en las tablas 7-1 a 7-4. Las secuencias se introdujeron en el conjunto de programas Vector NTI Advance, y se creó un árbol guía utilizando el método de unión de vecinos (*neighbor joining*, NJ) (Saitou y Nei, Mol Biol Evol, 4:406-425, 1987). El método NJ funciona en una matriz de distancias entre todos los pares de secuencias que se vayan a analizar. Las distancias se relacionan con el grado de divergencia entre las secuencias. El árbol guía se calculó después de haber alineado las secuencias. La construcción del árbol se calculó utilizando los siguientes parámetros: corrección de Kimura para la distancia entre secuencias e ignorando

las posiciones con huecos. AlignX muestra los valores de distancia calculados entre paréntesis a continuación del nombre de la molécula que se muestra en el árbol representado en la figura 8.

EJEMPLO 8

Identificación de serina proteasas adicionales de *Bacillus* spp.

[0212] Se identificaron subtilisinas adicionales mediante la secuenciación de los genomas de especies de *Bacillus* adicionales. *B. akibai* con n.º ATCC 43226 se obtuvo a través de la American Type Culture Collection (ATCC). La cepa DSM 8720 de *B. clarkii* se obtuvo a través de DSMZ (Leibniz-Institut DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH). La cepa SWT66_254731 de *B. clarkii* se obtuvo a través de DuPont Culture Collection. La secuenciación, recopilación y anotación del genoma se llevó a cabo fundamentalmente según lo descrito en el ejemplo 1. Los tres genomas codificaban proteínas homólogas a BspAI02518 y BspU02193.

Serina proteasa Bakn00315

[0213] La secuencia de nucleótidos de *Bakn00315n* se expone como la SEQ ID n.º 9:

ATGCGAGTTTTGAAAGGTAACAAACTAACTGGTTTGCTTCTTGGGTTTATTTTAGTATTTTCTT
TCGCGTTTTTATCACTATCGGTTAGCGCTAATGGCAACGGGAATGGCAATGGCGTAGAAAGACA
TGACTATTTAATAGGGTTTCACGAAAAGGTAGATAAAAAAGCCATTACTCAAGCAAGCGGAGAA
GTAGTTCACGAATATCAGTATATGCCTGTTCTTCATGTGAAACTTCCAGAAAAAGCAGCAAAAG
CTTTAGAAAAAAATCCTAATATTGCTTATGTTGAAAAAGACGAAGAGGTTACTGCTTCACAAAC
GGTTCCTTGGGGAATTAATCATATTCAAGCTCCAACCGTACATTCTTGGGGGAATCGCGGAAAC
GGTGTTCGTGTCGCTGTGTTAGATTCAGGGGTTGCTTCCCATGAAGATTTAAGAATTTCTGGTG
GTAGAAGTTTCATTACTAGCGAGCCTTCTTATCAAGATTATAATGGCCATGGAACTCATGTAGC
TGGTACCATCGCTGGGTTAAATAATAGTTATGGCGTACTTGGTGTCGCACCTAATGTTAACCTT
TACGCAGTAAAAGTATTAGATCGTAATGGAAGTGGATCTCACAGTGCGATTGCACAAGGAATTG
AATGGTCTGTTAGCAACGGTATGCATATTGTTAACATGAGCTTAGGTGGGCCAACAGGTTCAAC
AACGCTTCAACGTGCCGCCGATAATGCTTATAATAGAGGTGTTCTCCTTATCGCTGCAGCTGGT
AACACGGGTTCTGCCGGTATTTCCTATCCAGCTAGATACAACTCTGTTATGGCAGTAGGTGCTG
TTGACTCCAATAACAATCGTGCTTCATTTTCAACTTTTGGAAACGAATTAGAAATTATGGCACC

AGGAGTATCCATTTTAAGCACACACCTTTCAAATCAATATGTTTCTTTAAACGGTACATCAATG
GCAAGTCCACATGTTGCTGGTGTTGCAGCTTTGGTGAAAGCTCAATATCCAAGTGCGACTAATG
CCCAAATCAGACAAAGACTAAGAGATACTGCCACACCACTTGGTAGTTCATATTACTTTGGAAA
TGGTTTAGTGCATGCTGCTAGAGCGGCGAAT.

[0214] La secuencia de aminoácidos de la preproenzima codificada por *Bakn00315n* se expone como la SEQ ID n.º 10 y se introdujo en la base de datos de proteínas no redundante del NCBI en febrero de 2014 con el número de acceso GAE36608:

MRVLKGNKLTGLLLGFILVFSFAFLSLSVSA*NGNGNGNGVERHDYLIGFHEKVDKKAITQASGE*
*VVHEYQYMPVLHVKLPEKAAKALEKNPNIAYVEKDEEVTA*SQTVPWGINHIQAPTVHSWGNRGN
GVRVAVLDSGVASHEDLRISGGRSFITSEPSYQDYNGHGTHVAGTIAGLNNSYGVLGVAPNVNL
YAVKVLDRNGSGSHSAIAQGIEWSVSNGMHIVNMSLGGPTGSTTLQRAADNAYNRGVLLIAAAG
NTGSAGISYPARYNSVMAVGAVDSNNNRASFSTFGNELEIMAPGVSILSTHLSNQYVSLNGTSM
ASPHVAGVAALVKAQYPSATNAQIRQRLRDTATPLGSSYYFGNGLVHAARAAN.

[0215] En el N-terminal, la preproenzima presenta un péptido señal con una longitud prevista de 31 aminoácidos (***en negrita y cursiva*** en la SEQ ID n.º 10) según lo determinado mediante el uso de SignalP-NN (Emanuelsson *et al.*, Nature Protocols, 2:953-971, 2007). La presencia de una secuencia de péptido señal indica que esta serina proteasa es una enzima secretada. Al igual que otras serina proteasas, la enzima presenta una prosecuencia con una longitud prevista de 73 aminoácidos (*en cursiva* en la SEQ ID n.º 10). La predicción de la prosecuencia se basó en el conocimiento de la unión promadura en serina proteasas homólogas, tales como la proteasa BPN' (Wells *et al.*, Nucleic Acids Res, 11:7911-25, 1983) y PB92 (van der Laan *et al.*, Appl Environ Microbiol, 57:901-909, 1991).

[0216] La secuencia de aminoácidos de la enzima madura totalmente procesada, Bakn00315 (269 aminoácidos), se expone como la SEQ ID n.º 11:

SQTVPWGINHIQAPTVHSWGNRGNGVRVAVLDSGVASHEDLRISGGRSFITSEPSYQDYNGHGT
HVAGTIAGLNNSYGVLGVAPNVNLYAVKVLDRNGSGSHSAIAQGIEWSVSNGMHIVNMSLGGPT
GSTTLQRAADNAYNRGVLLIAAAGNTGSAGISYPARYNSVMAVGAVDSNNNRASFSTFGNELEI
MAPGVSILSTHLSNQYVSLNGTSMASPHVAGVAALVKAQYPSATNAQIRQRLRDTATPLGSSYY
FGNGLVHAARAAN.

Serina proteasa Bcl04009

[0217] La secuencia de nucleótidos de *Bcl04009n* se expone como la SEQ ID n.º 12:

ATGAAGAATATGAGGTTCATAGGGTTTATTGTTGGGTTTTTACTAGCTTTCACATTCACTTTTT
CAGCGGTGAGTGCAGATAGCAAAGGTGTCGAAAAGTTTGATTACTTAATTGGTTTTAAAGACAA
AGTTAATGAGAACACAGTTACCCAGCTTGGCGGCGATGTCCAGCATGAATACGAGTATATGGAG
GTTCTCCATGTAACCTTGCCGGAAAAAGCTGCGGCAGCACTGAAAAAGAATCCGAACATTGCCT

TTGTGGAAAAAGACGAAGAAGTAACGGCCAGCCAGACCATTCCTTGGGGCATAAACCGTGTTCA
GGCACCAACCGTCCATTCCTGGGGAGCCCGCGGTAACGGAGTAAGAGTTGCTGTTCTTGATACT
GGTATTGCAAGCCACGAAGATTTAAGAATTTCTGGAGGAGCCAGTTTTATCAGCTCGGAACCTT
CCTACAACGACCTTAATGGCCATGGAACGCATGTGGCTGGAACAATAGCTGCCCGGGATAACAG
TTATGGAGTTCTTGGGGTGGCGCCAAACGTTGATCTTTACGCTGTTAAAGTTCTTGACAGAAAC
GGCAGCGGTTCACTTAGCGGTATTGCCCGTGGTATTGAGTGGGCTATTACAAATAATATGGATA
TAGTCAATATGAGTTTAGGTGGTTCGACTGGATCTACTGCATTAAGACAAGCTGCTGATAATGC
TTATAACAGAGGCATTTTACTTGTGGCAGCTGCTGGTAATACAGGCTCTGCAGGGATTTCCTTC
CCAGCTCGGTATAATTCTGTTATGGCAGTAGGTGCTACAGACTCTAACAACAACCGCGCGTCTT
TTTCAACATTTGGAAATGAACTGGAGATAATGGCTCCAGGTGTATCTGTATTAAGTACTTACCC
TACTAACAGATATGTTTCACTTAATGGAACGTCAATGGCAAGCCCTCACGTCGCTGGTGTCGCA
GCATTAGTAAAATCACGCTATCCAAACGCCACCAATGTCCAAATAAGAAACAGACTGAACAGTA
CAGCCACTAATCTGGGAAGCTCTTACTATTTCGGTAATGGTCTCGTTAACGCTGCAAGAGCTGC
GAAT.

[0218] La secuencia de aminoácidos de la preproenzima codificada por *Bcl04009* se expone como la SEQ ID n.º 13:

MKNMRFIGFIVGFLLAFTFTFSAVSA*DSKGVEKFDYLIGFKDKVNENTVTQLGGDVQHEYEYME*
*VLHVTLPEKAAAALKKNPNIAFVEKDEEVTA*SQTIPWGINRVQAPTVHSWGARGNGVRVAVLDT
GIASHEDLRISGGASFISSEPSYNDLNGHGTHVAGTIAARDNSYGVLGVAPNVDLYAVKVLDRN
GSGSLSGIARGIEWAITNNMDIVNMSLGGSTGSTALRQAADNAYNRGILLVAAAGNTGSAGISF
PARYNSVMAVGATDSNNNRASFSTFGNELEIMAPGVSVLSTYPTNRYVSLNGTSMASPHVAGVA
ALVKSRYPNATNVQIRNRLNSTATNLGSSYYFGNGLVNAARAAN.

[0219] En el N-terminal, la preproenzima presenta un péptido señal con una longitud prevista de 26 aminoácidos (***en negrita y cursiva*** en la SEQ ID n.º 13) según lo determinado mediante el uso de SignalP-NN (Emanuelsson *et al.*, Nature Protocols, 2:953-971, 2007). La presencia de un péptido señal indica que esta serina proteasa es una enzima secretada. Al igual que otras serina proteasas, la enzima presenta una prosecuencia con una longitud prevista de 69 aminoácidos (*en cursiva* en la SEQ ID n.º 13). La predicción de la prosecuencia se basó en el conocimiento de la unión promadura en serina proteasas homólogas, tales como la proteasa BPN' (Wells *et al.*, Nucleic Acids Res, 11:7911-25, 1983) y PB92 (van der Laan *et al.*, Appl Environ Microbiol, 57:901-909, 1991).

[0220] La secuencia de aminoácidos de la enzima madura totalmente procesada, Bcl04009 (269 aminoácidos), se expone como la SEQ ID n.º 14:

SQTIPWGINRVQAPTVHSWGARGNGVRVAVLDTGIASHEDLRISGGASFISSEPSYNDLNGHGT
HVAGTIAARDNSYGVLGVAPNVDLYAVKVLDRNGSGSLSGIARGIEWAITNNMDIVNMSLGGST

GSTALRQAADNAYNRGILLVAAAGNTGSAGISFPARYNSVMAVGATDSNNNRASFSTFGNELEI
MAPGVSVLSTYPTNRYVSLNGTSMASPHVAGVAALVKSRYPNATNVQIRNRLNSTATNLGSSYY
FGNGLVNAARAAN.

Serina proteasa SWT66_254731

[0221] La secuencia de nucleótidos de *SWT66_254731n* se expone como la SEQ ID n.º 15:

ATGAAGAATATGAGGTTTATAGGGTTTATTGTAGTGTTTTTACTAGCTTTCACATTCACTTTTT
CAGCGGTGAGTGCAGATAGCAAAGGCGTGGAAAAGTTTGATTACTTAATTGGTTTTAAAGACAA
AGTTAATGAGAACGCAGTTACCCAGCTTGGCGGCGATGTCCAGCATGAATACGAGTACATGGAG
GTTCTCCATGTAACCTTGCCGGAAAAAGCTGCGGCAGCACTGAAAAAGAATCCGAACATTGCTT
TTGTGGAAAAAGACGAAGAAGTAACGGCCAGCCAGACCGTTCCCTGGGGCATTAACCGTGTTCA
GGCACCAACCGTCCATTCCTGGGGAGCCCGCGGTAACGGAGTAAGAGTTGCTGTTCTTGATACT
GGAATTGCAAGCCACGAAGATTTAAGGATTTCCGGAGGAGCCAGTTTTATCAGCTCGGAACCTT
CCTACAACGACCTTAATGGCCATGGAACGCATGTGGCTGGAACAATAGCTGCCCGGGATAACAG
TTATGGAGTTCTTGGTGTGGCGCCAAACGTTAATCTTTATGCAGTTAAAGTTCTTGACAGAAAC
GGCAGCGGTTCACTTAGCGGCATTGCCCGGGGTATTGAGTGGGCTATTACAAATAATATGGATA
TAGTCAATATGAGTTTAGGTGGTTCAACCGGATCCACTGCATTAAGACAAGCTGCTGATAACGC
GTATAACAGGGGAATTTTACTTGTTGCTGCCGCTGGTAATACAGGCTCTGCAGGAATCTCCTTC
CCGGCTCGGTATAATTCAGTTATGGCAGTAGGGGCTACAGACTCTAACAACAACCGCGCGTCTT
TTTCAACATTTGGAAATGAACTGGAGATAATGGCTCCAGGTGTATCTGTATTAAGTACTTACCC
AACTAACAGATATGTTTCACTTAATGGGACATCAATGGCAAGCCCTCACGTCGCTGGTGTCGCA
GCATTAGTAAAATCACGCTATCCACACGCAACCAATGTCCAAATAAGAAACAGACTGAACAGTA
CAGCCACCAATCTGGGAAGCTCTTACTATTTCGGAAATGGACTCGTTAACGCTGCGAGAGCGGC
GAAT.

[0222] La secuencia de aminoácidos de la preproenzima codificada por *SWT66_254731n* se expone como la SEQ ID n.º 16:

MKNMRFIGFIVVFLLAFTFTFSAVSA*DSKGVEKFDYLIGFKDKVNENAVTQLGGDVQHEYEYME*
*VLHVTLPEKAAAALKKNPNIAFVEKDEEVTA*SQTVPWGINRVQAPTVHSWGARGNGVRVAVLDT
GIASHEDLRISGGASFISSEPSYNDLNGHGTHVAGTIAARDNSYGVLGVAPNVNLYAVKVLDRN
GSGSLSGIARGIEWAITNNMDIVNMSLGGSTGSTALRQAADNAYNRGILLVAAAGNTGSAGISF
PARYNSVMAVGATDSNNNRASFSTFGNELEIMAPGVSVLSTYPTNRYVSLNGTSMASPHVAGVA
ALVKSRYPHATNVQIRNRLNSTATNLGSSYYFGNGLVNAARAAN.

[0223] En el N-terminal, la preproenzima presenta un péptido señal con una longitud prevista de 26 aminoácidos (***en negrita y cursiva*** en la SEQ ID n.º 16) según lo determinado mediante el uso de SignalP-NN (Emanuelsson *et al*., Nature Protocols, 2:953-971, 2007). La presencia de un péptido señal indica que esta serina proteasa es una enzima secretada. Al igual que otras serina proteasas, la enzima presenta una prosecuencia con una longitud prevista de 69 aminoácidos (*en cursiva* en la SEQ ID n.º 16). La predicción de la prosecuencia se basó en el conocimiento de la unión promadura en serina proteasas homólogas, tales como la proteasa BPN' (Wells *et al*., Nucleic Acids Res, 11:7911-25, 1983) y PB92 (van der Laan *et al*., Appl Environ Microbiol, 57:901-909, 1991).

[0224] La secuencia de aminoácidos de la enzima madura totalmente procesada, SWT66_254731, en algunos casos denominada SWT66 (269 aminoácidos), se expone como la SEQ ID n.º 17:

SQTVPWGINRVQAPTVHSWGARGNGVRVAVLDTGIASHEDLRISGGASFISSEPSYNDLNGHGT
HVAGTIAARDNSYGVLGVAPNVNLYAVKVLDRNGSGSLSGIARGIEWAITNNMDIVNMSLGGST
GSTALRQAADNAYNRGILLVAAAGNTGSAGISFPARYNSVMAVGATDSNNNRASFSTFGNELEI
MAPGVSVLSTYPTNRYVSLNGTSMASPHVAGVAALVKSRYPHATNVQIRNRLNSTATNLGSSYY
FGNGLVNAARAAN.

[0225] En la figura 9A-B se muestra un alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las formas maduras de las subtilisinas BspAI02518, BspU02193, Bakn00315, Bcl04009 y SWT66_254731 con las secuencias de las formas maduras de subtilisinas de *B. amyloliquefaciens, B. lentus, B. licheniformis, LG12* de *Bacillus* sp.*,* y *B. pseudofirmus* (n.^{os} de acceso a NCBI CAA24990, P29600, CAJ70731, AAC43580 y ADC49870, respectivamente). Las secuencias se alinearon utilizando el *software* CLUSTALW (Thompson *et al*., Nucleic Acids Research, 22:4673-4680, 1994) con los parámetros por defecto.

Tabla 8-1. Porcentaje de identidad (PID) compartido por subtilasas de *Bacillus*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1 SWT66_254731	100	84	99	74	74	67	63	64	65	58
2 Bakn00315		100	84	80	75	71	61	64	59	57
3 Bcl04009			100	74	74	66	63	64	65	58
4 BspAI02518				100	68	68	64	60	58	59
5 BspU02193					100	66	60	62	59	56
6 Bps_ADC49870						100	63	62	62	57
7 Ble_P29600							100	64	62	61
8 Bsp_AAC43580								100	71	65
9 Bli_CAJ70731.1									100	70
10 Bam_CAA24990										100

[0226] Se construyó un árbol filogenético para secuencias de aminoácidos de las formas maduras de las subtilisinas de la tabla 8-1. Las secuencias se introdujeron en el conjunto de programas Vector NTI Advance, y se creó un árbol guía utilizando el método de unión de vecinos (*neighbor joining*, NJ) (Saitou y Nei, Mol Biol Evol, 4:406-425, 1987). La construcción del árbol se calculó utilizando los siguientes parámetros: corrección de Kimura para la distancia entre secuencias e ignorando las posiciones con huecos. AlignX muestra los valores de distancia calculados entre paréntesis a continuación del nombre de la molécula que se muestra en el árbol representado en la figura 10.

EJEMPLO 9

Eficacia de limpieza de la subtilisina SWT66_254731

[0227] La eficacia de limpieza de la subtilisina SWT66_254731 se analizó en micromuestras BMI (sangre/leche/tinta sobre algodón) (EMPA-116, Center for Testmaterials, Países Bajos) para aplicaciones a base de ropa, y sobre micromuestras de yema de huevo (yema de huevo sobre tejido poliacrílico, envejecido y teñido con tinte negro de carbón) (PAS-38, Center for Testmaterials, Países Bajos) para aplicaciones a base de vajilla, según lo descrito en el ejemplo 6. Las microplacas (Corning 3641) que contenían muestras ya perforadas (para ajustarse a la microplaca) se enjuagaron, o bien no se lavaron, para los ensayos ADW, y se llenaron con detergente antes de la adición de enzimas. Se utilizó una micromuestra en el ensayo HDD y se utilizaron 2 micromuestras en ensayos HDL. La eficacia de limpieza de la subtilisina SWT66_254731 en diversos detergentes se muestra en las figuras 11A-11F.

EJEMPLO 10

Identificación de serina proteasas adicionales de *B. akibai*

[0228] Se identificaron subtilisinas adicionales mediante la secuenciación de los genomas de especies adicionales de *B. akibai*. Las cepas ACB102_2847966, COG104_4065768, ACB83_2687815, ACB90_2720294, ACB82_2683104, ACB89_2715301, ACB92_2732966 y DETPh35_2828044 de *B. akibai* se obtuvieron a través de DuPont Culture Collection. La secuenciación, recopilación y anotación del genoma se llevó a cabo fundamentalmente según se describe en el ejemplo 1. Todos los genomas codificaban proteínas homólogas a BspAI02518 y BspU02193.

Serina proteasa ACB102_

[0229] La secuencia de nucleótidos de ACB102_2847966.n se expone como la SEQ ID n.º 18:

ATGAAAATGAAATGGTCACGTTTAATTTTAACCCTAGTTCTCGTATTGAGTTTTGTA
TTCCCATCTATGACAAGTGCAAACTCCGCTGTAGAAAAAGAGGATTATCTGATCGG
TTTTAAGCAGAAAGGGAATGTTAGTGCACAAGTTGTGAATATGAGTGGAGGAGAAG
TCGTACATGAATATGAACATATGCCAGTCTTGCACGTTAAATTACCTCCACAAGCTG
CTAAAGCGTTAGAAAAGAACCCAAATATTGAATACATCGAAAAAGATGAAAAAGT
CCAAGCTACAGCACAATCGACACCTTGGGGGATTTCACGTATTAATGCTCCTGCTGT
TCACTCGACTGGTAATTTTGGACAAGGTGTCCGAGTTGCCGTTTTAGATAGTGGAGT
TGCTTCTCATGAAGACTTACGGATTGCTGGGGGAGTGAGCTTTGTCGCTTCAGAACC

TAGTTATCAAGATTATAATGGTCACGGAACACATGTTGCTGGAACCATTGCTGGTTT
AAATAATAGTGTTGGGGTCCTTGGTGTAGCTCCATCTGTCCAATTATATGCGGTTAA
GGTGTTGGATCGTAATGGCGGGGGGAATCATAGTGACATTGCTAGAGGAATTGAGT
GGTCAGTTAATAATGGAATGCATGTGGTGAATATGAGTTTAGGTGGACCAACAGGG
TCAACGACTCTTCAACGAGCAGCGGATAATGCTTATAACAGAGGAGTTCTTTTAATT
GCCGCAGCTGGTAACACGGGAACTAGTGGGGTTAGCTTCCCTGCGCGTTATAGCTCT
GTAATGGCAGTAGCCGCAACAGACTCTAATAATAACCGTGCTTCATTTTCAACTTAT
GGTCCAGAAATTGAAATTTCAGCACCTGGAGTTGGCATTAATAGCACGTATCCAAC
GAATCGTTATTCAAGCTTAAATGGAACATCAATGGCTTCACCTCATGTCGCTGGTGT
AGCAGCTCTTGTGAAGGCGAGATATCCAAGTGCGACGAATGCTCAGATTAGACAAC
ATCTTCGTAGCACTTCTACGTATCTAGGAAACTCAACTTACTATGGTAGTGGTTTAG
TTGATGCACAGCGTGCAGCTAACTAA.

[0230] La secuencia de aminoácidos de la preproenzima codificada por ACB102_2847966.n se expone como la SEQ ID n.º 19:

MKMKWSRLILTLVLVLSFVFPSMTSANSAVEKED*YLIGFKQKGNVSAQVVNMSGGEVVH*
*EYEHMPVLHVKLPPQAAKALEKNPNIEYIEKDEKVQAT*AQSTPWGISRINAPAVHSTGNFG
QGVRVAVLDSGVASHEDLRIAGGVSFVASEPSYQDYNGHGTHVAGTIAGLNNSVGVLG
VAPSVQLYAVKVLDRNGGGNHSDIARGIEWSVNNGMHVVNMSLGGPTGSTTLQRAAD
NAYNRGVLLIAAAGNTGTSGVSFPARYSSVMAVAATDSNNNRASFSTYGPEIEISAPGV
GINSTYPTNRYSSLNGTSMASPHVAGVAALVKARYPSATNAQIRQHLRSTSTYLGNSTY
YGSGLVDAQRAAN.

[0231] En el N-terminal, la preproenzima presenta un péptido señal con una longitud prevista de 29 aminoácidos (en negrita y cursiva en la SEQ ID n.º 19) según lo determinado mediante el uso de SignalP-NN (Emanuelsson *et al.*, Nature Protocols, 2:953-971, 2007). La presencia de un péptido señal indica que esta serina proteasa es una enzima secretada. Al igual que otras serina proteasas, la enzima presenta una prosecuencia con una longitud prevista de 68 aminoácidos (en cursiva en la SEQ ID n.º 19). La predicción de la prosecuencia se basó en el conocimiento de la unión promadura en serina proteasas homólogas, tales como la proteasa BPN' (Wells *et al.*, Nucleic Acids Res, 11:7911-25, 1983) y PB92 (van der Laan *et al.*, Appl Environ Microbiol, 57:901-909, 1991).

[0232] La secuencia de aminoácidos de la enzima madura totalmente procesada, ACB102 (269 aminoácidos), se expone como la SEQ ID n.º 20:

AQSTPWGISRINAPAVHSTGNFGQGVRVAVLDSGVASHEDLRIAGGVSFVASEPSYQDY
NGHGTHVAGTIAGLNNSVGVLGVAPSVQLYAVKVLDRNGGGNHSDIARGIEWSVNNG

MHVVNMSLGGPTGSTTLQRAADNAYNRGVLLIAAAGNTGTSGVSFPARYSSVMAVAA
TDSNNNRASFSTYGPEIEISAPGVGINSTYPTNRYSSLNGTSMASPHVAGVAALVKARYP
SATNAQIRQHLRSTSTYLGNSTYYGSGLVDAQRAAN.

Serina proteasa COG104

[0233] La secuencia de nucleótidos de COG104_4065768.n se expone como la SEQ ID n.º 21:

ATGAAAATGAAATGGTCACGTTTAATTTTAACCCTGGTTCTCGTATTCAGTTTTGTAT
TCCCATCTATGACAAGTGCAAACTCCGCTGTAGAAAAAGAGGACTATCTGATCGGT
TTTAAACAGAAAGGGAATGTTAGTGCACAAGTTGTGAATATGAGTGGAGGAGAAGT
CGTCCATGAATATGAACATATGCCAGTCTTGCACGTTAAATTACCTTCACAAGCTGC
TAAAGCGTTAGAAAAGAACCCCAATATTGAATACATTGAAAAAGATGAAAAAGTCC
AAGCAACAGCACAATCGACACCTTGGGGAATTTCACGTATTAATGCTCCTGCTGTTC
ACTCGACTGGTAATTTTGGACAAGGTGTCCGAGTTGCGGTTTTAGATAGTGGAGTTG
CTTCTCATGAAGACTTACGGATTGCTGGGGGAGTGAGCTTTGTCGCTTCAGAACCTA
GTTATCAAGATTATAATGGTCACGGAACACATGTTGCTGGAACCATTGCTGGTTTAA
ATAATAGTGTTGGGGTCCTTGGTGTAGCTCCATCTGTCCAATTATATGCGGTTAAGG
TGTTGGATCGTAATGGCGGGGGAAATCATAGTGACATTGCTAGAGGAATTGAGTGG
TCAGTTAATAATGGAATGCATGTGGTGAATATGAGTTTAGGTGGACCAACAGGGTC
AACTACTCTTCAACGAGCAGCGGATAATGCTTATAACAGAGGAGTTCTTTTAATTGC
CGCAGCTGGGAACACGGGAACTAGTGGAGTTAGCTTCCCTGCGCGTTACAGCTCAG
TAATGGCAGTAGCCGCAACAGATTCTAATAATAACCGTGCTTCATTTTCAACTTATG
GAACACAAATTGAAATTTCAGCACCTGGAGTTGGCATTAATAGCACGTATCCAACG
AATCGTTATTCAAGTTTAAATGGAACATCAATGGCTTCACCTCATGTAGCTGGTGTA
GCGGCCCTAGTGAAGGCGAGATATCCAAGTGCGACGAATGCTCAGATTAGACAACA
TCTTCGTAGCACTTCTACGTATCTAGGAAACTCAACTTACTATGGTAGTGGTCTAGT
TGATGCACAACGTGCAGCTAACTAA.

[0234] La secuencia de aminoácidos de la preproenzima codificada por COG104_4065768.n se expone como la SEQ ID n.º 22:

MKMKWSRLILTLVLVFSFVFPSMTSANSA*VEKEDYLIGFKQKGNVSAQVVNMSGGEVVHE*
*YEHMPVLHVKLPSQAAKALEKNPNIEYIEKDEKVQAT*AQSTPWGISRINAPAVHSTGNFGQ
GVRVAVLDSGVASHEDLRIAGGVSFVASEPSYQDYNGHGTHVAGTIAGLNNSVGVLGV
APSVQLYAVKVLDRNGGGNHSDIARGIEWSVNNGMHVVNMSLGGPTGSTTLQRAADN
AYNRGVLLIAAAGNTGTSGVSFPARYSSVMAVAATDSNNNRASFSTYGTQIEISAPGVG

INSTYPTNRYSSLNGTSMASPHVAGVAALVKARYPSATNAQIRQHLRSTSTYLGNSTYY
GSGLVDAQRAAN.

[0235] En el N-terminal, la preproenzima presenta un péptido señal con una longitud prevista de 29 aminoácidos (en negrita y cursiva en la SEQ ID n.º 22) según lo determinado mediante el uso de SignalP-NN (Emanuelsson *et al.*, Nature Protocols, 2:953-971, 2007). La presencia de un péptido señal indica que esta serina proteasa es una enzima secretada. Al igual que otras serina proteasas, la enzima presenta una prosecuencia con una longitud prevista de 68 aminoácidos (en cursiva en la SEQ ID n.º 22). La predicción de la prosecuencia se basó en el conocimiento de la unión promadura en serina proteasas homólogas, tales como la proteasa BPN' (Wells *et al.*, Nucleic Acids Res, 11:7911-25, 1983) y PB92 (van der Laan *et al.*, Appl Environ Microbiol, 57:901-909, 1991).

[0236] La secuencia de aminoácidos de la enzima madura totalmente procesada, COG104 (269 aminoácidos), se expone como la SEQ ID n.º 23:

AQSTPWGISRINAPAVHSTGNFGQGVRVAVLDSGVASHEDLRIAGGVSFVASEPSYQDY
NGHGTHVAGTIAGLNNSVGVLGVAPSVQLYAVKVLDRNGGGNHSDIARGIEWSVNNG
MHVVNMSLGGPTGSTTLQRAADNAYNRGVLLIAAAGNTGTSGVSFPARYSSVMAVAA
TDSNNNRASFSTYGTQIEISAPGVGINSTYPTNRYSSLNGTSMASPHVAGVAALVKARY
PSATNAQIRQHLRSTSTYLGNSTYYGSGLVDAQRAAN.

Serina proteasa ACB83

[0237] La secuencia de nucleótidos de ACB83_2687815.n se expone como la SEQ ID n.º 24:

ATGAAAATGAAATGGTCACGTTTAATTTTAACCCTAGTTCTCGTATTCAGTTTTGTAT
TCCCATCTATGACAAGTGCAAACTTCGCTGTAGAAAAAGAGGATTATCTCATCGGTT
TTAAGCAGAAAGGGAATGTTAGTGCACAAGTTGTGAATATGAGTGGAGGAGAAGTC
GTCCATGAATATGAACATATGCCAGTCTTGCACGTGAAATTACCTCCGCAAGCTGCT
AAAGCGTTAGAAAAGAACCCAAATATTGAATACATCGAAAAAGATGAAAAGGTCC
AAGCTACAGCACAATCGACACCTTGGGGGATTTCACGTATTAATGCTCCTGCTGTTC
ACTCGACTGGTAATTTGGGACAAGGTGTCCGAGTTGCCGTTTTAGATAGTGGAGTTG
CTTCTCATGAAGACTTACGGATTGCTGGGGGAGTGAGCTTTGTCGCTTCAGAACCTA
GTTATCAAGATTATAATGGTCACGGAACACATGTTGCTGGAACCATTGCTGGTTTAA
ATAATAGTGTTGGGGTCCTTGGTGTAGCTCCATCTGTCCAATTATATGCGGTTAAGG
TGTTGGATCGTAATGGCGGGGGAAATCATAGTGACATTGCTAGAGGAATTGAGTGG
TCAGTTAATAATGGAATGCATGTGGTGAATATGAGTTTAGGTGGACCAACAGGGTC
AACGACTCTGCAACGAGCAGCGGATAATGCTTATAACAGAGGAGTTCTTTTAATTG
CCGCAGCTGGTAACACGGGAACTAGTGGGGTTAGCTTCCCTGCGCGTTATAGCTCA

5

GTAATGGCAGTAGCCGCAACAGACTCTAATAATAACCGTGCTTCATTTTCAACTTAT
GGTCCAGAAATTGAAATTTCAGCACCTGGAGTTGGCATTAATAGCACGTATCCAAC
GAATCGTTATTCAAGCTTAAATGGAACATCAATGGCTTCACCTCATGTCGCTGGTGT
AGCAGCTCTTGTGAAGGCGAGATATCCAAGTGCGACGAATGCTCAGATTAGACAAC
ATCTTCGTAGCACTTCTACGAATCTAGGAAACTCAACTTACTATGGTAGTGGTCTAG
TTAATGCACAGCGTGCAGCTAACTAA.

[0238] La secuencia de aminoácidos de la preproenzima codificada por ACB83_2687815.n se expone como la SEQ ID n.º 25:

MKMKWSRLILTLVLVFSFVFPSMTSANFA*VEKEDYLIGFKQKGNVSAQVVNMSGGEVVH*
*EYEHMPVLHVKLPPQAAKALEKNPNIEYIEKDEK*VQATAQSTPWGISRINAPAVHSTGNLG
QGVRVAVLDSGVASHEDLRIAGGVSFVASEPSYQDYNGHGTHVAGTIAGLNNSVGVLG
VAPSVQLYAVKVLDRNGGGNHSDIARGIEWSVNNGMHVVNMSLGGPTGSTTLQRAAD
NAYNRGVLLIAAAGNTGTSGVSFPARYSSVMAVAATDSNNNRASFSTYGPEIEISAPGV
GINSTYPTNRYSSLNGTSMASPHVAGVAALVKARYPSATNAQIRQHLRSTSTNLGNSTY
YGSGLVNAQRAAN.

[0239] En el N-terminal, la preproenzima presenta un péptido señal con una longitud prevista de 29 aminoácidos (en negrita y cursiva en la SEQ ID n.º 25) según lo determinado mediante el uso de SignalP-NN (Emanuelsson *et al.*, Nature Protocols, 2:953-971, 2007). La presencia de un péptido señal indica que esta serina proteasa es una enzima secretada. Al igual que otras serina proteasas, la enzima presenta una prosecuencia con una longitud prevista de 68 aminoácidos (en cursiva en la SEQ ID n.º 25). La predicción de la prosecuencia se basó en el conocimiento de la unión promadura en serina proteasas homólogas, tales como la proteasa BPN' (Wells *et al.*, Nucleic Acids Res, 11:7911-25, 1983) y PB92 (van der Laan *et al.*, Appl Environ Microbiol, 57:901-909, 1991).

[0240] La secuencia de aminoácidos de la enzima madura totalmente procesada, ACB83 (269 aminoácidos), se expone como la SEQ ID n.º 26:

AQSTPWGISRINAPAVHSTGNLGQGVRVAVLDSGVASHEDLRIAGGVSFVASEPSYQDY
NGHGTHVAGTIAGLNNSVGVLGVAPSVQLYAVKVLDRNGGGNHSDIARGIEWSVNNG
MHVVNMSLGGPTGSTTLQRAADNAYNRGVLLIAAAGNTGTSGVSFPARYSSVMAVAA
TDSNNNRASFSTYGPEIEISAPGVGINSTYPTNRYSSLNGTSMASPHVAGVAALVKARYP
SATNAQIRQHLRSTSTNLGNSTYYGSGLVNAQRAAN.

Serina proteasa ACB90

[0241] La secuencia de nucleótidos de ACB90_2720294.n se expone como la SEQ ID n.º 27:

ATGAAAATGAAATGGTCACGTTTAATTTTAACCCTAGTTCTCGTATTCAGTTTTGTAT

TCCCATCTATGACAAGTGCAAACTCCGCTGTAGAAAAAGAGGATTATCTCATCGGTT
TTAAGCAGAAAGGGAATGTTAGTGCACAAGTTGTGAATATGAGTGGAGGAGAAGTC
GTCCATGAATATGAACATATGCCAGTCTTGCACGTGAAATTACCTCCGCAAGCTGCT
AAAGCGTTAGAAAAGAACCCAAATATTGAATACATCGAAAAAGATGAAAAGGTCC
AAGCTACAGCACAATCGACACCTTGGGGGATTTCACGTATTAATGCTCCTGCTGTTC
ACTCGACTGGTAATTTGGGACAAGGTGTCCGAGTTGCCGTTTTAGATAGTGGAGTTG
CTTCTCATGAAGACTTACGGATTGCTGGGGGAGTGAGCTTTGTCGCTTCAGAACCTA
GTTATCAAGATTATAATGGTCACGGAACACATGTTGCTGGAACCATTGCTGGTTTAA
ATAATAGTGTTGGGGTCCTTGGTGTAGCTCCATTTGTCCAATTATATGCGGTTAAGG
TGTTGGATCGTAATGGCGGGGGAAATCATAGTGACATTGCTAGAGGAATTGAGTGG
TCAGTTAATAATGGAATGCATGTGGTGAATATGAGTTTAGGTGGACCAACAGGGTC
AACGACTCTGCAACGAGCAGCGGATAATGCTTATAACAGAGGAGTTCTTTTAATTG
CCGCAGCTGGTAACACGGGAACTAGTGGGGTTAGCTTCCCTGCGCGTTATAGCTCA
GTAATGGCAGTAGCCGCAACAGACTCTAATAATAACCGTGCTTCATTTTCAACTTAT
GGTCCAGAAATTGAAATTTCAGCACCTGGAGTTGGCATTAATAGCACGTATCCAAC
GAATCGTTATTCAAGCTTAAATGGAACATCAATGGCTTCACCTCATGTCGCTGGTGT
AGCAGCTCTTGTGAAGGCGAGATATCCAAGTGCGACGAATGCTCAGATTAGACAAC
ATCTTCGTAGCACTTCTACGAATCTAGGAAACTCAACTTACTATGGTAGTGGTCTAG
TTAATGCACAGCGTGCAGCTAACTAA.

[0242] La secuencia de aminoácidos de la preproenzima codificada por ACB90_2720294.n se expone como la SEQ ID n.º 28:

MKMKWSRLILTLVLVFSFVFPSMTSANSA*VEKEDYLIGFKQKGNVSAQVVNMSGGEVVHE*
*YEHMPVLHVKLPPQAAKALEKNPNIEYIEKDEKVQAT*AQSTPWGISRINAPAVHSTGNLGQ
GVRVAVLDSGVASHEDLRIAGGVSFVASEPSYQDYNGHGTHVAGTIAGLNNSVGVLGV
APFVQLYAVKVLDRNGGGNHSDIARGIEWSVNNGMHVVNMSLGGPTGSTTLQRAADN
AYNRGVLLIAAAGNTGTSGVSFPARYSSVMAVAATDSNNNRASFSTYGPEIEISAPGVGI
NSTYPTNRYSSLNGTSMASPHVAGVAALVKARYPSATNAQIRQHLRSTSTNLGNSTYY
GSGLVNAQRAAN.

[0243] En el N-terminal, la preproenzima presenta un péptido señal con una longitud prevista de 29 aminoácidos (en negrita y cursiva en la SEQ ID n.º 28) según lo determinado mediante el uso de SignalP-NN (Emanuelsson *et al.*, Nature Protocols, 2:953-971, 2007). La presencia de un péptido señal indica que esta serina proteasa es una enzima secretada. Al igual que otras serina proteasas, la enzima presenta una prosecuencia con una longitud prevista de 68 aminoácidos (en cursiva en la SEQ ID n.º 28). La predicción de la prosecuencia se basó en el conocimiento de la unión promadura en serina proteasas homólogas, tales como la proteasa BPN' (Wells *et al.*, Nucleic Acids Res, 11:7911-25, 1983) y PB92 (van der Laan *et al.*, Appl Environ Microbiol, 57:901-909, 1991).

[0244] La secuencia de aminoácidos de la enzima madura totalmente procesada, ACB90 (269 aminoácidos), se expone como la SEQ ID n.º 29:

AQSTPWGISRINAPAVHSTGNLGQGVRVAVLDSGVASHEDLRIAGGVSFVASEPSYQDY
NGHGTHVAGTIAGLNNSVGVLGVAPFVQLYAVKVLDRNGGGNHSDIARGIEWSVNNG
MHVVNMSLGGPTGSTTLQRAADNAYNRGVLLIAAAGNTGTSGVSFPARYSSVMAVAA
TDSNNNRASFSTYGPEIEISAPGVGINSTYPTNRYSSLNGTSMASPHVAGVAALVKARYP
SATNAQIRQHLRSTSTNLGNSTYYGSGLVNAQRAAN.

Serina proteasa ACB82

[0245] La secuencia de nucleótidos de ACB82_2683104.n se expone como la SEQ ID n.º 30:

ATGAGAGTTTTAAAAGGTACCAAACTTACCGGTTTACTTCTTGGGTTTATTTTATTAT
TTTCTTTCACCTTTTTGTCATTATCGGTTAGTGCTAACGGGAATGGAGTAGAAAGAC
ATGACTATTTAATAGGGTTTCACGAAAAGGTAGATAAAAAAGCCATAACTCAAGCA
AGCGGAGAAGTAGTTCACGAATATCAGTATATGCCTGTTCTTCATGTAAAGCTTCCA
GAAAAAGCAGCAAAAGCTTTAGAAAAAAATCCTAATATTGCTTATGTTGAAAAAGA
CGAAGAGGTTACTGCTTCACAAACGGTTCCTTGGGGAATTAATCATATTCAAGCTCC
AACTGTACATTCTTGGGGGAATCGCGGAAACGGTGTTCGTGTCGCTGTGCTAGATTC
AGGGGTTGCTTCCCATGAAGATTTAAGAATTTCTGGTGGTAGAAGTTTTATTACTAG
CGAGCCTTCTTATCAAGATTATAATGGCCATGGAACTCATGTAGCTGGTACCATCGC
TGGGTTAAATAATAGTTACGGTGTACTTGGTGTCGCACCTAATGTTAATCTTTACGC
AGTAAAAGTATTAGATCGTAATGGAAGTGGATCTCACAGTGCGATTGCACAAGGGA
TTGAATGGTCTGTTAGCAACGGTATGCATATTGTTAACATGAGCTTAGGTGGGCCAA
CTGGTTCAACAACTCTTCAACGTGCCGCAGATAATGCTTATAATAGAGGTGTTCTTC
TTATCGCTGCAGCTGGAAACACGGGTTCTGCTGGTATTTCCTATCCAGCTAGATACA
ACTCTGTTATGGCTGTAGGTGCCGTTGACTCCAATAATAATCGTGCTTCATTCTCGA
CTTTTGGAAACGAATTAGAAATTATGGCACCAGGAGTATCAATATTAAGCACACAC
CTTTCAAATCAATATGTTTCTTTAAACGGTACATCTATGGCAAGTCCTCATGTAGCT
GGTGTTGCAGCTTTGGTGAAAGCTCAATATCCAAGTGCAACTAATGCCCAAATCAG
ACAAAGACTAAGAGATACTGCCACTCCACTTGGTAGTTCATATTACTTTGGAAATGG
TTTAGTGCATGCTACTAGAGCCGCTAATTAA.

[0246] La secuencia de aminoácidos de la preproenzima codificada por ACB82_2683104.n se expone como la SEQ ID n.º 31:

MRVLKGTKLTGLLLGFILLFSFTFLSLSVSA*NGNGVERHDYLIGFHEKVDKKAITQASGEV*
*VHEYQYMPVLHVKLPEKAAKALEKNPNIAYVEKDEEVTA*SQTVPWGINHIQAPTVHSWGN
RGNGVRVAVLDSGVASHEDLRISGGRSFITSEPSYQDYNGHGTHVAGTIAGLNNSYGVL
GVAPNVNLYAVKVLDRNGSGSHSAIAQGIEWSVSNGMHIVNMSLGGPTGSTTLQRAAD
NAYNRGVLLIAAAGNTGSAGISYPARYNSVMAVGAVDSNNNRASFSTFGNELEIMAPG
VSILSTHLSNQYVSLNGTSMASPHVAGVAALVKAQYPSATNAQIRQRLRDTATPLGSSY
YFGNGLVHATRAAN.

[0247] En el N-terminal, la preproenzima presenta un péptido señal con una longitud prevista de 31 aminoácidos (en negrita y cursiva en la SEQ ID n.º 31) según lo determinado mediante el uso de SignalP-NN (Emanuelsson *et al.*, Nature Protocols, 2:953-971, 2007). La presencia de un péptido señal indica que esta serina proteasa es una enzima secretada. Al igual que otras serina proteasas, la enzima presenta una prosecuencia con una longitud prevista de 69 aminoácidos (en cursiva en la SEQ ID n.º 31). La predicción de la prosecuencia se basó en el conocimiento de la unión promadura en serina proteasas homólogas, tales como la proteasa BPN' (Wells *et al.*, Nucleic Acids Res, 11:7911-25, 1983) y PB92 (van der Laan *et al.*, Appl Environ Microbiol, 57:901-909, 1991).

[0248] La secuencia de aminoácidos de la enzima madura totalmente procesada, ACB82 (269 aminoácidos), se expone como la SEQ ID n.º 32:

SQTVPWGINHIQAPTVHSWGNRGNGVRVAVLDSGVASHEDLRISGGRSFITSEPSYQDY
NGHGTHVAGTIAGLNNSYGVLGVAPNVNLYAVKVLDRNGSGSHSAIAQGIEWSVSNG
MHIVNMSLGGPTGSTTLQRAADNAYNRGVLLIAAAGNTGSAGISYPARYNSVMAVGA
VDSNNNRASFSTFGNELEIMAPGVSILSTHLSNQYVSLNGTSMASPHVAGVAALVKAQ
YPSATNAQIRQRLRDTATPLGSSYYFGNGLVHATRAAN.

Serina proteasa ACB89

[0249] La secuencia de nucleótidos de ACB89_2715301.n se expone como la SEQ ID n.º 33:

ATGAGAGTTTTGAAAGGTAACAAACTTACCGGTTTACTTCTTGGGTTTATTTTAGTA
TTTTCTTTCACCTTTTTGTCATTATCGGTTAGTGCTAACGGGAATGGCAATGGCAATG
GCAATGGAGTAGAGAGACATGACTATTTAATAGGGTTTCACGAAAAGGTAGATAAA
AAAGCCATAACTCAAGCAAGCGGAGAAGTAGTTCACGAATATCAGTATATGCCTGT
TCTTCATGTAAAGCTTCCAGAAAAAGCAGCAAAAGCTTTAGAAAAAAATCCTAATA
TTGCTTATGTTGAAAAAGACGAAGAGGTTACTGCTTCACAAACGGTTCCTTGGGGA
ATTAATCATATTCAAGCTCCAACTGTACATTCTTGGGGGAATCGTGGAAACGGCGTT
CGTGTTGCTGTGTTAGATTCAGGGGTTGCTTCCCATGAAGATTTAAGAATTTTTGGT
GGTAGAAGTTTCATTACTAGCGAGCCTTCTTATCAAGATTATAATGGCCATGGAACT
CATGTCGCCGGAACCATCGCTGGGTTAAATAATAGTTACGGTGTACTTGGTGTTGCA
CCTAATGTTAATCTTTACGCAGTAAAAGTATTAGATCGTAACGGAAGTGGATCTCAC
AGTGCGATTGCACAAGGGATTGAATGGTCTGTTAGCAACGGTATGCATATTGTTAA
CATGAGCTTAGGTGGGCCAACAGGTTCAACAACTCTTCAACGTGCCGCTGATAATG
CTTATAATAGAGGTGTTCTCCTTATCGCTGCAGCTGGTAACACGGGTTCTGCTGGTA
TTTCCTATCCAGCTAGATACAACTCTGTTATGGCTGTAGGTGCCGTTGACTCCAATA
ATAATCGTGCTTCATTCTCGACTTTTGGAAACGAATTAGAAATTATGGCACCAGGAG
TATCAATTTTAAGCACGCACCTTTCAAATCAATATGTTTCTTTAAACGGTACATCTAT
GGCAAGTCCTCATGTAGCTGGTGTTGCAGCTTTGGTGAAAGCTCAATATCCAAGTGC
AACTAATGCCCAAATCAGACAAAGACTAAGAGATACTGCCACTCCACTTGGTAGTT
CATATTACTTTGGAAATGGTTTAGTGCATGCTGCTAGAGCCGCTAATTAA.

[0250] La secuencia de aminoácidos de la preproenzima codificada por ACB89_2715301.n se expone como la SEQ ID n.º 34:

MRVLKGNKLTGLLLGFILVFSFTFLSLSVSA*NGNGNGNGNGVERHDYLIGFHEKVDKKAI*
*TQASGEVVHEYQYMPVLHVKLPEKAAKALEKNPNIAYVEKDEEVTA*SQTVPWGINHIQAPT
VHSWGNRGNGVRVAVLDSGVASHEDLRIFGGRSFITSEPSYQDYNGHGTHVAGTIAGL
NNSYGVLGVAPNVNLYAVKVLDRNGSGSHSAIAQGIEWSVSNGMHIVNMSLGGPTGST
TLQRAADNAYNRGVLLIAAAGNTGSAGISYPARYNSVMAVGAVDSNNNRASFSTFGNE
LEIMAPGVSILSTHLSNQYVSLNGTSMASPHVAGVAALVKAQYPSATNAQIRQRLRDTA
TPLGSSYYFGNGLVHAARAAN.

[0251] En el N-terminal, la preproenzima presenta un péptido señal con una longitud prevista de 31 aminoácidos (en negrita y cursiva en la SEQ ID n.º 34) según lo determinado mediante el uso de SignalP-NN (Emanuelsson *et*

al., Nature Protocols, 2:953-971, 2007). La presencia de un péptido señal indica que esta serina proteasa es una enzima secretada. Al igual que otras serina proteasas, la enzima presenta una prosecuencia con una longitud prevista de 75 aminoácidos (en cursiva en la SEQ ID n.º 34). La predicción de la prosecuencia se basó en el conocimiento de la unión promadura en serina proteasas homólogas, tales como la proteasa BPN' (Wells *et al*., Nucleic Acids Res, 11:7911-25, 1983) y PB92 (van der Laan *et al*., Appl Environ Microbiol, 57:901-909, 1991).

[0252] La secuencia de aminoácidos de la enzima madura totalmente procesada, ACB89 (269 aminoácidos), se expone como la SEQ ID n.º 35:

SQTVPWGINHIQAPTVHSWGNRGNGVRVAVLDSGVASHEDLRIFGGRSFITSEPSYQDY

NGHGTHVAGTIAGLNNSYGVLGVAPNVNLYAVKVLDRNGSGSHSAIAQGIEWSVSNG
MHIVNMSLGGPTGSTTLQRAADNAYNRGVLLIAAAGNTGSAGISYPARYNSVMAVGA
VDSNNNRASFSTFGNELEIMAPGVSILSTHLSNQYVSLNGTSMASPHVAGVAALVKAQ
YPSATNAQIRQRLRDTATPLGSSYYFGNGLVHAARAAN.

Serina proteasa ACB92

[0253] La secuencia de nucleótidos de ACB92_2732966.n se expone como la SEQ ID n.º 36:

ATGCGAGTTTTAAAAGGTACCAAACTTACTGGTTTACTTCTTGGGTTTATTTTAGTAT
TTTCTTTCGCTTTTTTATCACTATCGGTTAGTGCTAATGGCAATGGCGTAGAAAGAC
ATGACTATTTAATAGGGTTTCACGAAAAGGTAGATAAAAAAGCCATAACTCAAGCA
AGCGGAGAAGTAGTTCACGAATATCAGTATATGCCTGTTCTTCATGTAAAGCTTCCA
GAAAAAGCAGCAAAAGCTTTAGAAAAAAATCCTAATATTGCTTATGTTGAAAAAGA
CGAAGAGGTTACTGCTTCACAAACGGTTCCTTGGGGAATTAATCATATTCAAGCTCC
AACTGTACATTCTTGGGGGAATCGTGGAAACGGCGTTCGTGTTGCTGTGTTAGATTC
AGGGGTTGCTTCCCATGAAGATTTAAGAATTTCTGGTGGTAGAAGTTTCATTACTAG
CGAGCCTTCTTATCAAGATTATAATGGCCATGGAACTCATGTCGCCGGAACCATCGC
TGGGTTAAATAATAGTTACGGTGTACTTGGTGTTGCACCTAATGTTAATCTTTACGC
TGTAAAAGTATTAGATCGTAACGGAAGTGGATCTCACAGTGCGATTGCACAAGGGA
TTGAATGGTCTGTTAGCAACGGTATGCATATTGTTAACATGAGCTTAGGTGGGCCAA
CTGGTTCAGCAACTCTTCAACGTGCCGCAGATAATGCTTATAATAGAGGTGTGCTTC
TGATTGCTGCAGCTGGAAATACGGGTTCTGCTGGTATTTCCTATCCAGCAAGATACA
ATTCTGTTATGGCTGTAGGTGCCGTTGACTCCAATAACAATCGTGCTTCATTCTCGA
CTTTTGGAAACGAATTAGAAATTATGGCACCAGGAGTATCCATTTTAAGCACACAC
CTTTCAAATCAATATATTTCTTTAAACGGTACATCTATGGCAAGTCCACATGTAGCT
GGTGTTGCAGCTTTGGTGAAAGCTCAATATCCAAGTGCGACTAATGCCCAAATCAG
ACAAAGACTAAGAGACACCGCTACTCCACTTGGTAGCTCATATTACTTTGGCAATG
GTTTAGTGCACGCTGCTAGAGCCGCTAATTAA.

[0254] La secuencia de aminoácidos de la preproenzima codificada por ACB92_2732966.n se expone como la SEQ ID n.º 37:

MRVLKGTKLTGLLLGFILVFSFAFLSLSVSA*NGNGVERHDYLIGFHEKVDKKAITQASGEV*
*VHEYQYMPVLHVKLPEKAAKALEKNPNIAYVEKDEEVTA*SQTVPWGINHIQAPTVHSWGN
RGNGVRVAVLDSGVASHEDLRISGGRSFITSEPSYQDYNGHGTHVAGTIAGLNNSYGVL
GVAPNVNLYAVKVLDRNGSGSHSAIAQGIEWSVSNGMHIVNMSLGGPTGSATLQRAA
DNAYNRGVLLIAAAGNTGSAGISYPARYNSVMAVGAVDSNNNRASFSTFGNELEIMAP
GVSILSTHLSNQYISLNGTSMASPHVAGVAALVKAQYPSATNAQIRQRLRDTATPLGSS
YYFGNGLVHAARAAN.

[0255] En el N-terminal, la preproenzima presenta un péptido señal con una longitud prevista de 31 aminoácidos (en negrita y cursiva en la SEQ ID n.º 37) según lo determinado mediante el uso de SignalP-NN (Emanuelsson *et al.*, Nature Protocols, 2:953-971, 2007). La presencia de un péptido señal indica que esta serina proteasa es una enzima secretada. Al igual que otras serina proteasas, la enzima presenta una prosecuencia con una longitud prevista de 69 aminoácidos (en cursiva en la SEQ ID n.º 37). La predicción de la prosecuencia se basó en el conocimiento de la unión promadura en serina proteasas homólogas, tales como la proteasa BPN' (Wells *et al.*, Nucleic Acids Res, 11:7911-25, 1983) y PB92 (van der Laan *et al.*, Appl Environ Microbiol, 57:901-909, 1991).

[0256] La secuencia de aminoácidos de la enzima madura totalmente procesada, ACB92 (269 aminoácidos), se expone como la SEQ ID n.º 38:

SQTVPWGINHIQAPTVHSWGNRGNGVRVAVLDSGVASHEDLRISGGRSFITSEPSYQDY
NGHGTHVAGTIAGLNNSYGVLGVAPNVNLYAVKVLDRNGSGSHSAIAQGIEWSVSNG
MHIVNMSLGGPTGSATLQRAADNAYNRGVLLIAAAGNTGSAGISYPARYNSVMAVGA
VDSNNNRASFSTFGNELEIMAPGVSILSTHLSNQYISLNGTSMASPHVAGVAALVKAQY
PSATNAQIRQRLRDTATPLGSSYYFGNGLVHAARAAN.

Serina proteasa DETPh35

[0257] La secuencia de nucleótidos de DETPh35_2828044.n se expone como la SEQ ID n.º 39:

ATGAGAGTTTTGAAAGGTAACAAACTTACCGGTTTACTTCTTGGGTTTATTTTAGTA
TTTTCTTTCACCTTTTTGTCATTATCGGTTAGTGCTAACGGGAATGGCAATGGAGTA
GAAAGACATGACTATTTAATAGGGTTTCACGAAAAGGTAGATAAAAAAGCCATAAC
TCAAGCAAGCGGAGAAGTAGTTCACGAATATCAGTATATGCCTGTTCTTCATGTAA
AGCTTCCAGAAAAAGCAGCAAAAGCTTTAGAAAAAAATCCTAATATTGCTTATGTT
GAAAAAGACGAAGAGGTTACTGCTTCACAAACGGTTCCTTGGGGAATTAATCATAT
TCAAGCTCCAACTGTACATTCTTGGGGGAATCGTGGAAACGGCGTTCGTGTTGCTGT
GTTAGATTCAGGGGTTGCTTCCCATGAAGATTTAAGAATTTCTGGTGGTAGAAGTTT
CATTACTAGCGAGCCTTCTTATCAAGATTATAATGGCCATGGAACTCATGTCGCCGG
AACCATCGCTGGGTTAAATAATAGTTACGGTGTACTTGGTGTTGCACCTAATGTTAA
TCTTTACGCTGTAAAAGTATTAGATCGTAACGGAAGTGGATCTCACAGTGCGATTGC
ACAAGGGATTGAATGGTCTGTTAGCAACGGTATGCATATTGTTAACATGAGCTTAG
GTGGGCCAACTGGTTCAGCAACTCTTCAACGTGCCGCAGATAATGCTTATAATAGA
GGTGTGCTTCTGATTGCTGCAGCTGGAAATACGGGTTCTGCTGGTATTTCCTATCCA

GCAAGATACAATTCTGTTATGGCTGTAGGTGCCGTTGACTCCAATAACAATCGTGCT
TCATTCTCGACTTTTGGAAACGAATTAGAAATTATGGCACCAGGAGTATCCATTTTA
AGCACACACCTTTCAAATCAATATGTTTCTTTAAACGGTACATCTATGGCAAGTCCA
CATGTAGCTGGTGTTGCAGCTTTGGTGAAGGCTCAATATCCAAGTGCGACTAATGCC
CAAATCAGACAAAGACTAAGAGACACCGCTACTCCACTTGGTAGCTCATATTACTTT
GGCAATGGTTTAGTGCACGCTGCTAGAGCCGCTAATTAA.

[0258] La secuencia de aminoácidos de la preproenzima codificada por DETPh35_2828044.n se expone como la SEQ ID n.º 40:

MRVLKGNKLTGLLLGFILVFSFTFLSLSVSA*NGNGNGVERHDYLIGFHEKVDKKAITQASG*
*EVVHEYQYMPVLHVKLPEKAAKALEKNPNIAYVEKDEEVTA*SQTVPWGINHIQAPTVHSWG
NRGNGVRVAVLDSGVASHEDLRISGGRSFITSEPSYQDYNGHGTHVAGTIAGLNNSYG
VLGVAPNVNLYAVKVLDRNGSGSHSAIAQGIEWSVSNGMHIVNMSLGGPTGSATLQRA
ADNAYNRGVLLIAAAGNTGSAGISYPARYNSVMAVGAVDSNNNRASFSTFGNELEIMA
PGVSILSTHLSNQYVSLNGTSMASPHVAGVAALVKAQYPSATNAQIRQRLRDTATPLGS
SYYFGNGLVHAARAAN.

[0259] En el N-terminal, la preproenzima presenta un péptido señal con una longitud prevista de 31 aminoácidos (en negrita y cursiva en la SEQ ID n.º 40) según lo determinado mediante el uso de SignalP-NN (Emanuelsson *et al.*, Nature Protocols, 2:953-971, 2007). La presencia de un péptido señal indica que esta serina proteasa es una enzima secretada. Al igual que otras serina proteasas, la enzima presenta una prosecuencia con una longitud prevista de 71 aminoácidos (en cursiva en la SEQ ID n.º 40). La predicción de la prosecuencia se basó en el conocimiento de la unión promadura en serina proteasas homólogas, tales como la proteasa BPN' (Wells *et al.*, Nucleic Acids Res, 11:7911-25, 1983) y PB92 (van der Laan *et al.*, Appl Environ Microbiol, 57:901-909, 1991).

[0260] La secuencia de aminoácidos de la enzima madura totalmente procesada, DETPh35 (269 aminoácidos), se expone como la SEQ ID n.º 41:

SQTVPWGINHIQAPTVHSWGNRGNGVRVAVLDSGVASHEDLRISGGRSFITSEPSYQDY
NGHGTHVAGTIAGLNNSYGVLGVAPNVNLYAVKVLDRNGSGSHSAIAQGIEWSVSNG
MHIVNMSLGGPTGSATLQRAADNAYNRGVLLIAAAGNTGSAGISYPARYNSVMAVGA
VDSNNNRASFSTFGNELEIMAPGVSILSTHLSNQYVSLNGTSMASPHVAGVAALVKAQ
YPSATNAQIRQRLRDTATPLGSSYYFGNGLVHAARAAN.

[0261] En la figura 12 se representa un alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las formas maduras de las subtilisinas BspAI02518 (SEQ ID n.º 3), BspU02193 (SEQ ID n.º 6), Bakn00315 (SEQ ID n.º 11), Bcl04009 (SEQ ID n.º 14), SWT66_254731 (SEQ ID n.º 17), ACB102 (SEQ ID n.º 20), COG104 (SEQ ID n.º 23), ACB83 (SEQ ID n.º 26), ACB90 (SEQ ID n.º 29), ACB82 (SEQ ID n.º 32), ACB89 (SEQ ID n.º 35), ACB92 (SEQ ID n.º 38) y DETPh35 (SEQ ID n.º 41), con las secuencias de las formas maduras de subtilisinas procedentes de *B. amyloliquefaciens, B. lentus, B. licheniformis,* LG12 de *Bacillus* sp. y *B. pseudofirmus* (n.^{os} de acceso al NCBI CAA24990, P29600, CAJ70731, AAC43580 y ADC49870, respectivamente). Las secuencias se alinearon utilizando el módulo AlignX del *software* Vector NTI Advance® (Life Technologies) con los parámetros por defecto.

Tabla 10-1. Porcentaje de identidad (PID) compartido por varias subtilasas de *Bacillus*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1 Bsp_AAC43580	100	65	71	64	62	62	60	60	60	61	61	64	64	64	64	64	64	64
2 Bam_CAA24990		100	70	61	57	56	60	59	59	60	60	58	58	57	57	58	58	57
3 Bli_CAJ70731.1			100	62	62	59	59	58	59	59	59	65	65	59	59	59	59	59
4 Ble_P29600				100	63	60	63	64	63	64	63	63	63	61	61	62	62	61
5 Bps_ADC49870					100	66	68	68	68	67	67	66	67	71	71	71	71	71
6 BspU02193						100	69	68	68	68	68	74	74	75	75	75	75	75
7 ACB102							100	98	99	99	98	75	75	81	81	80	80	81
8 BspAI02518								100	99	97	97	74	74	80	80	80	80	80
9 COG104									100	98	98	74	74	80	80	80	80	80
10 ACB83										100	99,6	75	75	81	81	80	80	81
11 ACB90											100	75	75	81	81	80	80	81
12 Bcl04009												100	99	83	83	83	83	84
13 SWT66_254731													100	84	84	84	84	84
14 ACB82														100	99	99	99	99,6
15 ACB89															100	99	99	99,6
16 ACB92																100	99,6	99

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
17 DETPh35																	100	99,6
18 Bakn00315																		100

[0262] Se construyó un árbol filogenético para secuencias de aminoácidos de las formas maduras de las subtilisinas de la tabla 10-1. Las secuencias se introdujeron en el conjunto de programas Vector NTI Advance, y se creó un árbol guía utilizando el método de unión de vecinos (*neighbor joining*, NJ) (Saitou y Nei, Mol Biol Evol, 4:406-425, 1987). La construcción del árbol se calculó utilizando los siguientes parámetros: corrección de Kimura para la distancia entre secuencias e ignorando las posiciones con huecos. AlignX muestra los valores de distancia calculados entre paréntesis a continuación del nombre de la molécula que se muestra en el árbol representado en la figura 13.

EJEMPLO 11

Características únicas de subtilisinas del clado *B. akibai*/*clarkii*

[0263] Se llevó a cabo un alineamiento basado en la estructura (figura 14) utilizando la opción «alinear» en el *software* Molecular Operating Environment (MOE) (Chemical Computing Group, Montreal, Quebec, Canadá) con el fin de buscar similitudes estructurales. Las secuencias de aminoácidos de las formas maduras de las subtilisinas BspAI02518 (SEQ ID n.º 3), BspU02193 (SEQ ID n.º 6), Bakn00315 (SEQ ID n.º 11), Bcl04009 (SEQ ID n.º 14), SWT66_254731 (SEQ ID n.º 17), ACB102 (SEQ ID n.º 20), COG104 (SEQ ID n.º 23), ACB83 (SEQ ID n.º 26), ACB90 (SEQ ID n.º 29), ACB82 (SEQ ID n.º 32), ACB89 (SEQ ID n.º 35), ACB92 (SEQ ID n.º 38) y DETPh35 (SEQ ID n.º 41) se alinearon con la subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* (entrada 2STI en pdb), Carlsberg de *B. licheniformis* (entrada 3UNX en pdb), subtilisina de *B. lentus* (entrada 1JEA en pdb) y la estructura propia de la subtilisina LG12 (solicitud de patente PCT n.º PCT/US2014/55223, presentada el 11 de septiembre de 2014). El alineamiento aplica motivos estructurales conservados como guía adicional para el alineamiento de secuencias convencional. Este alineamiento se llevó a cabo utilizando valores por defecto convencionales del programa presentes en la distribución 2012.10 de MOE. Según se representa en la figura 14, el alineamiento estructural de las secuencias de las subtilisinas BspAI02518, BspU02193, Bakn00315, Bcl04009, SWT66_254731, ACB82, ACB83, ACB89, ACB90, ACB92, ACB102, COG104 y DETPh35 muestra que estas secuencias del clado *B. akibai*/*clarkii* poseen un segmento de tres aminoácidos conservados: Asp-Arg-Asn (DRN) en los residuos 95-97 (basados en la numeración de secuencias SEQ ID n.º 3 de BspAI02518) (en adelante denominado «motivo DRN»), que resulta único para estas subtilisinas en comparación con otras enzimas subtilisinas. El motivo DRN se encuentra flanqueado a ambos lados por aminoácidos que están muy conservados en la mayoría de subtilisinas de *Bacillus*. Los residuos de flanqueo conservados son KVL en el N-terminal y GG/SG en el C-terminal. En lugar de DRN, las subtilisinas comerciales BPN' y *B. lentus* presentan GAS/N en estas posiciones, mientras que la subtilisina Carlsberg posee NNS.

[0264] El motivo DRN de la secuencia de subtilisina del clado *B. akibai*/*clarkii* se puede definir como VKVLDRNGR[1]G, donde R^1 se selecciona de entre G o S (SEQ ID n.º 42), VKVLDRNGGG (SEQ ID n.º 43) o VKVLDRNGSG (SEQ ID n.º 44). El motivo DRN de la secuencia de subtilisina del clado *B. akibai*/*clarkii* se puede definir además como D95R96N97 (SEQ ID n.º 45), V91K92V93L94D95R96N97G98G/S99G100 (SEQ ID n.º 46), V91K92V93L94D95R96N97G98G99G100 (SEQ ID n.º 47), o V91K92V93L94D95R96N97G98S99G100 (SEQ ID n.º 48). La numeración de secuencias expuesta en las SEQ ID n.º 45, 46, 47 y 48 se basa en la numeración de secuencias SEQ ID n.º 3 de BspAI02518.

[0265] La figura 15 muestra dónde se localizan la tríada catalítica y el motivo DRN en la proteasa subtilisina del clado *B. akibai*/*clarkii* basándose en la estructura tridimensional de la proteasa subtilisina de *B. lentus* (entrada 1JEA de pdb). En este alineamiento estructural, se observa que los residuos característicos de la tríada catalítica Asp32, His62 y Ser215 se encuentran conservados junto con Asn153, que forma el igualmente característico «agujero del oxianión» de las proteasas de tipo subtilisina. En el alineamiento, se descubrió también la predicción de una deleción común observada en la subtilisina de *B. lentus* entre los residuos 156 y 157 de las secuencias del clado *B. akibai*/*clarkii* relativas a las subtilisinas comerciales Carlsberg y BPN' y a la subtilisina propia LG12. En el alineamiento, también se descubrió que, a diferencia de las proteasas subtilisinas comerciales y propias, las secuencias del clado *B. akibai*/*clarkii* contienen un motivo DRN. Los residuos de D95R96N97 de las secuencias del clado *B. akibai*/*clarkii* se localizan en un bucle cerrado que conduce al sitio de unión al sustrato formado en parte por los residuos 99-102 en la secuencia lineal de BspAI02518. Se espera que este motivo pueda modular la interacción de las subtilisinas del clado *B. akibai*/*clarkii* con el sustrato de un modo que resulte beneficioso.

Implicaciones estructurales del motivo DRN:

[0266] No existen estructuras cristalográficas de las proteasas de tipo subtilisina del clado *B. akibai*/*clarkii*. En cambio, la figura 15 utiliza la estructura de la subtilisina de *B. lentus* como sustituta para mostrar la importancia potencial del motivo DRN en el rendimiento de las proteasas de tipo subtilisina del clado *B. akibai*/*clarkii*. La representación esquemática del pliegue general de la cadena principal se muestra en color gris claro. Asimismo, se muestra la ubicación de las cadenas laterales de los residuos de la tríada catalítica Asp32, His62 y Ser 215 como palos negros. Los residuos en el motivo DRN se han basado en la estructura de *B. lentus* en las posiciones homólogas. Se puede observar que estos residuos determinan el bucle que conduce a los residuos de unión al sustrato 99-102, y también forman el borde principal del sitio de unión al sustrato y, de este modo, en una posición para modular la unión al sustrato.

REIVINDICACIONES

1. Polipéptido recombinante de subtilisina del clado *Bacillus akibai*/*clarkii*, o fragmento activo del mismo, donde el polipéptido recombinante o el fragmento activo de este posee actividad proteolítica y comprende una secuencia de aminoácidos que presenta al menos un 72 % de identidad con una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º 11, 14, 17, 32, 35, 38, 41 u 84 o al menos un 70 % de identidad con una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 3, 6, 20, 23, 26 o 29; y donde el polipéptido recombinante o el fragmento activo de este comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º 42, 43, 44, 45, 46, 47 o 48.

2. Polipéptido recombinante según la reivindicación 1, donde el polipéptido posee actividad de proteasa en presencia de un tensioactivo y/o presenta actividad de limpieza en una composición detergente, donde la composición detergente es, opcionalmente, un detergente para lavavajillas automático o un detergente para ropa.

3. Polipéptido recombinante según la reivindicación 2, donde la actividad de proteasa comprende hidrólisis de caseína y/o la actividad de limpieza comprende hidrólisis de un sustrato de yema de huevo o de un sustrato seleccionado de entre el grupo que consiste en sangre, leche, tinta y combinaciones de estas.

4. Polipéptido recombinante según la reivindicación 3, donde el polipéptido conserva al menos un 50 % de su actividad de proteasa máxima en un rango de pH de 8 a 12 y/o en un rango de temperatura de 50 °C a 75 °C.

5. Composición que comprende un tensioactivo y el polipéptido recombinante según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde el tensioactivo se selecciona opcionalmente del grupo que consiste en un tensioactivo aniónico, un tensioactivo catiónico, un tensioactivo zwitteriónico, un tensioactivo anfolítico, un tensioactivo no iónico semipolar, y una combinación de los mismos.

6. Composición según la reivindicación 5, donde la composición es una composición detergente, opcionalmente seleccionada del grupo que consiste en un detergente para ropa, un suavizante para ropa, un detergente para lavavajillas, y un detergente para la limpieza de superficies duras.

7. Composición según la reivindicación 5 o 6, donde dicha composición comprende además al menos un ion de calcio y/o un ion de zinc; al menos un estabilizador; de aproximadamente un 0,001 % a aproximadamente un 1,0 % en peso de dicho polipéptido recombinante; al menos un agente blanqueador; al menos un ingrediente adjunto; y/o una o más enzimas adicionales o derivados enzimáticos seleccionados del grupo que consiste en aciltransferasas, alfa-amilasas, beta-amilasas, alfa-galactosidasas, arabinosidasas, arilesterasas, beta-galactosidasas, carragenasas, catalasas, celobiohidrolasas, celulasas, condroitinasas, cutinasas, endo-beta-1, 4-glucanasas, endo-beta-mananasas, esterasas, exomananasas, galactanasas, glucoamilasas, hemicelulasas, hialuronidasas, queratinasas, lacasas, lactasas, ligninasas, lipasas, lipoxigenasas, mananasas, oxidasas, pectato liasas, pectina acetilesterasas, pectinasas, pentosanasas, peroxidasas, fenoloxidasas, fosfatasas, fosfolipasas, fitasas, poligalacturonasas, proteasas, pululanasas, reductasas, ramnogalacturonasas, beta-glucanasas, tanasas, transglutaminasas, xilano acetilesterasas, xilanasas, xiloglucanasas, xilosidasas, metaloproteasas, serina proteasas adicionales, y combinaciones de estas.

8. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 5-7, donde dicha composición no contiene fosfato; contiene fosfato; no contiene borato; o contiene borato.

9. Método de limpieza, comprendiendo poner en contacto una superficie o un artículo con una composición que comprende el polipéptido recombinante según cualquiera de las reivindicaciones 1-4 o la composición según cualquiera de las reivindicaciones 5-8, donde dicho artículo es opcionalmente vajilla o tejido.

10. Método para producir un polipéptido recombinante que comprende:

transformar de manera estable una célula huésped con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica el polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-4;

cultivar dicha célula huésped transformada en condiciones adecuadas para dicha célula huésped para producir dicho polipéptido; y

recuperar dicho polipéptido.

11. Polinucleótido que comprende una secuencia de ácido nucleico:

(i) que codifica una serina proteasa que presenta una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID n.º 3, SEQ ID n.º 6, SEQ ID n.º 11, SEQ ID n.º 14 y SEQ ID n.º 17;

(ii) que codifica una serina proteasa que presenta una secuencia de aminoácidos (a) que posee al menos un 70 % de identidad con una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º 3, 6, 20, 23, 26, 29 u 84 y (b) que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º 42, 43, 44, 45, 46, 47 o 48;

(iii) que codifica una serina proteasa que presenta una secuencia de aminoácidos (a) que posee al menos un 72 % de identidad con una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º 11, 14, 17, 32, 35, 38 o 41, y (b) que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º 42, 43, 44, 45, 46, 47 o 48;

(iv) que codifica una serina proteasa y que posee al menos un 70 % de identidad con la SEQ ID n.º 1, 4, 18, 21, 24 o 27; o

(v) que codifica una serina proteasa y que posee al menos un 72 % de identidad con la SEQ ID n.º 9, 12, 15, 30, 33, 36 o 39.

12. Vector de expresión que comprende el polinucleótido de la reivindicación 11.

13. Célula huésped transformada con el vector de la reivindicación 12.

14. Procesamiento textil, de cuero o de plumaje o composición de limpieza para lentes de contacto o para heridas que comprende el polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-4.

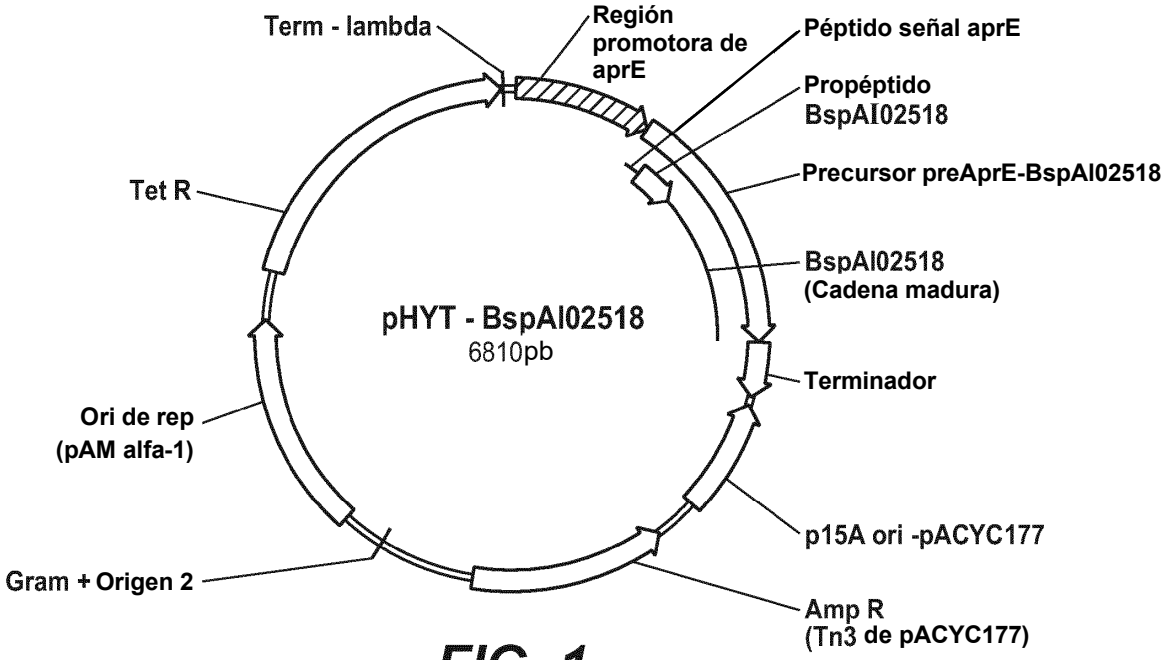
Term - lambda
Región promotora de aprE
Péptido señal aprE
Propéptido BspAI02518
Precursor preAprE-BspAI02518
Tet R
BspAI02518 (Cadena madura)
pHYT - BspAI02518
6810pb
Terminador
Ori de rep (pAM alfa-1)
p15A ori -pACYC177
Gram + Origen 2
Amp R (Tn3 de pACYC177)

FIG. 1

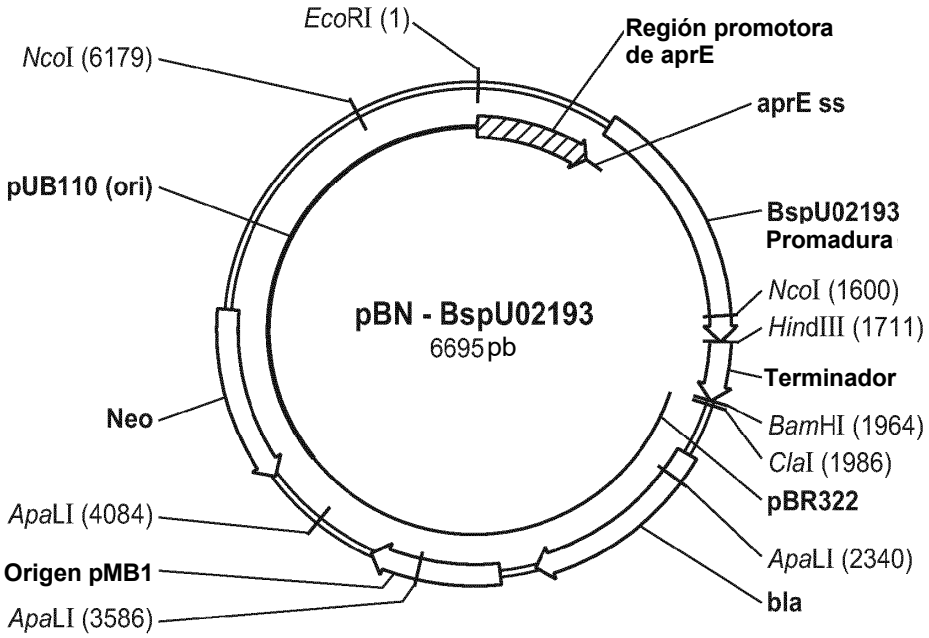
EcoRI (1)
Región promotora de aprE
NcoI (6179)
aprE ss
pUB110 (ori)
BspU02193 Promadura
NcoI (1600)
pBN - BspU02193
6695pb
HindIII (1711)
Terminador
Neo
BamHI (1964)
ClaI (1986)
pBR322
ApaLI (4084)
ApaLI (2340)
Origen pMB1
bla
ApaLI (3586)

FIG. 2

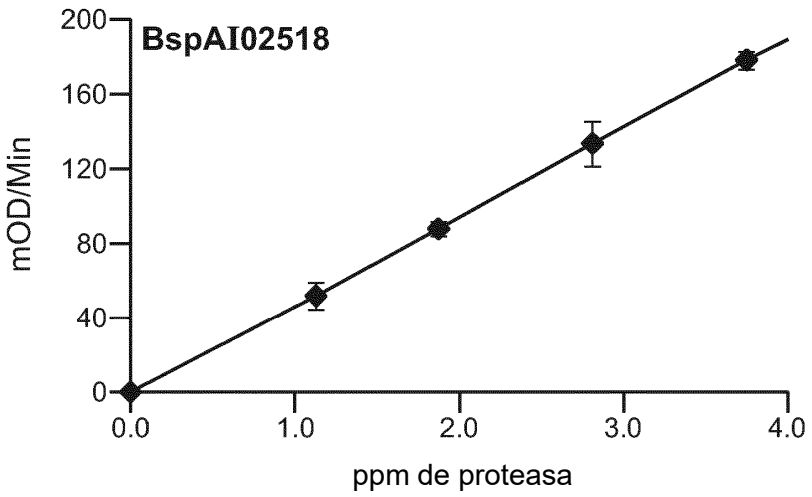
BspAI02518
mOD/Min
200
160
120
80
40
0
0.0
1.0
2.0
3.0
4.0
ppm de proteasa

FIG. 3

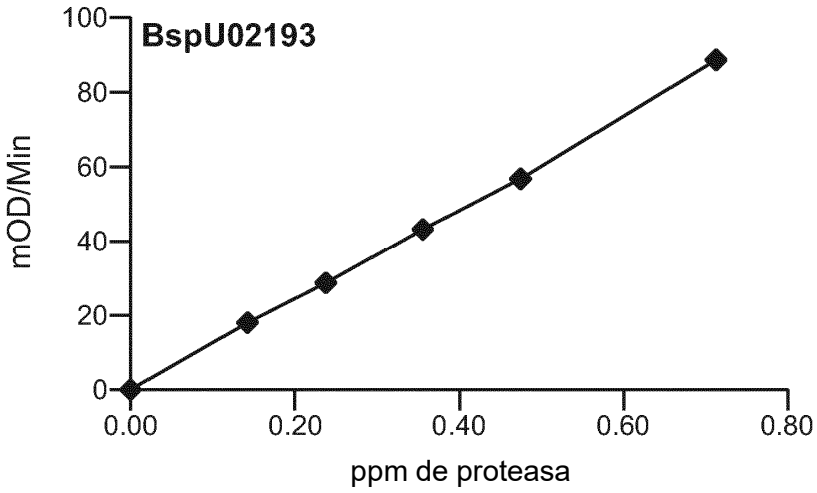
BspU02193
mOD/Min
100
80
60
40
20
0
0.00
0.20
0.40
0.60
0.80
ppm de proteasa

FIG. 4

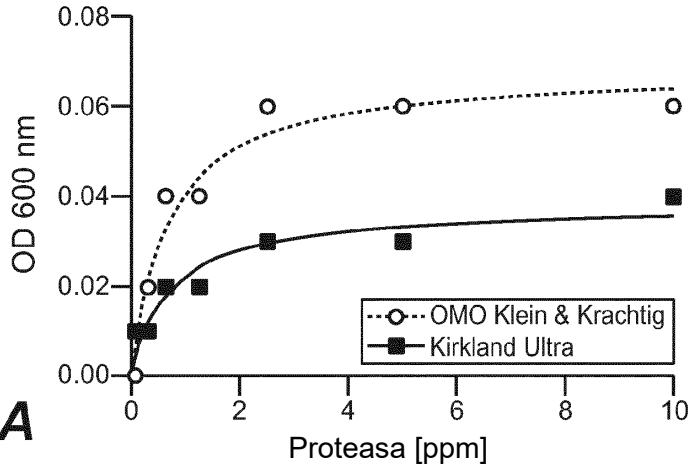

FIG. 5A

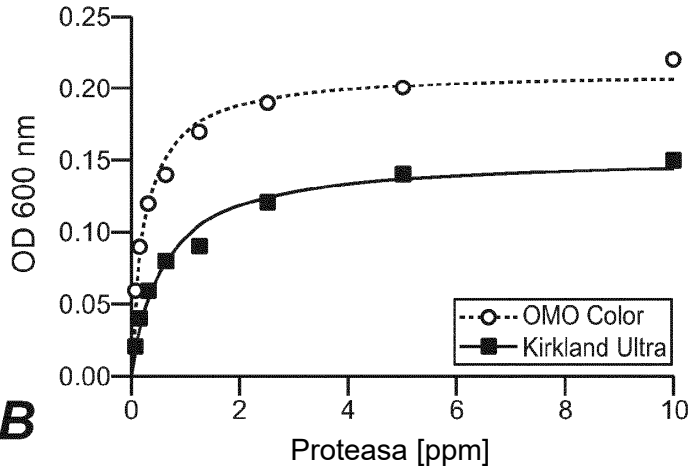

FIG. 5B

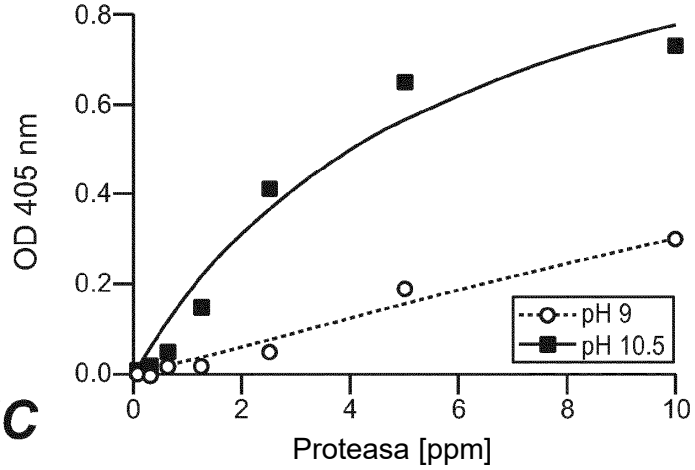

FIG. 5C

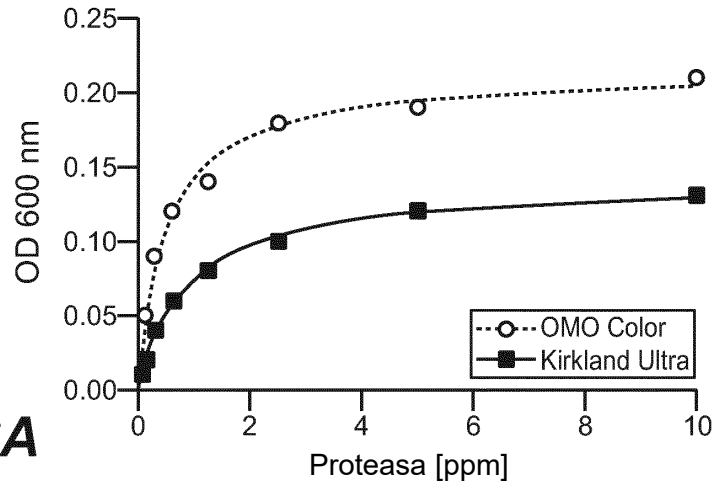
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
OD 600 nm
0
2
4
6
8
10
Proteasa [ppm]
OMO Color
Kirkland Ultra

FIG. 6A

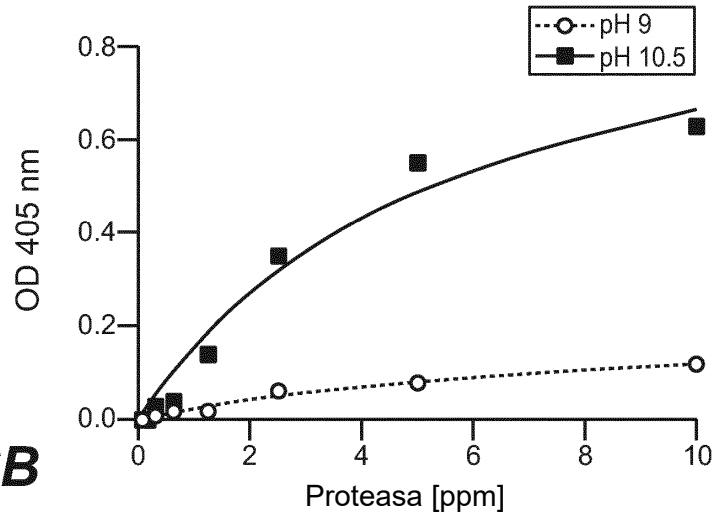
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
OD 405 nm
0
2
4
6
8
10
Proteasa [ppm]
pH 9
pH 10.5

FIG. 6B

FIG. 7A

```
                                       1                                                50
BspAI02518                        (1)  -AQSTPWGISRINAPAVHSTGNFGQGVRVAVLDSGVAS-HEDLRIAGGVS
BspU02193                         (1)  -TQTVPWGINHVKAPTVHNWGNVGTGVKVAVLDTGIAS-HPDLRVSGGAS
B_pseudofirmus_ADC49870           (1)  -AQTVPWGIPYIYSDVVHRQGYFGNGVKVAVLDTGVAP-HPDLHIRGGVS
Bacillus_sp_ADD64465              (1)  -SQTVPWGISFISTQQAHNRGIFGNGARVAVLDTGIAS-HPDLRIAGGAS
B_halodurans_BAB04574             (1)  -SQTVPWGISFINTQQAHNRGIFGNGARVAVLDTGIAS-HPDLRIAGGAS
Bacillus_sp_BAA05540              (1)  -SQTVPWGISFINTQQAHNRGIFGNGARVAVLDTGIAS-HPDLRIAGGAS
B_clausii_ABI26631                (1)  -SQTVPWGISFINTQQAHNRGIFGNGARVAVLDTGIAS-HPDLRIAGGAS
B_gibsonii_AGS78407               (1)  -QQTVPWGITRVQAPAVHNRGITGSGVRVAILDSGISA-HSDLNIRGGAS
Bacillus_sp_BAA25184              (1)  -MQTVPWGINRVQAPIAQSRGFTGTGVRVAVLDTGISN-HADLRIRGGAS
B_sp_Sendai_BAA06157              (1)  -NQVTPWGITRVQAPTAWTRGYTGTGVRVAVLDTGIST-HPDLNIRGGVS
B_subtilis_AAA87324               (1)  -MQTVPWGINRVQAPIAQSRGFTGTGVRVAVLDTGISN-HADLRIRGGAS
B_lehensis_AFK08970               (1)  -MQTVPWGINRVQAPIAQSRGFTGTGVRVAVLDTGISN-HADLRIRGGAS
B_clausii_BAD63300                (1)  -AQSVPWGISRVQAPAAHNRGLTGSGVKVAVLDTGIST-HPDLNIRGGAS
B_lentus_P29600                   (1)  -AQSVPWGISRVQAPAAHNRGLTGSGVKVAVLDTGIST-HPDLNIRGGAS
B_alcalophilus_AAA22212           (1)  -AQSVPWGISRVQAPAAHNRGLTGSGVKVAVLDTGIST-HPDLNIRGGAS
Bacillus_sp_sprC_AAC43580         (1)  -AQTVPWGIPHIKADKAHAAGVTGSGVKVAILDTGIDANHADLNVKGGAS
Bacillus_sp_BAD21128              (1)  -SQTVPYGVPHIKADVAHSQNVTGNGVKVAILDTGIDAAHEDLRVVGGAS
Bacillus_sp_BAD11988              (1)  -AQTTPWGVTHINAHRAHSSGVTGSGVKVAILDTGIHASHPDLNVRGGAS
B_sp_sprD_AAC43581                (1)  -AQTVPYGVPHIKADVAHAQNVTGSGVKVAVLDTGIDASHEDLRVVGGAS
B_sonorensis_WP_006636716         (1)  -AQTVPYGIPLIKADKVQAQGYKGANVKVGIIDTGIASSHTDLKVVGGAS
B_licheniformis_CAJ70731.1        (1)  -AQTVPYGIPLIKADKVQAQGFKGANVKVAVLDTGIQASHPDLNVVGGAS
B_pumilus_ADK11996                (1)  -AQTVPYGIPQIKAPAVHAQGYKGANVKVAVLDTGIHAAHPDLNVAGGAS
B_circulans_ADN04910              (1)  -AQTVPYGIPQIKAPAVHAQGYKGANVKVAVLDTGIHAAHPDLNVAGGAS
B_stratosphericus_WP_007497196    (1)  -AQTVPYGIPQIKAPAVHAQGYKGANVKVAVLDTGIHAAHPDLNVAGGAS
B_lehensis_AFP23380.1             (1)  MAQTVPYGIPQIKAPAVHAQGYKGANVKVAVLDTGIHAAHPDLNVAGGAS
B_atrophaeus_YP003972439          (1)  -AQSVPYGISQIKAPAVHSQGYTGSNVKVAVIDSGIDSSHPDLKVSGGAS
B_amyloliquefaciens_CAA24990      (1)  -AQSVPYGVSQIKAPALHSQGYTGSNVKVAVIDSGIDSSHPDLKVAGGAS
G_stearothermophilus_ABY25856     (1)  -AQSVPYGVSQIKAPALHSQGFTGSNVKVAVIDSGIDSSHPDLKVAGGAS
B_methylotrophicus_AGC81872.1     (1)  -AQSVPYGVSQIKAPALHSQGFTGSNVKVAVIDSGIDSSHPDLKVAGGAS
B_vallismortis_WP010329279        (1)  -AQSVPYGISQIKAPALHSQGYTGSNVKVAVIDSGIDSSHPDLNVRGGAS
B_subtilis_str168_CAA74536.1      (1)  -AQSVPYGISQIKAPALHSQGYTGSNVKVAVIDSGIDSSHPDLNVRGGAS
B_subtilis_BAN09118               (1)  -AQSVPYGISQIKAPALHSQGYTGSNVKVAVIDSGIDSSHPDLNVRGGAS
B_mojavensis_WP010333625          (1)  -AQSVPYGISQIKAPALHSQGYTGSNVKVAVIDSGIDSSHPDLNVRGGAS
B_marmarensis ERN52602.1          (1)  -AQTVPWGIPYIYSDVVHRQGYFGNGVKVAVLDTGVAP-HPDLHIRGGVS
Consenso                          (1)   AQTVPWGIS IKAPAVHSQGYTGSGVKVAVLDTGIASSHPDL V GGAS
```

FIG. 7B

```
                                      51                                               100
BspAI02518                       (49) FVASEP-SYQDYNGHGTHVAGTIAGLNNSVGVLGVAPSVQLYAVKVLDRN
BspU02193                        (49) FIPSEP-TIQDFNGHGTHVAGTVAALNNSIGVLGVAPNVQLYGVKVLDRN
B_pseudofirmus_ADC49870          (49) FISTEN-TYVDYNGHGTHVAGTVAALNNSYGVLGVAPGAELYAVKVLDRN
Bacillus_sp_ADD64465             (49) FISSEP-SYHDNNGHGTHVAGTIAALNNSIGVLGVAPSADLYAVKVLDRN
B_halodurans_BAB04574            (49) FISSEP-SYHDNNGHGTHVAGTIAALNNSIGVLGVAPSADLYAVKVLDRN
Bacillus_sp_BAA05540             (49) FISSEP-SYHDNNGHGTHVAGTIAALNNSIGVLGVAPSADLYAVKVLDRN
B_clausii_ABI26631               (49) FISSEP-SYHDNNGHGTHVAGTIAALNNSIGVLGVAPSADLYAVKVLDRN
B_gibsonii_AGS78407              (49) FVPGEP-TTADLNGHGTHVAGTVAALNNSIGVIGVAPNAELYAVKVLGAN
Bacillus_sp_BAA25184             (49) FVPGEP-NISDGNGHGTHVAGTIAALNNSIGVLGVAPNVDLYGVKVLGAS
B_sp_Sendai_BAA06157             (49) FVPGEP-SYQDGNGHGTHVAGTIAALNNSIGVVGVAPNAELYAVKVLGAN
B_subtilis_AAA87324              (49) FVPGEP-NISDGNGHGTQVAGTIAALNNSIGVLGVAPNVDLYGVKVLGAS
B_lehensis_AFK08970              (49) FVPGEP-NISDGNGHGTHVAGTIAALNNSIGVIGVAPNVDLYGVKVLGAS
B_clausii_BAD63300               (49) FVPGEP-STQDGNGHGTHVAGTIAALNNSIGVLGVAPSAELYAVKVLGAS
B_lentus_P29600                  (49) FVPGEP-STQDGNGHGTHVAGTIAALNNSIGVLGVAPSAELYAVKVLGAS
B_alcalophilus_AAA22212          (49) FVPGEP-STQDGNGHGTHVAGTIAALNNSIGVLGVAPNAELYAVKVLGAS
Bacillus_sp_sprC_AAC43580        (50) FVSGEPNALQDGNGHGTHVAGTVAALNNTTGVLGVAYNADLYAVKVLSAS
Bacillus_sp_BAD21128             (50) FVAGEPNALQDGNGHGTHVAGTVAALNNQVGVLGVAYDVDLYAVKVLGAD
Bacillus_sp_BAD11988             (50) FISGESNPYIDSNGHGTHVAGTVAALNNTVGVLGVAYNAELYAVKVLSAS
B_sp_sprD_AAC43581               (50) FVSEEPDALTDGNGHGTHVAGTIAALNNNVGVLGVSYDVDLYAVKVLSAG
B_sonorensis_WP_006636716        (50) FVSGES-YNTDGNGHGTHVAGTVAALDNTTGVLGVAPNVSLYAIKVLNSS
B_licheniformis_CAJ70731.1       (50) FVAGEA-YNTDGNGHGTHVAGTVAALDNTTGVLGVAPSVSLYAVKVLNSS
B_pumilus_ADK11996               (50) FVPSEPNATQDFQSHGTHVAGTIAALDNTIGVLGVAPSASLYAVKVLDRN
B_circulans_ADN04910             (50) FVPSEPNATQDFQSHGTHVAGTIAALDNTIGVLGVAPSASLYAVKVLDRN
B_stratosphericus_WP_007497196   (50) FVPSEPNATQDFQSHGTHVAGTIAALDNTIGVLGVAPSASLYAVKVLDRN
B_lehensis_AFP23380.1            (51) FVPSEPNATQDFQSHGTHVAGTIAALDNTIGVLGVAPSASLYAVKVLDRY
B_atrophaeus_YP003972439         (50) FVPSEPNPFQDGNSHGTHVAGTVAALNNSVGVLGVAPSASLYAVKVLSSS
B_amyloliquefaciens_CAA24990     (50) MVPSETNPFQDNNSHGTHVAGTVAALNNSIGVLGVAPSASLYAVKVLGAD
G_stearothermophilus_ABY25856    (50) MVPSETNPFQDNNSHGTHVAGTVAALNNSVGVLGVAPSASLYAVKVLGAD
B_methylotrophicus_AGC81872.1    (50) MVPSETNPFQDRNSHGTHVAGTVAALNNSVGVLGVAPSASLYAVKVLGAD
B_vallismortis_WP010329279       (50) FVPSETNPYQDGSSHGTHVAGTVAALNNSIGVLGVAPNASLYAVKVLDST
B_subtilis_str168_CAA74536.1     (50) FVPSETNPYQDGSSHGTHVAGTIAALNNSIGVLGVSPSASLYAVKVLDST
B_subtilis_BAN09118              (50) FVPSETNPYQDGSSHGTHVAGTVAALNNTIGVLGVAPSASLYAVKVLDST
B_mojavensis_WP010333625         (50) FVPSETNPYQDGSSHGTHVAGTVAALNNTIGVLGVAPSASLYAVKVLDST
B_marmarensis ERN52602.1         (49) FIPTEN-TYVDYNGHGTHVAGTVAALNNSYGVLGVAPGAELYAVKVLDRN
Consenso                         (51) FVPSEP  YQDGNGHGTHVAGTIAALNNSIGVLGVAPSADLYAVKVL A
```

FIG. 7C

```
                                           1 0 1                                                                                             1 5 0
BspAI02518                         (98)  G G G N H S D I A R G I E W S V N N G M H V V N M S L G G P T G S T T L Q R A A D N A Y N R G V L L
BspU02193                          (98)  G G G S H S A I A Q G I E W S I S N G M D V V N M S L G G A T S S T A L S Q A V A N A S N R G I L L
B_pseudofirmus_ADC49870            (98)  G S G S H A S I A Q G I E W A M N N G M D I A N M S L G S P S G S T T L Q L A A D R A R N A G V L L
Bacillus_sp_ADD64465               (98)  G S G S L A S V A Q G I E W A I N N N M H I I N M S L G S T S G S S T L E L A V N R G N N A G I L L
B_halodurans_BAB04574              (98)  G S G S L A S V A Q G I E W A I N N N M H I I N M S L G S T S G S S T L E L A V N R A N N A G I L L
Bacillus_sp_BAA05540               (98)  G S G S L A S V A Q G I E W A I N N N M H I I N M S L G S T S G S S T L E L A V N R A N N A G I L L
B_clausii_ABI26631                 (98)  G S G S L A S V A Q G I E W A I N N N M H I I N M S L G S T S G S S T L E L A V N R A N N A G I L L
B_gibsonii_AGS78407                (98)  G S G S V S G I A Q G L E W A A T N N M H I A N M S L G S D F P S S T L E R A V N Y A T S R D V L V
Bacillus_sp_BAA25184               (98)  G S G S I S G I A Q G L Q W A A N N G M H I A N M S L G S S A G S A T M E Q A V N Q A T A S G V L V
B_sp_Sendai_BAA06157               (98)  G S G S V S S I A Q G L Q W T A Q N N I H V A N L S L G S P V G S Q T L E L A V N Q A T N A G V L V
B_subtilis_AAA87324                (98)  G S G S I S G I A Q G L Q W A A N N G M H I A N M S L G S S A G S A T M E Q A V N Q A T A S G V L V
B_lehensis_AFK08970                (98)  G C G S I S G I A Q G L Q W A A N N G M H I A N M S L G S S A G S A T M E Q A V N Q A T A S G V L V
B_clausii_BAD63300                 (98)  G S G S V S S I A Q G L E W A G N N G M H V A N L S L G S P S P S A T L E Q A V N S A T S R G V L V
B_lentus_P29600                    (98)  G S G S V S S I A Q G L E W A G N N G M H V A N L S L G S P S P S A T L E Q A V N S A T S R G V L V
B_alcalophilus_AAA22212            (98)  G S G S V S S I A Q G L E W A G N N G M H V A N L S L G S P S P S A T L E Q A V N S A T S R G V L V
Bacillus_sp_sprC_AAC43580         (100)  G S G T L S G I A Q G I E W S I S N G M N V I N M S L G G S S G S T A L Q Q A C N N A Y N R G I V V
Bacillus_sp_BAD21128              (100)  G S G T L S G I A Q G I E W S I A N N M D V I N M S L G G S T G S T T L K Q A A D N A Y N S G L V V
Bacillus_sp_BAD11988              (100)  G S G T L S G I A Q G V E W S I A N K M D V I N M S L G G S S G S T A L Q R A V D N A Y R N N I V V
B_sp_sprD_AAC43581                (100)  G S G T L A G I A Q G I E W A I D N N M D V I N M S L G G S T G S T T L K Q A S D N A Y N S G I V V
B_sonorensis_WP_006636716          (99)  G S G T Y S A I V S G I E W A T Q N G L D V I N M S L G G P S G S T A L K Q A V D K A Y A S G I V V
B_licheniformis_CAJ70731.1         (99)  G S G S Y S G I V S G I E W A T T N G M D V I N M S L G G A S G S T A M K Q A V D N A Y A R G V V V
B_pumilus_ADK11996                (100)  G D G Q Y S W I I S G I E W A V A N N M D V I N M S L G G A S G S T A L K N A V D T A N N R G V V V
B_circulans_ADN04910              (100)  G D G Q Y S W I I S G I E W A V A N N M D V I N M S L G G P N G S T A L K N A V D T A N N R G V V V
B_stratosphericus_WP_007497196    (100)  G D G Q Y S W I I S G I E W A V A N N M D V I N M S L G G P S G S T A L K N A V D T A N N R G V V V
B_lehensis_AFP23380.1             (101)  G D G Q Y S W I I S G I E W A V A N N M D V I N M S L G G P N G S T A L K N A V D T A N N R G V V V
B_atrophaeus_YP003972439          (100)  G S G D Y S W I I N G I E W A I S N N M D V I N M S L G G P Q G S T A L K A V V D K A V S Q G I V V
B_amyloliquefaciens_CAA24990      (100)  G S G Q Y S W I I N G I E W A I A N N M D V I N M S L G G P S G S A A L K A A V D K A V A S G V V V
G_stearothermophilus_ABY25856     (100)  G S G Q Y S W I I N G I E W A I A Y N M D V I N M S L G G P S G S A A L K A A V D K A V A S G I V V
B_methylotrophicus_AGC81872.1     (100)  G S G Q Y S W I I N G I E W A I A N N M D V I N M S L G G P S G S A A L K A A V D K A V A S G V V V
B_vallismortis_WP010329279        (100)  G N G Q Y S W I I N G I E W A I S N K M D V I N M S L G G P S G S T A L K S V V D R A V A S G I V V
B_subtilis_str168_CAA74536.1      (100)  G S G Q Y S W I I N G I E W A I S N N M D V I N M S L G G P T G S T A L K T V V D K A V S S G I V V
B_subtilis_BAN09118               (100)  G S G Q Y S W I I N G I E W A I S N N M D V I N M S L G G P T G S T A L K T V V D K A V A S G I V V
B_mojavensis_WP010333625          (100)  G S G Q Y S W I I N G I E W A I S N N M D V I N M S L G G P T G S T A L K T V V D K A V A S G I V V
B_marmarensis ERN52602.1           (98)  G S G S H A S I A Q G I E W A M N N G M D I A N M S L G S P S G S T T L Q L A A D R A R N A G V L L
Consenso                          (101)  G S G S Y S   I A Q G I E W A I   N N M D V I N M S L G G P S G S T T L     A V D   A   A S G V V V
```

FIG. 7D

```
                                      151                                              200
BspAI02518                      (148) IAAAGNTG-TSG----VSFPARYSSVMAVAATDSNNNRASFSTYGSQIEI
BspU02193                       (148) IAASGNTG-----RAGIQFPARYSQVMAVGAVDQNNRLASFSTFGNEQEI
B_pseudofirmus_ADC49870         (148) IGAAGNSG-QQGGSNNMGYPARYASVMAVGAVDQNGNRANFSSYGSELEI
Bacillus_sp_ADD64465            (148) VGAAGNTG-RQG----VNYPARYSGVMAVAAVDQNGQRASFSTYGPEIEI
B_halodurans_BAB04574           (148) VGAAGNTG-----RQGVNYPARYSGVMAVAAVDQNGQRASFSTYGPEIEI
Bacillus_sp_BAA05540            (148) VGAAGNTG-RQG----VNYPARYSGVMAVAAVDQNGQRASFSTYGPEIEI
B_clausii_ABI26631              (148) VGAAGNTG-RQG----VNYPARYSGVMAAAAVDQNGQRASFSTYGPEIEI
B_gibsonii_AGS78407             (148) IAATGNNG-----SGSVGYPARYANAMAVGATDQNNRRANFSQYGTGIDI
Bacillus_sp_BAA25184            (148) VAASGNSG-AGN----VGFPARYANAMAVGATDQNNNRASFSQYGAGLDI
B_sp_Sendai_BAA06157            (148) VAATGNNG-SGT----VSYPARYANALAVGATDQNNNRASFSQYGTGLNI
B_subtilis_AAA87324             (148) VAASGNSG-AGN----VGFPARYANAMAVGATDQNNNRATFSQYGAGLDI
B_lehensis_AFK08970             (148) VAASGNSG-AGN----VGFPARYANAMAVGATDQNNNRASFSQYGAGLDI
B_clausii_BAD63300              (148) VAASGNSG-AGS----ISYPARYANAMAVGATDQNNNRASFSQYGAGLDI
B_lentus_P29600                 (148) VAASGNSG-AGS----ISYPARYANAMAVGATDQNNNRASFSQYGAGLDI
B_alcalophilus_AAA22212         (148) VAASGNSG-AGS----ISYPARYANAMAVGATDQNNNRASFSQYGAGLDI
Bacillus_sp_sprC_AAC43580       (150) IAAAGNSG-SSGNRNTMGYPARYSSVIAVGAVSSNNTRASFSSVGSELEV
Bacillus_sp_BAD21128            (150) VAAAGNSGDFFGLINTIGYPARYDSVIAVGAVDSNNRRASFSSVGSQLEV
Bacillus_sp_BAD11988            (150) VAAAGNSG-AQGNRNTIGYPARYSSVIAVGAVDSNNNRASFSSVGSELEV
B_sp_sprD_AAC43581              (150) IAAAGNSGSVLGLVNTIGYPARYDSVIAVGAVDSNNNRASFSSVGSQLEV
B_sonorensis_WP_006636716       (149) VAAAGNSG-SSGSQNTIGYPAKYDSVIAVGAVDSNKNRASFSSVGSELEV
B_licheniformis_CAJ70731.1      (149) VAAAGNSG-SSGNTNTIGYPAKYDSVIAVGAVDSNSNRASFSSVGAELEV
B_pumilus_ADK11996              (150) VAAAGNSG-SSGSRSTVGYPAKYESTIAVANVNSNNVRNSSSSAGPELDV
B_circulans_ADN04910            (150) VAAAGNSG-STGSTSTVGYPAKYDSTIAVANVNSSNVRNSSSSAGPELDV
B_stratosphericus_WP_007497196  (150) VAAAGNSG-STGSTSTVGYPAKYDSTIAVANVNSNNVRNSSSSAGPELDV
B_lehensis_AFP23380.1           (151) VAAAGNSG-STGSTSTVGYPAKYDSTIAVANVNSNNVRNSSSSAGPELDV
B_atrophaeus_YP003972439        (150) VAAAGNSG-SSGSTSTVGYPAKYPSVIAVGAVDSNNQRASFSSAGSELDV
B_amyloliquefaciens_CAA24990    (150) VAAAGNEG-TSGSSSTVGYPGKYPSVIAVGAVDSSNQRASFSSVGPELDV
G_stearothermophilus_ABY25856   (150) VAAAGNEG-TSGSSSTVGYPGKYPSVIAVGAVNSSNQRASFSSVGSELDV
B_methylotrophicus_AGC81872.1   (150) VAAAGNEG-TSGGSSTVGYPGKYPSVIAVGAVNSSNQRASFSSVGSELDV
B_vallismortis_WP010329279      (150) VAAAGNEG-TSGSSSTIGYPAKYPSTIAVGAVNSSNQRGSFSSVGPELDV
B_subtilis_str168_CAA74536.1    (150) AAAAGNEG-SSGSTSTVGYPAKYPSTIAVGAVNSSNQRASFSSAGSELDV
B_subtilis_BAN09118             (150) VAAAGNEG-SSGSTSTVGYPAKYPSTIAVGAVNSSNQRASFSSAGSELDV
B_mojavensis_WP010333625        (150) VAAAGNEG-SSGSTSTVGYPAKYPSTIAVGAVNSSNQRASFSSAGSELDV
B_marmarensis ERN52602.1        (148) IGAAGNSG-QQGGSNNMGYPARYASVMAVGAVDQNGNRANFSSYGSELEI
Consenso                        (151) VAAAGNSG SG    TVGYPARYASVIAVGAVDSNNNRASFSS GSELDV
```

FIG. 7E

```
                                   201                                              250
BspAI02518                   (193) SAPGVGINSTYPTNGYSSLNGTSMASPHVAGVAALVKARYPSATNAQIRQ
BspU02193                    (193) VAPGVGIQSTYLNNGYSSLNGTSMAAPHVAGVAALVMSEYPWATAPQVRG
B_pseudofirmus_ADC49870      (197) MAPGVNINSTYLNNGYRSLNGTSMASPHVAGVAALVKQKHPHLTAAQIRN
Bacillus_sp_ADD64465         (193) SAPGVNVYSTYTGNRYVSLSGTSMAAPHVAGTAALVKSRYPSYTNNQIRQ
B_halodurans_BAB04574        (193) SAPGVNVNSTYTGNRYVSLSGTSMATPHVAGVAALVKSRYPSYTNNQIRQ
Bacillus_sp_BAA05540         (193) SAPGVNVNSTYTGNRYVSLSGTSMATPHVAGVAALVKSRYPSYTNNQIRQ
B_clausii_ABI26631           (193) SAPGVNINSTYTGNRYESLSGTSMATPHVAGVAALVKSRYPSYTNNQIRQ
B_gibsonii_AGS78407          (193) VAPGVNVQSTYPGNRYVSMNGTSMATPHVAGAAALVKQRYPSWNATQIRN
Bacillus_sp_BAA25184         (193) VAPGVGVQSTVPGNGYSSFNGTSMATPHVAGVAALVKQKNPSWSNVQIRN
B_sp_Sendai_BAA06157         (193) VAPGVGIQSTYPGNRYASLSGTSMATPHVAGVAALVKQKNPSWSNTQIRQ
B_subtilis_AAA87324          (193) VAPGVGVQSTVPGNGYASFNGTSMATPHVAGVAALVKQKNPSWSNVQIRN
B_lehensis_AFK08970          (193) VAPGVGVQSTVPGNGYASFNGTSMATPHVAGVAALVKQKNPSWSNVQIRN
B_clausii_BAD63300           (193) VAPGVNVQSTYPGSTYASLNGTSMATPHVAGVAALVKQKNPSWSNVQIRN
B_lentus_P29600              (193) VAPGVNVQSTYPGSTYASLNGTSMATPHVAGAAALVKQKNPSWSNVQIRN
B_alcalophilus_AAA22212      (193) VAPGVNVQSTYPGSTYASLNGTSMATPHVAGAAALVKQKNPSWSNVQIRN
Bacillus_sp_sprC_AAC43580    (199) MAPGVNILSTTPGNNYASFNGTSMAAPHVAGAAALIKAKYPSMTNVQIRE
Bacillus_sp_BAD21128         (200) MAPGVNILSTLPGNSYGSLNGTSMASPHVAGAAALLLAQDPTLTNVQVRE
Bacillus_sp_BAD11988         (199) MAPGVSILSTVPGSSYASYNGTSMASPHVAGAAALLKAKYPNWSAAQIRN
B_sp_sprD_AAC43581           (200) MAPGVAINSTLPGNQYGELNGTSMASPHVAGAAALLLAQNPNLTNVQVRE
B_sonorensis_WP_006636716    (198) MAPGVSVYSTYPSNTYTSLNGTSMASPHVAGAAALILSKYPTLSASQVRN
B_licheniformis_CAJ70731.1   (198) MAPGAGVYSTYPTNTYATLNGTSMASPHVAGAAALILSKHPNLSASQVRN
B_pumilus_ADK11996           (199) SAPGTSILSTVPSSGYTSYTGTSMASPHVAGAAALILSKNPNLTNSQVRQ
B_circulans_ADN04910         (199) SAPGTSILSTVPSRGYTSYTGTSMASPHVAGAAALILSKNPNLSNSQVRQ
B_stratosphericus_WP_007497196 (199) SAPGTSILSTVPSSGYTSYTGTSMASPHVAGAAALILSKYPNLSTSQVRQ
B_lehensis_AFP23380.1        (200) SAPGTSILSTVPSSGYTSYTGTSMASPHVAGAAALILSKYPNLSTSQVRQ
B_atrophaeus_YP003972439     (199) MAPGVSIQSTLPGSSYGSYNGTSMASPHVAGAAALVLSKHPNWTNSQVRN
B_amyloliquefaciens_CAA24990 (199) MAPGVSIQSTLPGNKYGAYNGTSMASPHVAGAAALILSKHPNWTNTQVRS
G_stearothermophilus_ABY25856 (199) MAPGVSIQSTLPGNKYGAYNGTSMASPHVAGAAALILSKHPNWTNTQVRS
B_methylotrophicus_AGC81872.1 (199) MAPGVSIQSTLPGNKYGAYNGTSMASPHVAGAAALILSKHPNWTNTQVRS
B_vallismortis_WP010329279   (199) MAPGVSIQSTLPGGTYGSYNGTSMATPHVAGAAALILSKHPTWTNTQVRN
B_subtilis_str168_CAA74536.1 (199) MAPGVSIQSTLPGGTYGAYNGTSMATPHVAGAAALILSKHPTWTNAQVRD
B_subtilis_BAN09118          (199) MAPGVSIQSTLPGGTYGSYNGTSMATPHVAGAAALILSKHPTWSNAQVRD
B_mojavensis_WP010333625     (199) MAPGVSIQSTLPGGTYGAYNGTSMATPHVAGAAALILSKHPTWTNAQVRD
B_marmarensis_ERN52602.1     (197) MAPGVNINSTYLNNGYRSLNGTSMASPHVAGVAALVKQKHPHLTAAQIRN
Consenso                     (201) MAPGV IQSTLPGN YGSYNGTSMASPHVAGAAALVKSKYPSWTN QIRN
```

FIG. 7F

		251 … 277	
BspAI02518	(243)	H L R S T S T Y L G N S T Y Y G S G L V D A Q R A T N	(SEQ ID n.º 3)
BspU02193	(243)	R L N D T A I P L G N A Y Y F G N G L V D A S R A A Y	(SEQ ID n.º 6)
B_pseudofirmus_ADC49870	(247)	R M N Q T A I P L G N S T Y Y G N G L V D A E Y A A Q	(SEQ ID n.º 49)
Bacillus_sp_ADD64465	(243)	R I N Q T A T Y L G S S N L Y G N G L V H A G R A T Q	(SEQ ID n.º 50)
B_halodurans_BAB04574	(243)	R I N Q T A T Y L G S P S L Y G N G L V H A G R A T Q	(SEQ ID n.º 51)
Bacillus_sp_BAA05540	(243)	R I N Q T A T Y L G S P S L Y G N G L V H A G R A T Q	(SEQ ID n.º 52)
B_clausii_ABI26631	(243)	R I N Q T A T Y L G S P S L Y G N G L V H A G R A T Q	(SEQ ID n.º 53)
B_gibsonii_AGS78407	(243)	H L K N T A T N L G N S S Q F G S G L V N A E A A T R	(SEQ ID n.º 54)
Bacillus_sp_BAA25184	(243)	H L K N T A T N L G N T N Q F G S G L V N A E A A T R	(SEQ ID n.º 55)
B_sp_Sendai_BAA06157	(243)	H L T S T A T S L G N S N Q F G S G L V N A E A A T R	(SEQ ID n.º 56)
B_subtilis_AAA87324	(243)	H L K N T A T N L G N T T Q F G S G L V N A E A A T R	(SEQ ID n.º 57)
B_lehensis_AFK08970	(243)	H L K N T A T N L G N T T Q F G S G L V N A E A A T R	(SEQ ID n.º 58)
B_clausii_BAD63300	(243)	H L K N T A T G L G N T N L Y G S G L V N A E A A T R	(SEQ ID n.º 59)
B_lentus_P29600	(243)	H L K N T A T S L G S T N L Y G S G L V N A E A A T R	(SEQ ID n.º 60)
B_alcalophilus_AAA22212	(243)	H L K N T A T S L G S T N L Y G S G L V N A E A A T R	(SEQ ID n.º 61)
Bacillus_sp_sprC_AAC43580	(249)	R L K N T A T N L G D P F F Y G K G V I N V E S A L Q	(SEQ ID n.º 62)
Bacillus_sp_BAD21128	(250)	I L R D T A T N L G S S F Y Y G N G V I D V E K A L Q	(SEQ ID n.º 63)
Bacillus_sp_BAD11988	(249)	K L N S T T T Y L G S S F Y Y G N G V I N V E R A L Q	(SEQ ID n.º 64)
B_sp_sprD_AAC43581	(250)	R L R D T A T N L G S A F N Y G H G V I N L E R A L Q	(SEQ ID n.º 65)
B_sonorensis_WP_006636716	(248)	R L S S T A T N L G D S F Y Y G K G L I N V E A A A Q	(SEQ ID n.º 66)
B_licheniformis_CAJ70731.1	(248)	R L S S T A T Y L G S S F Y Y G K G L I N V E A A A Q	(SEQ ID n.º 67)
B_pumilus_ADK11996	(249)	R L E N T A T P L G D S F Y Y G K G L I N V Q A A S N	(SEQ ID n.º 68)
B_circulans_ADN04910	(249)	R L E N T A T P L G N S F Y Y G K G L I N V Q A A S N	(SEQ ID n.º 69)
B_stratosphericus_WP_007497196	(249)	R L E N T A T P L G N S F Y Y G K G L I N V Q A A S N	(SEQ ID n.º 70)
B_lehensis_AFP23380.1	(250)	R L E N T A T P L G N S F Y Y G K G L I N V Q A A S N	(SEQ ID n.º 71)
B_atrophaeus_YP003972439	(249)	S L E S T A T N L G N S F Y Y G K G L I N V Q A A A Q	(SEQ ID n.º 72)
B_amyloliquefaciens_CAA24990	(249)	S L E N T T T K L G D S F Y Y G K G L I N V Q A A A Q	(SEQ ID n.º 73)
G_stearothermophilus_ABY25856	(249)	S L E N T T T K L G D A F Y Y G K G L I N V Q A A A Q	(SEQ ID n.º 74)
B_methylotrophicus_AGC81872.1	(249)	S L E N T T T K L G D A F Y Y G K G L I N V Q A A A Q	(SEQ ID n.º 75)
B_vallismortis_WP010329279	(249)	R L E S T T T Y L G S S F Y Y G K G L I N V Q A A A Q	(SEQ ID n.º 76)
B_subtilis_str168_CAA74536.1	(249)	R L E S T A T Y L G N S F Y Y G K G L I N V Q A A A Q	(SEQ ID n.º 77)
B_subtilis_BAN09118	(249)	R L E S T A T N L G S S F Y Y G K G L I N V Q A A A Q	(SEQ ID n.º 78)
B_mojavensis_WP010333625	(249)	R L E S T A T Y L G S S F Y Y G K G L I N V Q A A A Q	(SEQ ID n.º 79)
B_marmarensis_ERN52602.1	(247)	R M N Q T A I P L G N S T Y Y G N G L V D A E Y A A Q	(SEQ ID n.º 80)
Consenso	(251)	R L _ N T A T _ L G _ S F Y Y G _ G L I N V _ A A T Q	(SEQ ID n.º 81)

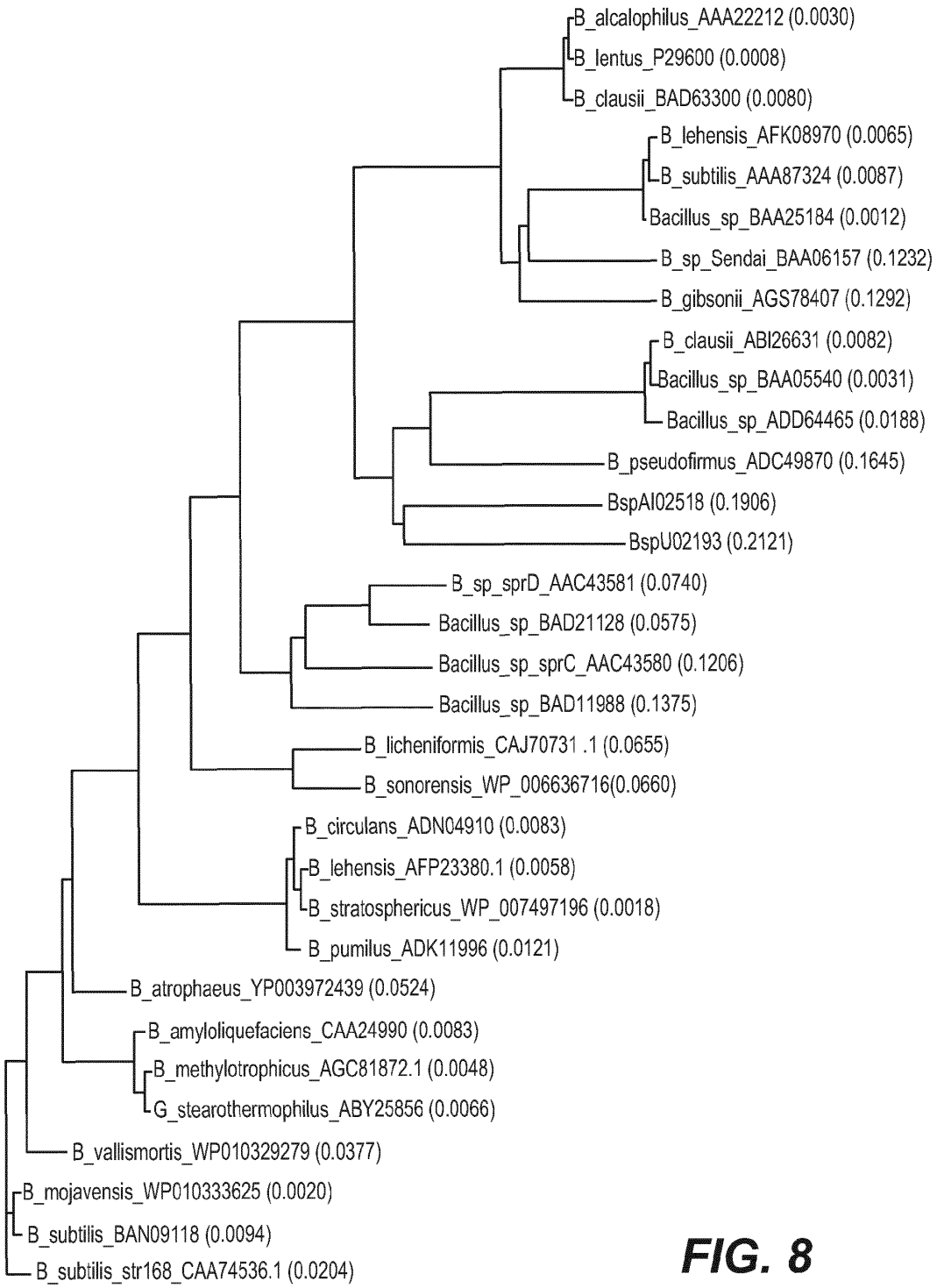
B_alcalophilus_AAA22212 (0.0030)
B_lentus_P29600 (0.0008)
B_clausii_BAD63300 (0.0080)
B_lehensis_AFK08970 (0.0065)
B_subtilis_AAA87324 (0.0087)
Bacillus_sp_BAA25184 (0.0012)
B_sp_Sendai_BAA06157 (0.1232)
B_gibsonii_AGS78407 (0.1292)
B_clausii_ABI26631 (0.0082)
Bacillus_sp_BAA05540 (0.0031)
Bacillus_sp_ADD64465 (0.0188)
B_pseudofirmus_ADC49870 (0.1645)
BspAI02518 (0.1906)
BspU02193 (0.2121)
B_sp_sprD_AAC43581 (0.0740)
Bacillus_sp_BAD21128 (0.0575)
Bacillus_sp_sprC_AAC43580 (0.1206)
Bacillus_sp_BAD11988 (0.1375)
B_licheniformis_CAJ70731 .1 (0.0655)
B_sonorensis_WP_006636716(0.0660)
B_circulans_ADN04910 (0.0083)
B_lehensis_AFP23380.1 (0.0058)
B_stratosphericus_WP_007497196 (0.0018)
B_pumilus_ADK11996 (0.0121)
B_atrophaeus_YP003972439 (0.0524)
B_amyloliquefaciens_CAA24990 (0.0083)
B_methylotrophicus_AGC81872.1 (0.0048)
G_stearothermophilus_ABY25856 (0.0066)
B_vallismortis_WP010329279 (0.0377)
B_mojavensis_WP010333625 (0.0020)
B_subtilis_BAN09118 (0.0094)
B_subtilis_str168_CAA74536.1 (0.0204)

FIG. 8

```
                                        1                                                  50
SWT66_254731                            SQTVPWGINRVQAPTVHSWGARGNGVRVAVLDTGI-ASHEDLRISGGASF
Bcl04009                                SQTIPWGINRVQAPTVHSWGARGNGVRVAVLDTGI-ASHEDLRISGGASF
Bakn00315                               SQTVPWGINHIQAPTVHSWGNRGNGVRVAVLDSGV-ASHEDLRISGGRSF
BspAI02518                              AQSTPWGISRINAPAVHSTGNFGQGVRVAVLDSGV-ASHEDLRIAGGVSF
BspU02193                               TQTVPWGINHVKAPTVHNWGNVGTGVKVAVLDTGI-ASHPDLRVSGGASF
B_pseudofirmus_ADC49870                 AQTVPWGIPYIYSDVVHRQGYFGNGVKVAVLDTGV-APHPDLHIRGGVSF
B_lentus_P29600                         AQSVPWGISRVQAPAAHNRGLTGSGVKVAVLDTGI-STHPDLNIRGGASF
B_amyloliquefaciens_CAA24990            AQSVPYGVSQIKAPALHSQGYTGSNVKVAVIDSGIDSSHPDLKVAGGASM
B_licheniformis_CAJ70731.1              AQTVPYGIPLIKADKVQAQGFKGANVKVAVLDTGIQASHPDLNVVGGASF
Bacillus_sp_sprC_AAC43580               AQTVPWGIPHIKADKAHAAGVTGSGVKVAILDTGIDANHADLNVKGGASF
                                        :*: *:*:  : :   :  *  * .*:**::*:*: : * **.: ** *:
                Consenso          (1)   AQTVPWGI  I AP VHS G  G GVKVAVLDTGIAS HPDLRI GGASF

                                        51                                                 100
SWT66_254731                            ISSEPSY-NDLNGHGTHVAGTIAARDNSYGVLGVAPNVNLYAVKVLDRNG
Bcl04009                                ISSEPSY-NDLNGHGTHVAGTIAARDNSYGVLGVAPNVDLYAVKVLDRNG
Bakn00315                               ITSEPSY-QDYNGHGTHVAGTIAGLNNSYGVLGVAPNVNLYAVKVLDRNG
BspAI02518                              VASEPSY-QDYNGHGTHVAGTIAGLNNSVGVLGVAPSVQLYAVKVLDRNG
BspU02193                               IPSEPTI-QDFNGHGTHVAGTVAALNNSIGVLGVAPNVQLYGVKVLDRNG
B_pseudofirmus_ADC49870                 ISTENTY-VDYNGHGTHVAGTVAALNNSYGVLGVAPGAELYAVKVLDRNG
B_lentus_P29600                         VPGEPST-QDGNGHGTHVAGTIAALNNSIGVLGVAPSAELYAVKVLGASG
B_amyloliquefaciens_CAA24990            VPSETNPFQDNNSHGTHVAGTVAALNNSIGVLGVAPSASLYAVKVLGADG
B_licheniformis_CAJ70731.1              VAGEAYN-TDGNGHGTHVAGTVAALDNTTGVLGVAPSVSLYAVKVLNSSG
Bacillus_sp_sprC_AAC43580               VSGEPNALQDGNGHGTHVAGTVAALNNTTGVLGVAYNADLYAVKVLSASG
                                        :. *     * *.********:*. :*: ****** ...**.****. .*
                Consenso          (51)    SEP SYQD NGHGTHVAGT AALNNS GVLGVAPNV LYAVKVLDRNG
```

FIG. 9A

```
                                  101                                                 150
SWT66_254731                      SGSLSGIARGIEWAITNNMDIVNMSLGGSTGSTALRQAADNAYNRGILLV
Bcl04009                          SGSLSGIARGIEWAITNNMDIVNMSLGGSTGSTALRQAADNAYNRGILLV
Bakn00315                         SGSHSAIAQGIEWSVSNGMHIVNMSLGGPTGSTTLQRAADNAYNRGVLLI
BspAl02518                        GGNHSDIARGIEWSVNNGMHVVNMSLGGPTGSTTLQRAADNAYNRGVLLI
BspU02193                         GGSHSAIAQGIEWSISNGMDVVNMSLGGATSSTALSQAVANASNRGILLI
B_pseudofirmus_ADC49870           SGSHASIAQGIEWAMNNGMDIANMSLGSPSGSTTLQLAADRARNAGVLLI
B_lentus_P29600                   SGSVSSIAQGLEWAGNNGMHVANLSLGSPSPSATLEQAVNSATSRGVLVV
B_amyloliquefaciens_CAA24990      SGQYSWIINGIEWAIANNMDVINMSLGGPSGSAALKAAVDKAVASGVVVV
B_licheniformis_CAJ70731.1        SGSYSGIVSGIEWATTNGMDVINMSLGGASGSTAMKQAVDNAYARGVVVV
Bacillus_sp_sprC_AAC43580         SGTLSGIAQGIEWSISNGMNVINMSLGGSSGSTALQQACNNAYNRGIVVI
                                  .*  : *  *:**:  *.*.: *:***..: *:::  *   *   *::::
                Consenso  (101)   SGS S IAQGIEWAI NGMDVVNMSLGGP GSTAL QAADNAYNRGVLL

                                  151                                                 200
SWT66_254731                      AAAGNTGSAG----ISFPARYNSVMAVGATDSNNNRASFSTFGNELEIMA
Bcl04009                          AAAGNTGSAG----ISFPARYNSVMAVGATDSNNNRASFSTFGNELEIMA
Bakn00315                         AAAGNTGSAG----ISYPARYNSVMAVGAVDSNNNRASFSTFGNELEIMA
BspAl02518                        AAAGNTGTSG----VSFPARYSSVMAVAATDSNNNRASFSTYGSQIEISA
BspU02193                         AASGNTGRAG----IQFPARYSQVMAVGAVDQNNRLASFSTFGNEQEIVA
B_pseudofirmus_ADC49870           GAAGNSGQQGGSNNMGYPARYASVMAVGAVDQNGNRANFSSYGSELEIMA
B_lentus_P29600                   AASGNSGAGS----ISYPARYANAMAVGATDQNNNRASFSQYGAGLDIVA
B_amyloliquefaciens_CAA24990      AAAGNEGTSGSSSTVGYPGKYPSVIAVGAVDSSNQRASFSSVGPELDVMA
B_licheniformis_CAJ70731.1        AAAGNSGSSGNTNTIGYPAKYDSVIAVGAVDSNSNRASFSSVGAELEVMA
Bacillus_sp_sprC_AAC43580         AAAGNSGSSGNRNTMGYPARYSSVIAVGAVSSNNTRASFSSVGSELEVMA
                                  .*:** *  .    : :*.:* ..:**.*.....  *.**  *   :: *
                Consenso  (151)   AAAGNTGS G    ISYPARY SVMAVGAVDSNNNRASFST G ELEIMA
```

FIG. 9B

```
                                            201                                              250
SWT66_254731                                PGVSVLSTYPTNRYVSLNGTSMASPHVAGVAALVKSRYPHATNVQIRNRL
Bcl04009                                    PGVSVLSTYPTNRYVSLNGTSMASPHVAGVAALVKSRYPNATNVQIRNRL
Bakn00315                                   PGVSILSTHLSNQYVSLNGTSMASPHVAGVAALVKAQYPSATNAQIRQRL
BspAl02518                                  PGVGINSTYPTNGYSSLNGTSMASPHVAGVAALVKARYPSATNAQIRQHL
BspU02193                                   PGVGIQSTYLNNGYSSLNGTSMAAPHVAGVAALVMSEYPWATAPQVRGRL
B_pseudofirmus_ADC49870                     PGVNINSTYLNNGYRSLNGTSMASPHVAGVAALVKQKHPHLTAAQIRNRM
B_lentus_P29600                             PGVNVQSTYPGSTYASLNGTSMATPHVAGAAALVKQKNPSWSNVQIRNHL
B_amyloliquefaciens_CAA24990                PGVSIQSTLPGNKYGAYNGTSMASPHVAGAAALILSKHPNWTNTQVRSSL
B_licheniformis_CAJ70731.1                  PGAGVYSTYPTNTYATLNGTSMASPHVAGAAALILSKHPNLSASQVRNRL
Bacillus_sp_sprC_AAC43580                   PGVNILSTTPGNNYASFNGTSMAAPHVAGAAALIKAKYPSMTNVQIRERL
                                            **..: **   . * : ******:*****.***:  . *  :  *:*  :
                     Consenso     (201)     PGV I STYP N Y SLNGTSMASPHVAGVAALVKSKYP ATN QIRNRL

                                            251                      275
SWT66_254731                                NSTATNLGSSYYFGNGLVNAARAAN   (SEQ ID n.º 17)
Bcl04009                                    NSTATNLGSSYYFGNGLVNAARAAN   (SEQ ID n.º 14)
Bakn00315                                   RDTATPLGSSYYFGNGLVHAARAAN   (SEQ ID n.º 11)
BspAl02518                                  RSTSTYLGNSTYYGSGLVDAQRATN   (SEQ ID n.º 3)
BspU02193                                   NDTAIPLGNAYYFGNGLVDASRAAY   (SEQ ID n.º 6)
B_pseudofirmus_ADC49870                     NQTAIPLGNSTYYGNGLVDAEYAAQ   (SEQ ID n.º 49)
B_lentus_P29600                             KNTATSLGSTNLYGSGLVNAEAATR   (SEQ ID n.º 60)
B_amyloliquefaciens_CAA24990                ENTTTKLGDSFYYGKGLINVQAAAQ   (SEQ ID n.º 73)
B_licheniformis_CAJ70731.1                  SSTATYLGSSFYYGKGLINVEAAAQ   (SEQ ID n.º 67)
Bacillus_sp_sprC_AAC43580                   KNTATNLGDPFFYGKGVINVESALQ   (SEQ ID n.º 62)
                                             .*:  **..  :*.*::..  *
                     Consenso     (251)       TAT LGSS YYGNGLVNA RAA    (SEQ ID n.º 83)
```

FIG. 9C

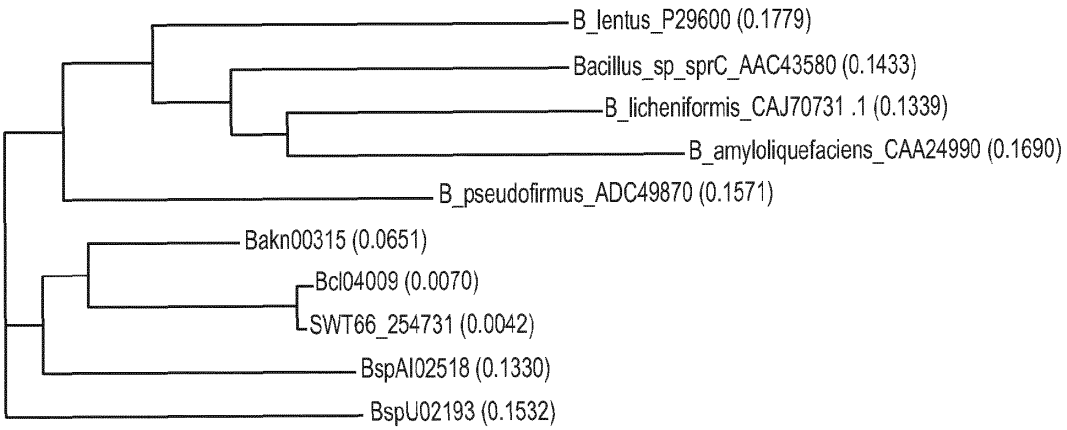
B_lentus_P29600 (0.1779)
Bacillus_sp_sprC_AAC43580 (0.1433)
B_licheniformis_CAJ70731 .1 (0.1339)
B_amyloliquefaciens_CAA24990 (0.1690)
B_pseudofirmus_ADC49870 (0.1571)
Bakn00315 (0.0651)
Bcl04009 (0.0070)
SWT66_254731 (0.0042)
BspAI02518 (0.1330)
BspU02193 (0.1532)

FIG. 10

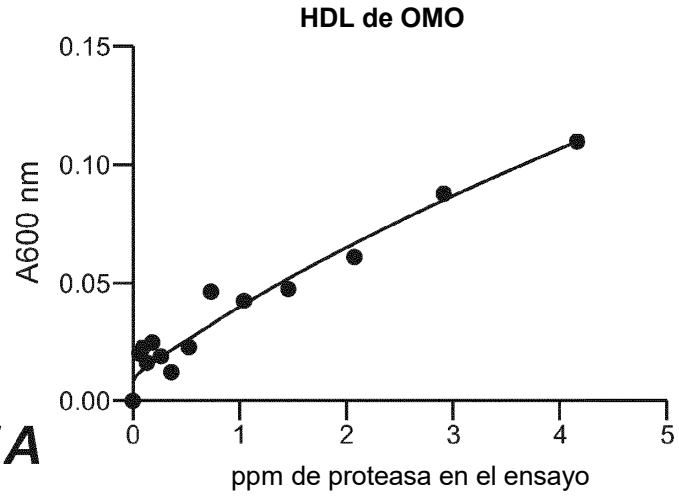

FIG. 11A

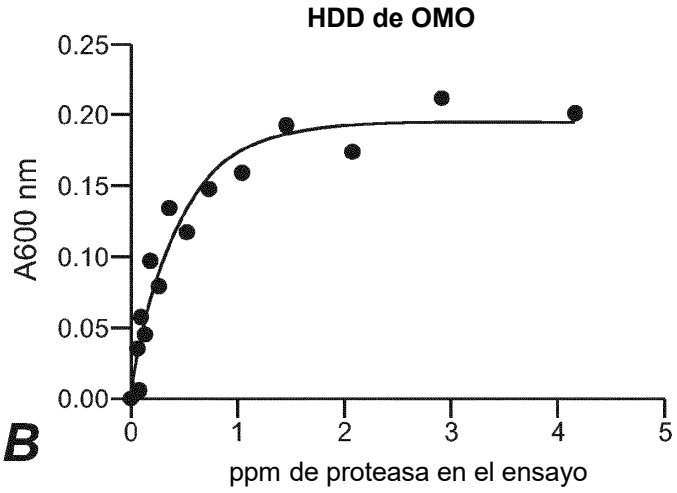

FIG. 11B

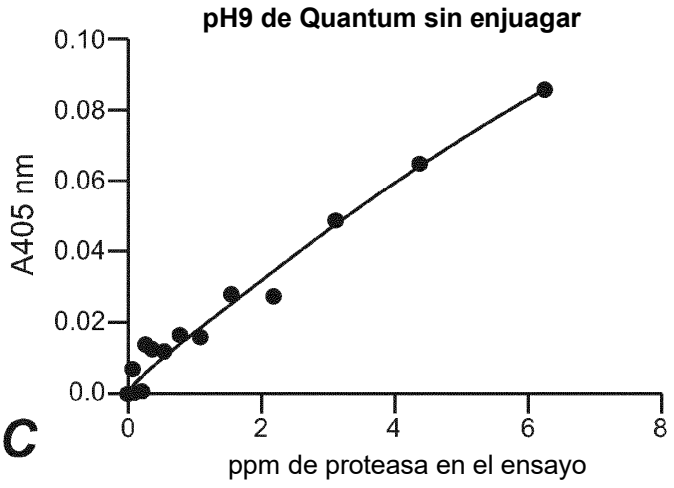

FIG. 11C

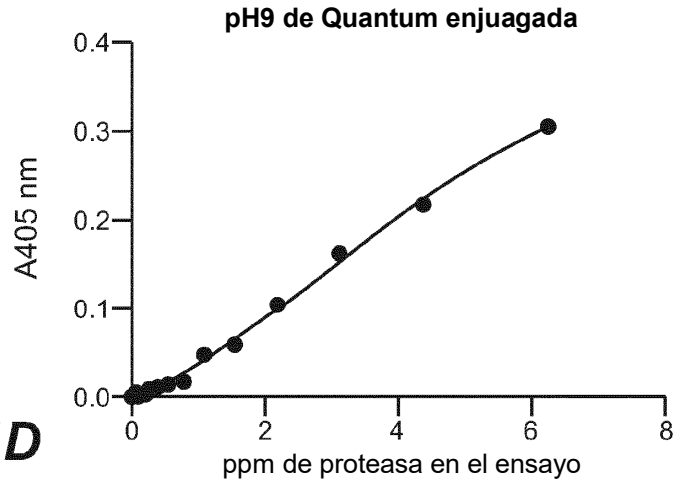

FIG. 11D

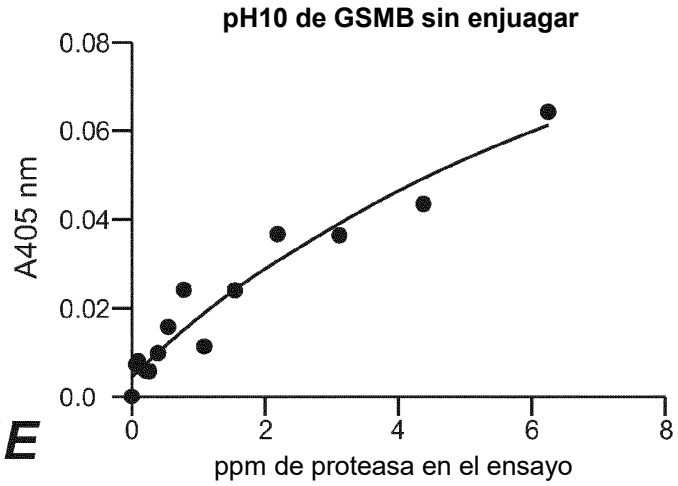

FIG. 11E

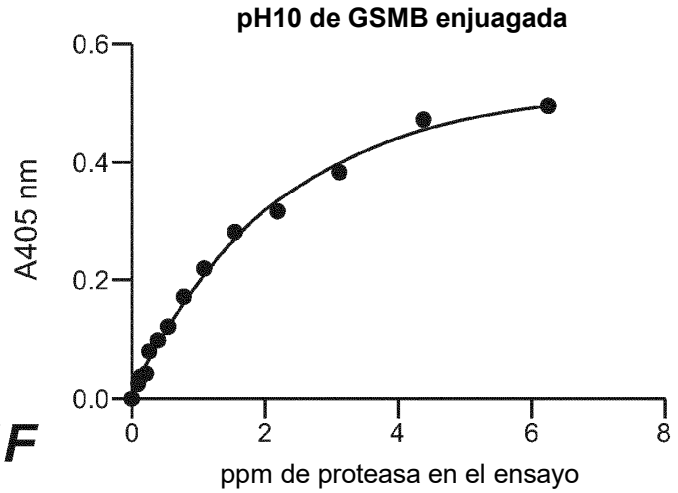

FIG. 11F

```
                               1                                                 50
    Bsp_AAC43580    (1)   AQTVPWGIPHIKADKAHAAGVTGSGVKVAILDTGIDANHADLNVKGGASF
    Bam_CAA24990    (1)   AQSVPYGVSQIKAPALHSQGYTGSNVKVAVIDSGIDSSHPDLKVAGGASM
    Bli_CAJ70731    (1)   AQTVPYGIPLIKADKVQAQGFKGANVKVAVLDTGIQASHPDLNVVGGASF
     Ble_P29600     (1)   AQSVPWGISRVQAPAAHNRGLTGSGVKVAVLDTGIST-HPDLNIRGGASF
    Bps_ADC49870    (1)   AQTVPWGIPYIYSDVVHRQGYFGNGVKVAVLDTGVAP-HPDLHIRGGVSF
      BspU02193     (1)   TQTVPWGINHVKAPTVHNWGNVGTGVKVAVLDTGIAS-HPDLRVSGGASF
  ACB102_2847966    (1)   AQSTPWGISRINAPAVHSTGNFGQGVRVAVLDSGVAS-HEDLRIAGGVSF
     BspAI02518     (1)   AQSTPWGISRINAPAVHSTGNFGQGVRVAVLDSGVAS-HEDLRIAGGVSF
  COG104_4065768    (1)   AQSTPWGISRINAPAVHSTGNFGQGVRVAVLDSGVAS-HEDLRIAGGVSF
   ACB83_2687815    (1)   AQSTPWGISRINAPAVHSTGNLGQGVRVAVLDSGVAS-HEDLRIAGGVSF
   ACB90_2720294    (1)   AQSTPWGISRINAPAVHSTGNLGQGVRVAVLDSGVAS-HEDLRIAGGVSF
        Bcl04009    (1)   SQTIPWGINRVQAPTVHSWGARGNGVRVAVLDTGIAS-HEDLRISGGASF
    SWT66_254731    (1)   SQTVPWGINRVQAPTVHSWGARGNGVRVAVLDTGIAS-HEDLRISGGASF
   ACB82_2683104    (1)   SQTVPWGINHIQAPTVHSWGNRGNGVRVAVLDSGVAS-HEDLRISGGRSF
   ACB89_2715301    (1)   SQTVPWGINHIQAPTVHSWGNRGNGVRVAVLDSGVAS-HEDLRIFGGRSF
   ACB92_2732966    (1)   SQTVPWGINHIQAPTVHSWGNRGNGVRVAVLDSGVAS-HEDLRISGGRSF
 DETPh35_2828044    (1)   SQTVPWGINHIQAPTVHSWGNRGNGVRVAVLDSGVAS-HEDLRISGGRSF
       Bakn00315    (1)   SQTVPWGINHIQAPTVHSWGNRGNGVRVAVLDSGVAS-HEDLRISGGRSF
        Consenso    (1)   AQTVPWGI  IQAP VHS GN GNGVRVAVLDSGVAS HEDLRISGG SF
```

FIG. 12A-1

		51 100
Bsp_AAC43580	(51)	VSGEPNALQDGNGHGTHVAGTVAALNNTTGVLGVAYNADLYAVKVLSASG
Bam_CAA24990	(51)	VPSETNPFQDNNSHGTHVAGTVAALNNSIGVLGVAPSASLYAVKVLGADG
Bli_CAJ70731	(51)	VAGEAY-NTDGNGHGTHVAGTVAALDNTTGVLGVAPSVSLYAVKVLNSSG
Ble_P29600	(50)	VPGEPS-TQDGNGHGTHVAGTIAALNNSIGVLGVAPSAELYAVKVLGASG
Bps_ADC49870	(50)	ISTENT-YVDYNGHGTHVAGTVAALNNSYGVLGVAPGAELYAVKVLDRNG
BspU02193	(50)	IPSEPT-IQDFNGHGTHVAGTVAALNNSIGVLGVAPNVQLYGVKVLDRNG
ACB102_2847966	(50)	VASEPS-YQDYNGHGTHVAGTIAGLNNSVGVLGVAPSVQLYAVKVLDRNG
BspAI02518	(50)	VASEPS-YQDYNGHGTHVAGTIAGLNNSVGVLGVAPSVQLYAVKVLDRNG
COG104_4065768	(50)	VASEPS-YQDYNGHGTHVAGTIAGLNNSVGVLGVAPSVQLYAVKVLDRNG
ACB83_2687815	(50)	VASEPS-YQDYNGHGTHVAGTIAGLNNSVGVLGVAPSVQLYAVKVLDRNG
ACB90_2720294	(50)	VASEPS-YQDYNGHGTHVAGTIAGLNNSVGVLGVAPFVQLYAVKVLDRNG
Bcl04009	(50)	ISSEPS-YNDLNGHGTHVAGTIAARDNSYGVLGVAPNVDLYAVKVLDRNG
SWT66_254731	(50)	ISSEPS-YNDLNGHGTHVAGTIAARDNSYGVLGVAPNVNLYAVKVLDRNG
ACB82_2683104	(50)	ITSEPS-YQDYNGHGTHVAGTIAGLNNSYGVLGVAPNVNLYAVKVLDRNG
ACB89_2715301	(50)	ITSEPS-YQDYNGHGTHVAGTIAGLNNSYGVLGVAPNVNLYAVKVLDRNG
ACB92_2732966	(50)	ITSEPS-YQDYNGHGTHVAGTIAGLNNSYGVLGVAPNVNLYAVKVLDRNG
DETPh35_2828044	(50)	ITSEPS-YQDYNGHGTHVAGTIAGLNNSYGVLGVAPNVNLYAVKVLDRNG
Bakn00315	(50)	ITSEPS-YQDYNGHGTHVAGTIAGLNNSYGVLGVAPNVNLYAVKVLDRNG
Consenso	(51)	IASEPS YQDYNGHGTHVAGTIAGLNNS GVLGVAPNVNLYAVKVL**DRN**G

FIG. 12A-2

		101 150
Bsp_AAC43580	(101)	SGTLSGIAQGIEWSISNGMNVINMSLGGSSGSTALQQACNNAYNRGIVVI
Bam_CAA24990	(101)	SGQYSWIINGIEWAIANNMDVINMSLGGPSGSAALKAAVDKAVASGVVVV
Bli_CAJ70731	(100)	SGSYSGIVSGIEWATTNGMDVINMSLGGASGSTAMKQAVDNAYARGVVVV
Ble_P29600	(99)	SGSVSSIAQGLEWAGNNGMHVANLSLGSPSPSATLEQAVNSATSRGVLVV
Bps_ADC49870	(99)	SGSHASIAQGIEWAMNNGMDIANMSLGSPSGSTTLQLAADRARNAGVLLI
BspU02193	(99)	GGSHSAIAQGIEWSISNGMDVVNMSLGGATSSTALSQAVANASNRGILLI
ACB102_2847966	(99)	GGNHSDIARGIEWSVNNGMHVVNMSLGGPTGSTTLQRAADNAYNRGVLLI
BspAI02518	(99)	GGNHSDIARGIEWSVNNGMHVVNMSLGGPTGSTTLQRAADNAYNRGVLLI
COG104_4065768	(99)	GGNHSDIARGIEWSVNNGMHVVNMSLGGPTGSTTLQRAADNAYNRGVLLI
ACB83_2687815	(99)	GGNHSDIARGIEWSVNNGMHVVNMSLGGPTGSTTLQRAADNAYNRGVLLI
ACB90_2720294	(99)	GGNHSDIARGIEWSVNNGMHVVNMSLGGPTGSTTLQRAADNAYNRGVLLI
Bcl04009	(99)	SGSLSGIARGIEWAITNNMDIVNMSLGGSTGSTALRQAADNAYNRGILLV
SWT66_254731	(99)	SGSLSGIARGIEWAITNNMDIVNMSLGGSTGSTALRQAADNAYNRGILLV
ACB82_2683104	(99)	SGSHSAIAQGIEWSVSNGMHIVNMSLGGPTGSTTLQRAADNAYNRGVLLI
ACB89_2715301	(99)	SGSHSAIAQGIEWSVSNGMHIVNMSLGGPTGSTTLQRAADNAYNRGVLLI
ACB92_2732966	(99)	SGSHSAIAQGIEWSVSNGMHIVNMSLGGPTGSATLQRAADNAYNRGVLLI
DETPh35_2828044	(99)	SGSHSAIAQGIEWSVSNGMHIVNMSLGGPTGSATLQRAADNAYNRGVLLI
Bakn00315	(99)	SGSHSAIAQGIEWSVSNGMHIVNMSLGGPTGSTTLQRAADNAYNRGVLLI
Consenso	(101)	SGSHSAIAQGIEWSVSNGMHVVNMSLGGPTGSTTLQRAADNAYNRGVLLI

FIG. 12B-1

```
                              151                                                200
    Bsp_AAC43580   (151)   AAAGNSGSSGNRNTMGYPARYSSVIAVGAVSSNNTRASFSSVGSELEVMA
    Bam_CAA24990   (151)   AAAGNEGTSGSSSTVGYPGKYPSVIAVGAVDSSNQRASFSSVGPELDVMA
     Bli_CAJ70731  (150)   AAAGNSGSSGNTNTIGYPAKYDSVIAVGAVDSNSNRASFSSVGAELEVMA
      Ble_P29600   (149)   AASGNSGAGS----ISYPARYANAMAVGATDQNNNRASFSQYGAGLDIVA
    Bps_ADC49870   (149)   GAAGNSGQQGGSNNMGYPARYASVMAVGAVDQNGNRANFSSYGSELEIMA
       BspU02193   (149)   AASGNTGRAG----IQFPARYSQVMAVGAVDQNNRLASFSTFGNEQEIVA
  ACB102_2847966   (149)   AAAGNTGTSG----VSFPARYSSVMAVAATDSNNNRASFSTYGPEIEISA
      BspAI02518   (149)   AAAGNTGTSG----VSFPARYSSVMAVAATDSNNNRASFSTYGSQIEISA
  COG104_4065768   (149)   AAAGNTGTSG----VSFPARYSSVMAVAATDSNNNRASFSTYGTQIEISA
   ACB83_2687815   (149)   AAAGNTGTSG----VSFPARYSSVMAVAATDSNNNRASFSTYGPEIEISA
   ACB90_2720294   (149)   AAAGNTGTSG----VSFPARYSSVMAVAATDSNNNRASFSTYGPEIEISA
        Bcl04009   (149)   AAAGNTGSAG----ISFPARYNSVMAVGATDSNNNRASFSTFGNELEIMA
    SWT66_254731   (149)   AAAGNTGSAG----ISFPARYNSVMAVGATDSNNNRASFSTFGNELEIMA
   ACB82_2683104   (149)   AAAGNTGSAG----ISYPARYNSVMAVGAVDSNNNRASFSTFGNELEIMA
   ACB89_2715301   (149)   AAAGNTGSAG----ISYPARYNSVMAVGAVDSNNNRASFSTFGNELEIMA
   ACB92_2732966   (149)   AAAGNTGSAG----ISYPARYNSVMAVGAVDSNNNRASFSTFGNELEIMA
 DETPh35_2828044   (149)   AAAGNTGSAG----ISYPARYNSVMAVGAVDSNNNRASFSTFGNELEIMA
       Bakn00315   (149)   AAAGNTGSAG----ISYPARYNSVMAVGAVDSNNNRASFSTFGNELEIMA
        Consenso   (151)   AAAGNTGSAG    ISYPARYSSVMAVGAVDSNNNRASFSTFG ELEIMA
```

FIG. 12B-2

```
                        201                                              250
Bsp_AAC43580      (201) PGVNILSTTPGNNYASFNGTSMAAPHVAGAAALIKAKYPSMTNVQIRERL
Bam_CAA24990      (201) PGVSIQSTLPGNKYGAYNGTSMASPHVAGAAALILSKHPNWTNTQVRSSL
Bli_CAJ70731      (200) PGAGVYSTYPTNTYATLNGTSMASPHVAGAAALILSKHPNLSASQVRNRL
Ble_P29600        (195) PGVNVQSTYPGSTYASLNGTSMATPHVAGAAALVKQKNPSWSNVQIRNHL
Bps_ADC49870      (199) PGVNINSTYLNNGYRSLNGTSMASPHVAGVAALVKQKHPHLTAAQIRNRM
BspU02193         (195) PGVGIQSTYLNNGYSSLNGTSMAAPHVAGVAALVMSEYPWATAPQVRGRL
ACB102_2847966    (195) PGVGINSTYPTNRYSSLNGTSMASPHVAGVAALVKARYPSATNAQIRQHL
BspAI02518        (195) PGVGINSTYPTNGYSSLNGTSMASPHVAGVAALVKARYPSATNAQIRQHL
COG104_4065768    (195) PGVGINSTYPTNRYSSLNGTSMASPHVAGVAALVKARYPSATNAQIRQHL
ACB83_2687815     (195) PGVGINSTYPTNRYSSLNGTSMASPHVAGVAALVKARYPSATNAQIRQHL
ACB90_2720294     (195) PGVGINSTYPTNRYSSLNGTSMASPHVAGVAALVKARYPSATNAQIRQHL
Bcl04009          (195) PGVSVLSTYPTNRYVSLNGTSMASPHVAGVAALVKSRYPNATNVQIRNRL
SWT66_254731      (195) PGVSVLSTYPTNRYVSLNGTSMASPHVAGVAALVKSRYPHATNVQIRNRL
ACB82_2683104     (195) PGVSILSTHLSNQYVSLNGTSMASPHVAGVAALVKAQYPSATNAQIRQRL
ACB89_2715301     (195) PGVSILSTHLSNQYVSLNGTSMASPHVAGVAALVKAQYPSATNAQIRQRL
ACB92_2732966     (195) PGVSILSTHLSNQYISLNGTSMASPHVAGVAALVKAQYPSATNAQIRQRL
DETPh35_2828044   (195) PGVSILSTHLSNQYVSLNGTSMASPHVAGVAALVKAQYPSATNAQIRQRL
Bakn00315         (195) PGVSILSTHLSNQYVSLNGTSMASPHVAGVAALVKAQYPSATNAQIRQRL
Consenso          (201) PGV INSTYPTN YSSLNGTSMASPHVAGVAALVKARYPSATNAQIRQRL
```

FIG. 12C-1

		251 275
Bsp_AAC43580	(251)	KNTATNLGDPFFYGKGVINVESALQ
Bam_CAA24990	(251)	ENTTTKLGDSFYYGKGLINVQAAAQ
Bli_CAJ70731	(250)	SSTATYLGSSFYYGKGLINVEAAAQ
Ble_P29600	(245)	KNTATSLGSTNLYGSGLVNAEAATR
Bps_ADC49870	(249)	NQTAIPLGNSTYYGNGLVDAEYAAQ
BspU02193	(245)	NDTAIPLGNAYYFGNGLVDASRAAY
ACB102_2847966	(245)	RSTSTYLGNSTYYGSGLVDAQRAAN
BspAI02518	(245)	RSTSTYLGNSTYYGSGLVDAQRATN
COG104_4065768	(245)	RSTSTYLGNSTYYGSGLVDAQRAAN
ACB83_2687815	(245)	RSTSTNLGNSTYYGSGLVNAQRAAN
ACB90_2720294	(245)	RSTSTNLGNSTYYGSGLVNAQRAAN
Bcl04009	(245)	NSTATNLGSSYYFGNGLVNAARAAN
SWT66_254731	(245)	NSTATNLGSSYYFGNGLVNAARAAN
ACB82_2683104	(245)	RDTATPLGSSYYFGNGLVHATRAAN
ACB89_2715301	(245)	RDTATPLGSSYYFGNGLVHAARAAN
ACB92_2732966	(245)	RDTATPLGSSYYFGNGLVHAARAAN
DETPh35_2828044	(245)	RDTATPLGSSYYFGNGLVHAARAAN
Bakn00315	(245)	RDTATPLGSSYYFGNGLVHAARAAN
Consenso	(251)	R TAT LGSSYYYGNGLV A RAAN

FIG. 12C-2

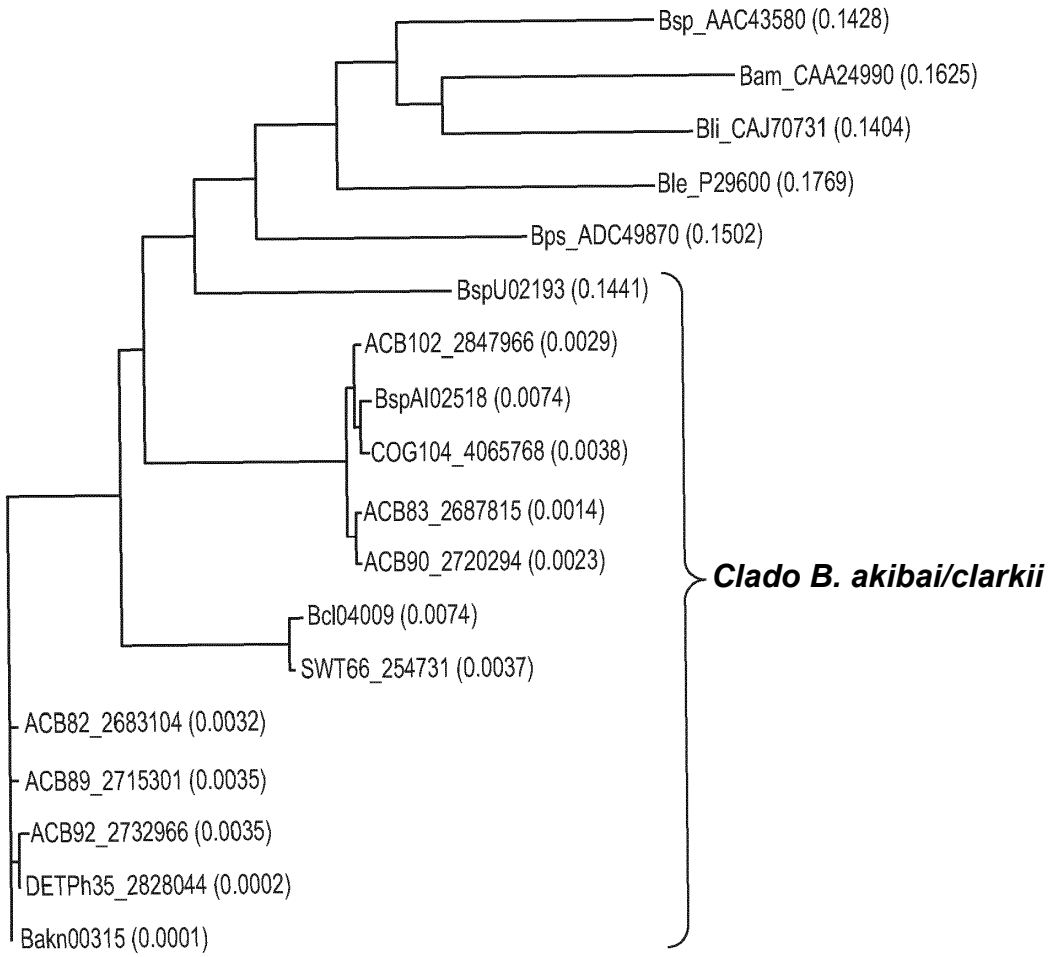
Bsp_AAC43580 (0.1428)
Bam_CAA24990 (0.1625)
Bli_CAJ70731 (0.1404)
Ble_P29600 (0.1769)
Bps_ADC49870 (0.1502)
BspU02193 (0.1441)
ACB102_2847966 (0.0029)
BspAI02518 (0.0074)
COG104_4065768 (0.0038)
ACB83_2687815 (0.0014)
ACB90_2720294 (0.0023)
Bcl04009 (0.0074)
SWT66_254731 (0.0037)
ACB82_2683104 (0.0032)
ACB89_2715301 (0.0035)
ACB92_2732966 (0.0035)
DETPh35_2828044 (0.0002)
Bakn00315 (0.0001)
Clado B. akibai/clarkii

FIG. 13

5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100
1: BspAI2518 AQSTPWGISRINAPAVHSTGNFGQGVRVAVLDSGVDASHEDLRIAGGVSFVASEPSYADQDYNGHGTHVAGTIAGLNNSVGVLGVAPSVQLYAVKVLDRNGGGNHS
2: Bakn315 SQTVPWGINHIQAPTVHSWGNRGNGVRVAVLDSGVDASHEDLRISGGRSFITSEPSYADQDYNGHGTHVAGTIAGLNNSYGVLGVAPNVNLYAVKVLDRNGSGSHS
3: BcI04009 SQTIPWGINRVQAPTVHSWGARGNGVRVAVLDTGIDASHEDLRISGGASFISSEPSYADNDLNGHGTHVAGTIAARDNSYGVLGVAPNVDLYAVKVLDRNGSGSLS
4: swf66 SQTVPWGINRVQAPTVHSWGARGNGVRVAVLDTGIDASHEDLRISGGASFISSEPSYADNDLNGHGTHVAGTIAARDNSYGVLGVAPNVNLYAVKVLDRNGSGSLS
5: BspU2193 TQTVPWGINHVKAPTVHNWGNVGTGVKVAVLDTGIDASHPDLRVSGGASFIPSEPTIADQDFNGHGTHVAGTVAALNNSIGVLGVAPNVQLYGVKVLDRNGGGSHS
6: ACB82 SQTVPWGINHIQAPTVHSWGNRGNGVRVAVLDSGVDASHEDLRISGGRSFITSEPSYADQDYNGHGTHVAGTIAGLNNSYGVLGVAPNVNLYAVKVLDRNGSGSHS
7: ACB92 SQTVPWGINHIQAPTVHSWGNRGNGVRVAVLDSGVDASHEDLRISGGRSFITSEPSYADQDYNGHGTHVAGTIAGLNNSYGVLGVAPNVNLYAVKVLDRNGSGSHS
8: ACB83 AQSTPWGISRINAPAVHSTGNLGQGVRVAVLDSGVDASHEDLRIAGGVSFVASEPSYADQDYNGHGTHVAGTIAGLNNSVGVLGVAPSVQLYAVKVLDRNGGGNHS
9: ACB89 SQTVPWGINHIQAPTVHSWGNRGNGVRVAVLDSGVDASHEDLRIFGGRSFITSEPSYADQDYNGHGTHVAGTIAGLNNSYGVLGVAPNVNLYAVKVLDRNGSGSHS
10: ACB90 AQSTPWGISRINAPAVHSTGNLGQGVRVAVLDSGVDASHEDLRIAGGVSFVASEPSYADQDYNGHGTHVAGTIAGLNNSVGVLGVAPFVQLYAVKVLDRNGGGNHS
11: ACB102 AQSTPWGISRINAPAVHSTGNFGQGVRVAVLDSGVDASHEDLRIAGGVSFVASEPSYADQDYNGHGTHVAGTIAGLNNSVGVLGVAPSVQLYAVKVLDRNGGGNHS
12: COG104 AQSTPWGISRINAPAVHSTGNFGQGVRVAVLDSGVDASHEDLRIAGGVSFVASEPSYADQDYNGHGTHVAGTIAGLNNSVGVLGVAPSVQLYAVKVLDRNGGGNHS
13: DETPh35 SQTVPWGINHIQAPTVHSWGNRGNGVRVAVLDSGVDASHEDLRISGGRSFITSEPSYADQDYNGHGTHVAGTIAGLNNSYGVLGVAPNVNLYAVKVLDRNGSGSHS
14: 1JEA **AQSVPWGISRVQAPAAHNRGLTGSGVKVAVLDTGIS-THPDLNIRGGASFVPGEPS-TQDGNGHGTHVAGTIAALNNSIGVLGVAPSAELYAVKVLGASGSGSVS**
15: 2ST1.A **AQSVPYGVSQIKAPALHSQGYTGSNVKVAVIDSGIDSSHPDLKVAGGASMVPSETNPFQDNNSHGTHVAGTVAALNNSIGVLGVAPSASLYAVKVLGADGSGQYS**
16: 3UNX.A **AQTVPYGIPLIKADKVQAQGFKGANVKVAVLDTGIQASHPDLNVVGGASFVAGE-AYNTDGNGHGTHVAGTVAALDNTTGVLGVAPSVSLYAVKVLNSSGSGSYS**
17: LG12 **AQTVPWGIPHIKADKAHAAGVTGSGVKVAILDTGIDANHADLNVKGGASFVSGEPNALQDGNGHGTHVAGTVAALNNTTGVLGVAYNADLYAVKVLSASGSGTLS**

FIG. 14A

105 110 115 120 125 130 135 140 145 150 155 160 165 170 175 180 185 190 195 200
1: BspAl2518 DIARGIEWSVNNGMHVVNMSLGGPTGSTTLQRAADNAYNRGVLLIAAAGNTGTAAAASGVSFPARYSSVMAVAATDSNNNRASFSTYGSQIEISAPGVGINSTYP
2: Bakn315 AIAQGIEWSVSNGMHIVNMSLGGPTGSTTLQRAADNAYNRGVLLIAAAGNTGSAAAAAGISYPARYNSVMAVGAVDSNNNRASFSTFGNELEIMAPGVSILSTHL
3: Bdl04009 GIARGIEWAITNNMDIVNMSLGGSTGSTALRQAADNAYNRGILLVAAAGNTGSAAAAAGISFPARYNSVMAVGATDSNNNRASFSTFGNELEIMAPGVSVLSTYP
4: swf66 GIARGIEWAITNNMDIVNMSLGGSTGSTALRQAADNAYNRGILLVAAAGNTGSAAAAAGISFPARYNSVMAVGATDSNNNRASFSTFGNELEIMAPGVSVLSTYP
5: BspU2193 AIAQGIEWSISNGMDVVNMSLGGATSSTALSQAVANASNRGILLIAASGNTGRAAAAAGIQFPARYSQVMAVGAVDQNNRLASFSTFGNEQEIVAPGVGIQSTYL
6: ACB82 AIAQGIEWSVSNGMHIVNMSLGGPTGSTTLQRAADNAYNRGVLLIAAAGNTGSAAAAAGISYPARYNSVMAVGAVDSNNNRASFSTFGNELEIMAPGVSILSTHL
7: ACB92 AIAQGIEWSVSNGMHIVNMSLGGPTGSATLQRAADNAYNRGVLLIAAAGNTGSAAAAAGISYPARYNSVMAVGAVDSNNNRASFSTFGNELEIMAPGVSILSTHL
8: ACB83 DIARGIEWSVNNGMHVVNMSLGGPTGSTTLQRAADNAYNRGVLLIAAAGNTGTAAAASGVSFPARYSSVMAVAATDSNNNRASFSTYGPEIEISAPGVGINSTYP
9: ACB89 AIAQGIEWSVSNGMHIVNMSLGGPTGSTTLQRAADNAYNRGVLLIAAAGNTGSAAAAAGISYPARYNSVMAVGAVDSNNNRASFSTFGNELEIMAPGVSILSTHL
10: ACB90 DIARGIEWSVNNGMHVVNMSLGGPTGSTTLQRAADNAYNRGVLLIAAAGNTGTAAAASGVSFPARYSSVMAVAATDSNNNRASFSTYGPEIEISAPGVGINSTYP
11: ACB102 DIARGIEWSVNNGMHVVNMSLGGPTGSTTLQRAADNAYNRGVLLIAAAGNTGTAAAASGVSFPARYSSVMAVAATDSNNNRASFSTYGPEIEISAPGVGINSTYP
12: COG104 DIARGIEWSVNNGMHVVNMSLGGPTGSTTLQRAADNAYNRGVLLIAAAGNTGTAAAASGVSFPARYSSVMAVAATDSNNNRASFSTYGTQIEISAPGVGINSTYP
13: DETPh35 AIAQGIEWSVSNGMHIVNMSLGGPTGSATLQRAADNAYNRGVLLIAAAGNTGSAAAAAGISYPARYNSVMAVGAVDSNNNRASFSTFGNELEIMAPGVSILSTHL
14: 1JEA **SIAQGLEWAGNNGMHVANLSLGSPSPSATLEQAVNSATSRGVLVVAASGNSGA----GSISYPARYANAMAVGATDQNNNRASFSQVGAGLDIVAPGVNVQSTYP**
15: 2ST1.A **WIINGIEWAIANNMDVINMSLGGPSGSAALKAAVDKAVASGVVVVAAAGNEGTSGSSSTVGYPGKYPSVIAVGAVDSSNQRASFSSVGPELDVMAPGVSIQSTLP**
16: 3UNX.A **GIVSGIEWATTNGMDVINMSLGGASGSTAMKQAVDNAYARGVVVVAAAGNSGSSGSTNTIGYPAKYDSVIAVGAVDSNSNRASFSSVGAELEVMAPGAGVYSTYP**
17: LG12 **GIAQGIEWSISNGMNVINMSLGGSSGSTALQQACNNAYNRGIVVIAAAGNSGSSGNRNTMGYPARYSSVIAVGAVSSNNTRASFSSVGSELEVMAPGVNILSTTP

FIG. 14B

```
                205  210  215  220  225  230  235  240  245  250  255  260  265
                 |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
1: BspAl2518    TNGYSSLNGTSMASPHVAGVAALVKARYPSATNAQIRQHLRSTSTYLGNSTYYGSGLVDAQRATÆN
2: Bakn315      SNQYVSLNGTSMASPHVAGVAALVKAQYPSATNAQIRQRLRDTATPLGSSYYFGNGLVHAARAAÆN
3: Bcl04009     TNRYVSLNGTSMASPHVAGVAALVKSRYPNATNVQIRNRLNSTATNLGSSYYFGNGLVNAARAAÆN
4: swi66        TNRYVSLNGTSMASPHVAGVAALVKSRYPHATNVQIRNRLNSTATNLGSSYYFGNGLVNAARAAÆN
5: BspU2193     NNGYSSLNGTSMAAPHVAGVAALVMSEYPWATAPQVRGRLNDTAIPLGNAYYFGNGLVDASRAAY
6: ACB82        SNQYVSLNGTSMASPHVAGVAALVKAQYPSATNAQIRQRLRDTATPLGSSYYFGNGLVHATRAAÆN
7: ACB92        SNQYISLNGTSMASPHVAGVAALVKAQYPSATNAQIRQRLRDTATPLGSSYYFGNGLVHAARAAÆN
8: ACB83        TNRYSSLNGTSMASPHVAGVAALVKARYPSATNAQIRQHLRSTSTNLGNSTYYGSGLVNAQRAAÆN
9: ACB89        SNQYVSLNGTSMASPHVAGVAALVKAQYPSATNAQIRQRLRDTATPLGSSYYFGNGLVHAARAAÆN
10: ACB90       TNRYSSLNGTSMASPHVAGVAALVKARYPSATNAQIRQHLRSTSTNLGNSTYYGSGLVNAQRAAÆN
11: ACB102      TNRYSSLNGTSMASPHVAGVAALVKARYPSATNAQIRQHLRSTSTYLGNSTYYGSGLVDAQRAAÆN
12: COG104      TNRYSSLNGTSMASPHVAGVAALVKARYPSATNAQIRQHLRSTSTYLGNSTYYGSGLVDAQRAAÆN
13: DETPh35     SNQYVSLNGTSMASPHVAGVAALVKAQYPSATNAQIRQRLRDTATPLGSSYYFGNGLVHAARAAÆN
14: 1JEA        GSTYASLNGTSMATPHVAGAAALVKQKNPSWSNVQIRNHLKNTATSLGSTNLYGSGLVNAEAATR
15: 2ST1.A      GNKYGAYNGTSMASPHVAGAAALILSKHPNWTNTQVRSSLENTTTKLGDSFYYGKGLINVQAAAQ
16: 3UNX.A      TNTYATLNGTSMASPHVAGAAALILSKHPNLSASQVRNRLSSTATYLGSSFYYGKGLINVEAAAQ
17: LG12        GNNYASFNGTSMAAPHVAGAAALIKAKYPSMTNVQIRERLKNTATNLGDPFFYGKGVINVESALQ
```

FIG. 14C

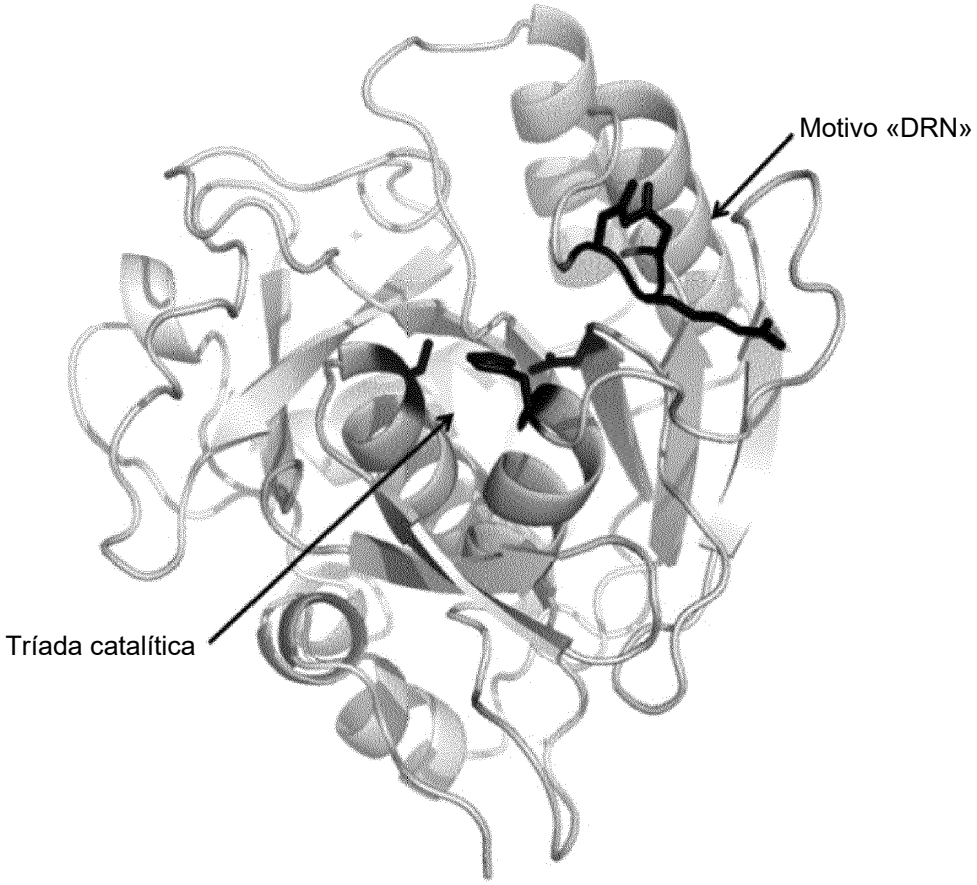

FIG. 15